

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**

**Instituto de Química de Araraquara  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química**

**MARIA CAROLINA DA SILVA**

**Identificação do secretoma lignolítico de *Neurospora crassa*  
envolvido na desconstrução da parede celular vegetal**

**ARARAQUARA  
2019**

**MARIA CAROLINA DA SILVA**

**Identificação do secretoma lignolítico de *Neurospora crassa*  
envolvido na desconstrução da parede celular vegetal**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Instituto de Química, Unesp, Araraquara, como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Fernanda Zanolli Freitas**

**ARARAQUARA  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

S586i Silva, Maria Carolina da  
Identificação do secretoma lignolítico de *Neurospora crassa* envolvido na desconstrução da parede celular vegetal / Maria Carolina da Silva. – Araraquara : [s.n.], 2019  
109 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Fernanda Zanolli Freitas

1. Lignina. 2. Fungos. 3. Bagaço de cana. 4. Lignocelulose.  
5. Madeira. I. Título.

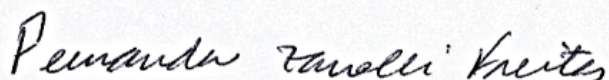
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** "Determinação do secretoma lignolítico de *Neurospora crassa*, envolvido na desconstrução da parede celular vegetal"

**AUTORA: MARIA CAROLINA DA SILVA**

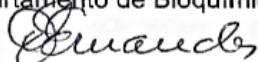
**ORIENTADORA: FERNANDA ZANOLLI FREITAS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



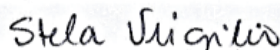
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> FERNANDA ZANOLLI FREITAS

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JOSE ROBERTO ERNANDES

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Dr.<sup>a</sup> STELA VIRGÍLIO

Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 01 de novembro de 2019

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** Maria Carolina da Silva

**e-mail:** [mariacarolina.fx@gmail.com](mailto:mariacarolina.fx@gmail.com)

**Endereço profissional:** Rua Prof. Francisco Degni, 55, Jd. Quitandinha – 14800-060, Araraquara – SP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos.

## FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Química pelo Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP em Araraquara – SP (Ano de conclusão: 2016).

Técnica em Química pela ETEC Salles Gomes (Centro Paula Souza), Tatuí – SP (Ano de conclusão 2011).

## BOLSAS RECEBIDAS

**Bolsa de Mestrado CAPES no período de 02/2017 a 02/2019**

Projeto: “*Neurospora crassa* como organismo modelo para o estudo de proteínas envolvidas na deslignificação vegetal”.

## TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS NACIONAIS

**Silva, M. C.**; Freitas, F. Z.; Bertolini, M. C. “***Neurospora crassa* as an organism model to investigate enzymes in sugarcane bagasse and hardwood**”. Apresentado na forma de pôster durante a 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2017. Águas de Lindóia - SP.

Silva, M. C., Maimoni, J. E. C., Bertolini, M. C., **Freitas, F. Z.** “**Deciphering the *Neurospora crassa* lignin secretome**”. In: III International Symposium on Fungal Stress, 2019. São José do Campos – SP.

## PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

**46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology**, Águas de Lindóia, SP, 2017.

## OUTRAS ATIVIDADES

Participou da “**I Escola de Inverno em Tecnologia Enzimática**” realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto – FCFRP/USP, no período de 23 a 27 de julho de 2018, a qual abordou diversos aspectos proteômicos e de biologia molecular relacionados a produção de enzimas fúngicas.

Realizou **Estágio Docência** durante o primeiro semestre de 2018 na disciplina de Bioquímica Geral e Experimental II, oferecida aos alunos de Bacharelado em Química e Química Tecnológica, sob a supervisão da Prof. Dr. Fernanda Zanolli Freitas, onde: 1) preparou soluções e testou aulas experimentais (padronização), 2) auxiliou os alunos durante as aulas práticas, 3) participou da correção das atividades avaliativas (relatórios e provas) e 4) ministrou a aula “*Determinação da pureza e massa molecular da enzima maltase por eletroforese*”.

Participou como Membro da Comissão Organizadora do Evento de Extensão Universitária “2º Outubro Rosa no IQ”, realizado no dia 05/10/2018, promovido pelo Instituto de Química do Campus de Araraquara - IQAr.

Participou como Membro da Comissão Organizadora do Evento de Extensão Universitária “1º Setembro Amarelo”, realizado no dia 11/09/2018, promovido pelo Instituto de Química do Campus de Araraquara - IQAr.

Participou como Membro da Comissão Organizadora do Evento de Extensão Universitária “2º Setembro Amarelo”, realizado no dia 11/09/2019, promovido pelo Instituto de Química do Campus de Araraquara - IQAr.

Dedico esta conquista à minha família...

Aos meus irmãos Marcela, Mayra e Gilmar por toda ajuda  
e incentivo nos piores momentos

Ao meu tio Beto por toda ajuda, incentivo e por tudo que sua figura quase paterna  
durante minha educação e formação acadêmica

Ao meu pai Gilmar, pelo apoio e incentivo

À minha mãe Marli por todo amor, carinho e toda preocupação

Em memória do meu avô Mané que sempre se preocupou com a formação e  
educação, minha e dos meus irmãos

Em memória do meu grande amigo Gabriel

E em especial à minha avó Leonilde, da qual nem tenho palavras para agradecer o  
papel que seu amor teve para que esse trabalho fosse concluído

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”  
(Julio Verne)

## *Agradecimientos*

Primeiramente agradeço em especial minha avó Leonilde que sempre me deu todo apoio em cada etapa da minha educação e vida, e tornou possível o meu ingresso na vida acadêmica, não há palavras para descrever e agradecer o quanto todo seu amor, mesmo de longe, me ajudou.

Aos meus familiares que mesmo de longe deram total apoio e carinho durante esses anos, me aconselhando nos momentos mais difíceis do mestrado. Aos meus pais, ao meu tio Beto que sempre me apoiou e me incentivou nos estudos, me ajudando muito na permanência em Araraquara desde a Graduação. À minha irmã Marcela que não me deixou desistir da vida acadêmica e sempre me colocou pra cima e me voltou para a realidade nos momentos difíceis da pesquisa. Aos meus irmãos Gilmar e Mayra por toda amizade e acima de tudo por sempre protegerem sua irmã caçula muitas vezes como pais.

Aos amigos, que sempre estiveram presentes desde a graduação e tornaram meu dia a dia mais leve, os melhores presentes que Araraquara me trouxe. Palmito que desde o primeiro dia na graduação esteve muito presente e tenho eterno agradecimento por ter me apresentado ao atual laboratório, no qual realizei este trabalho, por me passar grande parte dos seus conhecimentos e por todo apoio emocional apesar de tantos percalços. Granola que já conheço de longas datas e me fez companhia várias manhãs vindo ao laboratório com conversas e desabafos, Cartola que sempre me fez rir sem limites e ao Arroyos que sempre teve as melhores piadas. Agradeço também a Natalia que além de excelente companheira de apartamento por muito tempo, me ajudou muito nos últimos meses.

À minha melhor amiga Jéssica, que desde a adolescência sempre me deu o maior apoio emocional e nestes anos de mestrado mesmo que de longe fez muita diferença nos momentos mais difíceis.

À Beth, que fez toda diferença na minha formação educacional e profissional. Minha experiência no kumon foi a garantia dos meus primeiros passos na vida acadêmica, minha admiração e agradecimentos não tem tamanho.

Agradeço também ao Leonardo, meu companheiro de vida e melhor amigo, por estar sempre aqui em cada choro ou riso, por me apoiar em todos os momentos e por sempre fazer dos meus finais de dia os melhores momentos. Graças a sua ajuda e de sua família, principalmente a Tânia e ao Sérgio, foi possível minha permanência em Araraquara nos últimos meses.

À minha orientadora Fernanda que me deu todo apoio e transmitiu todo seu conhecimento, me conferindo um enorme crescimento como pesquisadora, além de todo apoio, conversas e conselhos nos momentos difíceis. Principalmente pela amizade além da orientação.

Aos meus colegas do laboratório Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos e do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, que indiretamente ou diretamente me ajudaram neste trabalho. Em especial ao Rodrigo que sempre me auxiliou com muita humildade, e ao Willian que em diversos momentos me ajudou com discussões de diversos assuntos e me ajudou muito com as atividades enzimáticas.

Ao Tarcísio por todo o apoio e ajuda no laboratório desde minha iniciação científica e pela amizade que se firmou.

À Profa. Dr. Maria Célia Bertolini por conceder o laboratório para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Prof. Dr. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado e à Prof. Dr. Maria Tereza M. Novo Mansur por participarem da banca do exame geral de qualificação, com várias dicas que ajudaram a enriquecer este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ernandes e à Dr. Stela Virgílio por participarem da banca de avaliação da defesa de dissertação contribuindo muito com suas experiências, ajudando a finalizar este trabalho da melhor forma.

Ao Instituto de Química e à UNESP por toda estrutura oferecida, que tornaram esse trabalho e toda minha graduação possível.

À CAPES pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES - Código de Financiamento 001.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto de pesquisa (chamada MCTI/CNPQ/Universal 14/2014, processo 448542/2014-5)

Aos funcionários da sessão de Pós-Graduação e da Biblioteca por todo auxílio prestado durante o curso.

E por fim, mas nem um pouco menos especial, àquele que me ensinou a importância de um amigo e de ter determinação, ao meu maior exemplo de caráter e empatia, ao meu grande parceiro da Química, em memória do meu querido amigo Gabriel.

*Resumo*

A celulose é uma importante fração da biomassa vegetal e seu acesso é prejudicado pela lignina. Atualmente os métodos empregados para remover a lignina incluem pré-tratamentos físico-químicos severos, que aumentam o custo de produção dos compostos relacionados à lignina e causam impacto ambiental. A substituição destes métodos por coquetéis enzimáticos é uma alternativa para a remoção da lignina sem prejudicar o meio ambiente. Os fungos filamentosos são excelentes produtores de enzimas lignocelulolíticas. Embora *Neurospora crassa* não seja considerada industrialmente um bom organismo produtor de enzimas, estudos demonstram que este fungo degrada biomassa vegetal de maneira bastante eficiente, fato que pode ser explicado em parte, pela presença de pelo menos vinte genes codificando proteínas com atividade lignolítica em seu genoma. Este trabalho teve objetivo decifrar o secretoma de *N. crassa* na presença de lignina, bagaço de cana-de-açúcar e serragem, para identificar/descobrir proteínas com atividades lignolíticas que possam ser incorporadas em coquetéis enzimáticos com diferentes finalidades comerciais. Inicialmente, foi analisado o crescimento radial de *N. crassa* WT em meio VM sólido, contendo 10% de cana ou serragem (pré-tratados ou não com calor e/ou ácido) ou lignina (0,5 a 10%) como fontes de carbono alternativas, utilizando como controle 2% sacarose. Os micélios obtidos em lignina desenvolveram mais lentamente foram bem menores que para as outras fontes de carbono, mostrando que a lignina sozinha é prejudicial para o crescimento do fungo. A concentração inibitória mínima de lignina para o crescimento do fungo foi determinada em *race tubes* e estabelecida em 0,5%. *N. crassa* WT foi então cultivada em meio VM líquido na presença das diferentes fontes de carbono e as proteínas secretadas foram analisadas por SDS-PAGE. Bandas proteicas de diferentes MM foram detectadas em todos os tempos e condições avaliadas para todas as amostras, estando presentes em maior número na cana. A atividade lacase foi determinada pela oxidação da siringaldazina nos secretomas de cana e serragem. Para as amostras de cana, a maior atividade enzimática foi detectada após 96h de cultivo. Para as amostras de serragem, a maior atividade enzimática foi detectada após 7 dias de cultivo apenas na amostra tratada com calor/ácido. Para a lignina, não foi possível ensaiar atividade enzimática pela limitação do método colorimétrico. Os secretomas do fungo foram determinados por nanoLC-MS/MS, em amostras proteicas coletadas após 20h e 96h de cultivo na presença de 0,5% de lignina ou após 96h de cultivo em 10% de bagaço tratado com calor/ácido. Para as amostras de lignina de 20h e 96h foram identificadas, respectivamente, 77 e 113 ORFs, destacando-se várias ORFs anotadas como hipotéticas e enzimas envolvidas na degradação de hemicelulose, sugerindo que para modificar a lignina, os fungos precisam inicialmente perceber a biomassa vegetal. Para a cana, foram identificadas 412 ORFs, estando várias delas ainda anotadas como hipotéticas, ou codificando proteínas com atividades celulolíticas, hemicelulolíticas e oxidases. A amostra de serragem cultivada por 7 dias tratada com calor/ácido está tripsinizada e deverá ser submetida a nanoLC-MS/MS. Os resultados dos secretomas serão validados por qPCR e as ORFs hipotéticas ou consideradas potenciais alvos biotecnológicos deverão constituir novos objetos de estudos.

**Palavras-chave:** *N. crassa*, lignina, bagaço de cana-de-açúcar, serragem

**Financiamento:** O presente trabalho foi realizado com os apoios da CAPES - Código de Financiamento 001 (bolsa concedida) e CNPq (chamada MCTI/CNPQ/Universal 14/2014, processo 448542/2014-5)

*Abstract*

Cellulose is an important fraction of plant biomass and its access is impaired by lignin. Current methods employed to remove lignin include severe physicochemical pretreatments, which increase the costs of lignin-related products and cause environmental impacts. To switch these processes with enzymic cocktails is a good alternative to remove lignin with no hazardous substances uses. Filamentous fungi are known as excellent producers of lignocellulolytic enzymes. Despite of *Neurospora crassa* is not considered a good enzyme-producing organism to industry, there are studies showing that it efficiently degrades plant cell wall, probably due the presence of at least twenty genes encoding proteins with lignolytic activity in its genome. The aim of this work was to decipher the *N. crassa* secretome in the presence of lignin, sugarcane bagasse and hardwood, in order to identify/discover proteins with lignolytic activities, that can be further incorporated into enzymatic cocktails for commercial purposes. For this, we first determine the *N. crassa* WT strain radial growth on solid VM medium containing 10% sugarcane or hardwood (pretreated or not with heat and/or acid) or lignin (0.5 up to 10%) as solely-carbon sources, using 2% sucrose as control. For the chosen carbon sources, mycelia from lignin cultures showed the slowest development and the smallest sizes, suggesting that lignin alone is harmful for the fungal growth. The minimum inhibitory concentration of lignin for the fungal growth was determined by race tubes analysis and set as 0.5%. The patterns of the *N. crassa* proteins secreted in the presence of the alternative carbon sources were analyzed by SDS-PAGE. Protein bands showing different MM were detected at all the times and conditions evaluated for all samples, being in a higher number for sugarcane. The presence of laccase activity in sugarcane and hardwood secretome was determined by syringaldazine oxidation. For sugarcane samples, the highest enzymatic activity was detected after 96h of growth. For hardwood samples, the highest enzymatic activity was detected after 7 days of growth and only for heat/acid-treated sample. Laccase activity cannot be assayed for lignin samples, due the colorimetric method limit. The 20h and 96h-secretome of the 0.5% lignin-samples and 96h-secretome of 10% heat/acid-treated sugarcane-sample were determined by nanoLC-MS/MS. For the 20h and 96h-lignin samples, 77 and 113 ORFs were identified, respectively, highlighting some genes still annotated as hypothetical ORFs and those encoding enzymes involved in hemicellulose degradation, suggesting that to modify lignin, the fungi must first sense the plant biomass. For sugarcane, 412 genes were identified, some of them also annotated as hypothetical ORFs, and the remaining encoding proteins with cellulolytic, hemicellulolytic and oxidase activities. The 7-day heat/acid-treated hardwood sample is trypsinized and will be subjected to nanoLC-MS/MS. The secretome results will be validated by qPCR and the ORFs encoding hypothetical proteins or proteins that were considered potential biotechnology targets will be further well-characterized.

**Keywords:** *N. crassa*, lignin, sugarcane bagasse, hardwood

**Financial support:** This study was financed by CAPES - Finance Code 001 (Fellowship) and CNPq (grants, MCTI/CNPQ/Universal 14/2014, project nº. 448542/2014-5)

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                         |                                                                    |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>AAO</b>              | Álcool arílico oxidase                                             |
| <b>APS</b>              | Persulfato de amônio                                               |
| <b>C12D</b>             | Catecol 1,2- dioxigênese                                           |
| <b>CBQ</b>              | Celobiose oxiredutase                                              |
| <b>CDH</b>              | Celobiose desidrogenase                                            |
| <b>CNPEM</b>            | Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais                 |
| <b>DTT</b>              | Ditiotreitol                                                       |
| <b>EC number</b>        | <i>Enzyme commission number</i>                                    |
| <b>EDTA</b>             | Ácido etilenodiamino tetra-acético                                 |
| <b>FGSC</b>             | <i>Fungal Genetics Stock Center</i>                                |
| <b>GLO</b>              | Glioxal oxidase                                                    |
| <b>GOD</b>              | Glicose 1-oxidase                                                  |
| <b>IAA</b>              | Iodoacetamida                                                      |
| <b>kDa</b>              | Kilodalton                                                         |
| <b>LC - MS/MS</b>       | Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas          |
| <b>LNBio</b>            | Laboratório Nacional de Biociências                                |
| <b>LP</b>               | Lignina peroxidase                                                 |
| <b>MM</b>               | Massa Molecular                                                    |
| <b>MnP</b>              | Manganês peroxidase                                                |
| <b><i>N. crassa</i></b> | <i>Neurospora crassa</i>                                           |
| <b>ORF</b>              | <i>“Open Reading Frame”</i>                                        |
| <b>P2O</b>              | Pirnose 2-oxidase                                                  |
| <b>P34D</b>             | Protocatechuate 3,4-dioxigenase                                    |
| <b>PCR</b>              | <i>“Polimerase Chain Reaction”</i>                                 |
| <b>PMSF</b>             | Fluoreto de fenilmetilsulfonil                                     |
| <b>Q.s.p</b>            | Quantidade suficiente para                                         |
| <b>qPCR</b>             | PCR quantitativo em tempo real                                     |
| <b>Rpm</b>              | Rotações por minuto                                                |
| <b>SDS</b>              | dodecil sulfato de sódio                                           |
| <b>SDS-PAGE</b>         | <i>“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”</i> |
| <b>TBH12D</b>           | 1,2,4-trihidroxibenzeno 1,2-dioxigenase                            |
| <b>TCA</b>              | Ácido tricloroacético                                              |

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| <b>TFA</b>  | Ácido trifluoroacético              |
| <b>TLCK</b> | Tosil fenilalanil clorometil cetona |
| <b>Tris</b> | Hidroximetilaminometano             |
| <b>VM</b>   | Meio mínimo de Vogel                |
| <b>VP</b>   | Peroxidases versáteis               |
| <b>WT</b>   | <i>"Wild Type"</i>                  |

## SUMÁRIO

|          |                                                                              |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                      | <b>22</b> |
| 1.1      | COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL .....                                         | 22        |
| 1.1.1    | <b>Celulose.....</b>                                                         | <b>24</b> |
| 1.1.2    | <b>Hemicelulose .....</b>                                                    | <b>25</b> |
| 1.1.3    | <b>Lignina.....</b>                                                          | <b>26</b> |
| 1.2      | ENZIMAS LIGNOLÍTICAS .....                                                   | 28        |
| 1.3      | USO DAS ENZIMAS LIGNOLÍTICAS.....                                            | 29        |
| 1.4      | FUNGOS COM CAPACIDADE DE DEGRADAR OU MODIFICAR A LIGNINA.....                | 33        |
| 1.5      | NEUROSPORA CRASSA .....                                                      | 34        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                        | <b>39</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS .....</b>                                                       | <b>41</b> |
| 3.1      | LINHAGENS DE MICRORGANISMOS.....                                             | 41        |
| 3.2      | SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS .....                                            | 41        |
| 3.3      | MEIOS DE CULTURA .....                                                       | 41        |
| 3.4      | SOLUÇÕES E TAMPÕES .....                                                     | 42        |
| 3.4.1    | <i>Para o preparo das amostras de proteínas .....</i>                        | <i>42</i> |
| 3.4.2    | <i>Para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) ..</i> | <i>42</i> |
| 3.4.3    | <i>Para determinação de açúcares redutores pelo método de Benedict .....</i> | <i>43</i> |
| 3.4.4    | <i>Para determinação de proteínas totais.....</i>                            | <i>44</i> |
| 3.4.5    | <i>Para determinação das atividades enzimáticas.....</i>                     | <i>45</i> |
| 3.4.6    | <i>Para digestão triptica das amostras proteicas em solução .....</i>        | <i>45</i> |
| 3.5      | REAGENTES.....                                                               | 45        |
| <b>4</b> | <b>MÉTODOS .....</b>                                                         | <b>46</b> |
| 4.1      | MANUTENÇÃO DA LINHAGEM SELVAGEM DE <i>N. CRASSA</i> E PROPAGAÇÃO .....       | 46        |
| 4.1.1    | <i>Obtenção de conídios.....</i>                                             | <i>46</i> |
| 4.2      | TRATAMENTOS DAS BIOMASSAS VEGETAIS.....                                      | 46        |
| 4.3      | ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....                                                   | 47        |
| 4.3.1    | <i>Análise do crescimento radial das colônias.....</i>                       | <i>47</i> |
| 4.3.2    | <i>Determinação da extensão apical das hifas basais em race tubes .....</i>  | <i>47</i> |

|              |                                                                                                                                                        |            |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.3.3</b> | <i>Produção de hifas aéreas e conídios</i>                                                                                                             | 48         |
| 4.4          | PADRONIZAÇÃO CULTURAS LÍQUIDAS E OBTENÇÃO DO SECRETOMAS                                                                                                | 48         |
| <b>4.4.1</b> | <i>Obtenção das proteínas secretadas</i>                                                                                                               | 49         |
| 4.5          | TESTE DE BENEDICT                                                                                                                                      | 49         |
| 4.6          | DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS                                                                                                                       | 50         |
| <b>4.6.1</b> | <i>Precipitação das proteínas totais com ácido tricloroacético (TCA) e acetona</i>                                                                     | 50         |
| <b>4.6.2</b> | <i>Método de Hartree</i>                                                                                                                               | 51         |
| <b>4.6.3</b> | <i>Método de Bradford</i>                                                                                                                              | 51         |
| 4.7          | ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS                                                                                                                     | 51         |
| <b>4.7.1</b> | <i>Atividade lacase</i>                                                                                                                                | 51         |
| <b>4.7.2</b> | <i>Ensaio qualitativo de oxidação da lignina</i>                                                                                                       | 52         |
| 4.8          | ANÁLISE DO SECRETOMA                                                                                                                                   | 53         |
| <b>4.8.1</b> | <i>Análise das proteínas secretadas por SDS-PAGE e 2D-PAGE</i>                                                                                         | 53         |
| <b>4.8.2</b> | <i>Digestão trípica das amostras proteicas em solução</i>                                                                                              | 54         |
| <b>4.8.3</b> | <i>Sequenciamento dos peptídeos trípticos por LC-MS/MS</i>                                                                                             | 55         |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                                          | <b>58</b>  |
| 5.1          | <i>N. CRASSA É CAPAZ DE USAR LIGNINA PROVENIENTE DE HERBÁCEAS E MADEIRA COMO FONTE ALTERNATIVA DE CARBONO</i>                                          | 58         |
| 5.2          | <i>N. CRASSA SECRETA PROTEÍNAS NA PRESENÇA DE SERRAGEM, BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E LIGNINA PURIFICADA</i>                                              | 76         |
| 5.3          | <i>ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE N. CRASSA EXPRESSAS NAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO</i>                                                                   | 81         |
| 5.4          | <i>N. CRASSA APRESENTA ATIVIDADE LACASE ESPECÍFICA SIGNIFICATIVA NA PRESENÇA DE LIGNOCELULOSE</i>                                                      | 84         |
| 5.5          | <i>N. CRASSA SECRETA PROTEÍNAS COM PROVÁVEIS ATIVIDADES LIGNOLÍTICAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS E DE LIGNINA PURIFICADA</i> | 89         |
| <b>6</b>     | <b>PRINCIPAIS CONCLUSÕES</b>                                                                                                                           | <b>99</b>  |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                                                                     | <b>101</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Ilustração esquemática das estruturas e dos principais biopolímeros da parede celular vegetal .....                                                                                                    | 23 |
| <b>Figura 2</b> – Diagrama esquemático da degradação de lignina por basidiomicetos da podridão branca: principais passos da degradação e enzimas envolvidas. ....                                                        | 30 |
| <b>Figura 3</b> – Ciclo de vida do fungo <i>Neurospora crassa</i> .....                                                                                                                                                  | 35 |
| <b>Figura 4</b> – Compostos aromáticos provenientes da Nafta e Lignina .....                                                                                                                                             | 60 |
| <b>Figura 5</b> – Presença de açúcares redutores nos substratos usados como fontes de carbono alternativas para o cultivo de <i>N. crassa</i> .....                                                                      | 63 |
| <b>Figura 6</b> – Desenvolvimento de hifas aéreas.....                                                                                                                                                                   | 65 |
| <b>Figura 7</b> – Diâmetro das colônias de <i>N. crassa</i> na presença de diferentes fontes de carbono .....                                                                                                            | 67 |
| <b>Figura 8</b> – Crescimento radial das colônias de <i>N. crassa</i> na presença de bagaço de cana-de-açúcar e serragem. ....                                                                                           | 68 |
| <b>Figura 9</b> – Extremidades das hifas após o cultivo do fungo em diferentes fontes de carbono. ....                                                                                                                   | 70 |
| <b>Figura 10</b> – A presença de lignina no meio de cultivo interfere no crescimento de <i>N. crassa</i> .....                                                                                                           | 72 |
| <b>Figura 11</b> – Extremidades das hifas após o cultivo do fungo em diferentes fontes de carbono .....                                                                                                                  | 74 |
| <b>Figura 12</b> – Extensão apical das hifas basais em <i>race tubes</i> . ....                                                                                                                                          | 77 |
| <b>Figura 13</b> – Proteínas secretadas pelo fungo <i>N. crassa</i> em diferentes substratos lignocelulolíticos. ....                                                                                                    | 78 |
| <b>Figura 14</b> – Proteínas secretadas pela <i>N. crassa</i> na presença de lignina purificada em diferentes concentrações .....                                                                                        | 80 |
| <b>Figura 15</b> – Eletroforese bidimensional das proteínas secretadas por <i>N. crassa</i> no período de sete dias, na presença de bagaço de cana de açúcar e serragem. ....                                            | 82 |
| <b>Figura 16</b> – Eletroforese bidimensional das proteínas secretadas por <i>N. crassa</i> no período de 14 dias (A e B) e quatro dias (C e D) na presença de bagaço de cana de açúcar e lignina, respectivamente. .... | 83 |
| <b>Figura 17</b> – Teste qualitativo para a detecção de atividades lignolíticas em cultura de <i>N. crassa</i> .....                                                                                                     | 85 |
| <b>Figura 18</b> – Atividade Lacase. ....                                                                                                                                                                                | 87 |

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19</b> – Proteínas anotadas identificadas nos secretomas lignocelulósicos ..... | 90 |
| <b>Figura 20</b> – Proteínas compartilhadas nas diferentes condições de cultivo .....     | 92 |
| <b>Figura 21</b> – Processos Biológicos. ....                                             | 94 |
| <b>Figura 22</b> – Componente Celular.....                                                | 95 |
| <b>Figura 23</b> – Função Molecular .....                                                 | 95 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – Composição da lignina e de materiais lignocelulósicos .....                              | 27 |
| <b>Tabela 2</b> – Crescimento de <i>N. crassa</i> na presença de bagaço de cana-de-açúcar e serragem. .... | 69 |
| <b>Tabela 3</b> – Crescimento de <i>N. crassa</i> na presença de diferentes concentrações de lignina. .... | 73 |

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Composição da Biomassa Vegetal

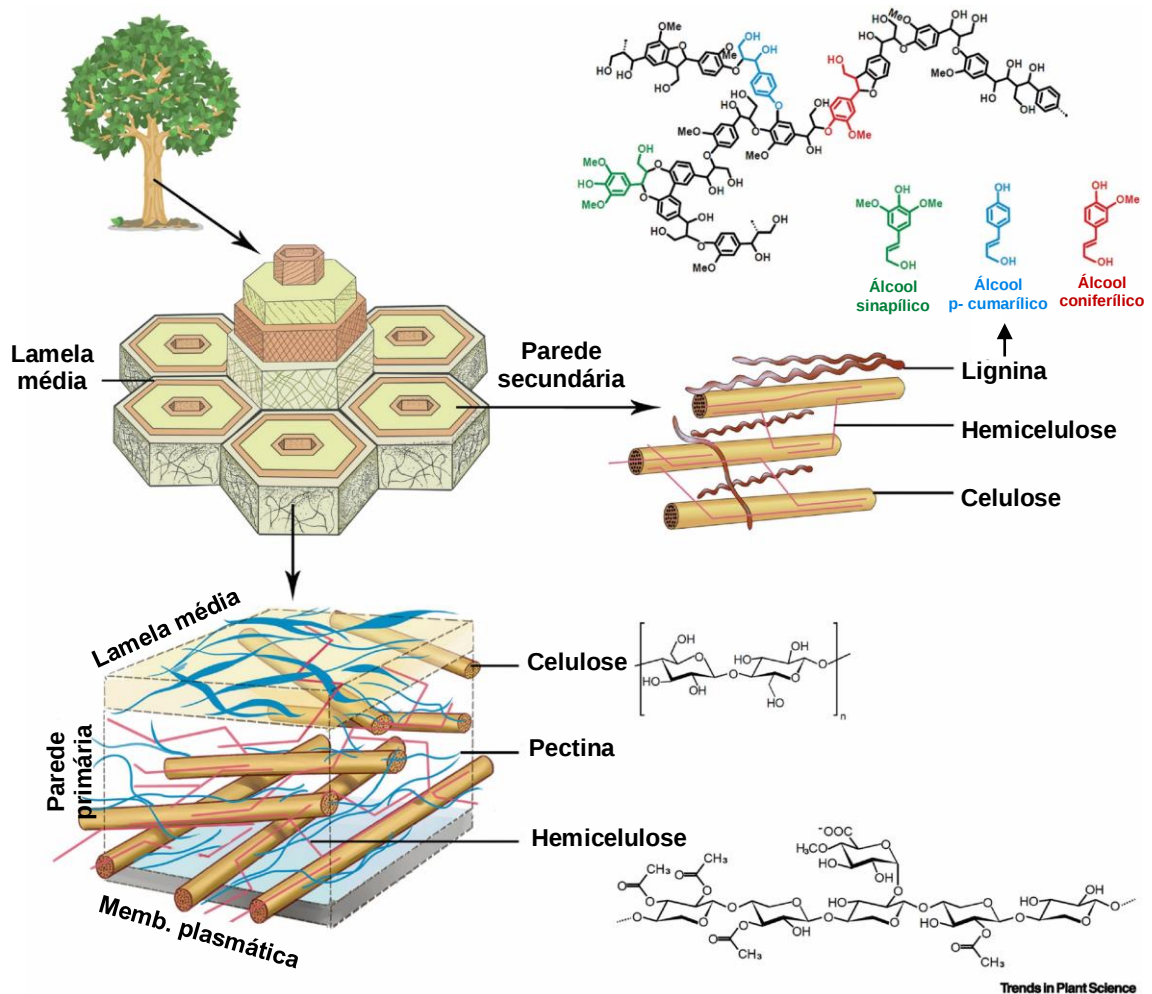
As paredes celulares das plantas possuem papéis biológicos essenciais durante o crescimento e desenvolvimento, incluindo regulação da forma e expansão celular, controle da coesão tecidual, troca iônica e defesa contra microrganismos patógenos. A maior parte do carbono fixado nas plantas é incorporada nos polímeros da parede celular, tornando a parede celular a fonte mais abundante de biomassa terrestre e energia renovável. (SOMERVILLE *et al.* 2014; BURTON *et al.*, 2010).

Uma célula vegetal apresenta dois tipos principais de paredes, a primária e a secundária, e as células encontram-se anexadas umas às outras através da lamela média (COSGROVE, 2005) (Figura 1). Quimicamente, a parede celular vegetal é composta por polissacarídeos de alta massa molecular, tais como a celulose, as hemiceluloses (xilanas, glucuronoxilanas, xiloglucanas, arabinoxilanas, glucanas de ligação mista ou glucomananas) e pectina. É composta e também por um polímero polifenólico, a lignina, além de pequenas quantidades de proteínas estruturais (BURTON *et al.*, 2010)

As moléculas de celulose formam o componente fibroso das paredes celulares e são o biopolímero mais abundante na Terra. Suas fibras estão integradas a conjuntos de polissacarídeos solúveis complexos denominados hemiceluloses e pectinas (SLABAUGH *et al.*, 2014). Já a lignina apresenta natureza não carboidrato e é essencial para a integridade estrutural da parede celular (ZHAO; DIXON, 2011). Todos estes polímeros complexos e flexíveis que compõem a parede celular têm sido utilizados em diversas atividades humanas, tais como a indústria de alimentos, fibras têxteis, papel, madeira, enzimologia industrial e produção de biocombustíveis (BURTON; FINCHER, 2014)

As arquiteturas complexas e heterogêneas das paredes celulares são específicas de cada espécie e do tipo de célula, e estão fortemente associadas às suas funções celulares. As paredes secundárias especialmente são compostas em média de celulose (40% a 80%), hemiceluloses (10% a 40%), ligninas (5% a 25%) e proteínas (KNOX, 2008).

**Figura 1** – Ilustração esquemática das estruturas e dos principais biopolímeros da parede celular vegetal



Estruturas da parede celular mostrando o meio lamela, a parede primária e a parede secundária e a organização das microfibrilas de celulose. A lamela média é uma camada rica em pectina que une as paredes primárias das células adjacentes. Na parede primária, as microfibrilas de celulose são reticuladas em uma rede complexa por moléculas de hemicelulose, que são ligadas à superfície das microfibrilas por ligações de hidrogênio. As pectinas são polissacarídeos altamente hidrofílicos envolvidos na rede celulose-hemicelulose. A celulose é o principal componente das paredes celulares das plantas e é composta por monômeros repetidos de glicose, ligados de ponta a ponta, em microfibrilas. A estrutura da lignina representa monômeros característicos, que são definidos como unidades de p-hidroxifenil, unidades de seringil e unidades de guaiaquil. A hemicelulose é representada pela xilana, a principal macromolécula da hemicelulose. Os componentes típicos da parede celular vegetal secundária são celulose, hemicelulose e lignina.

**FONTE:** Adaptado de ZHAO *et al*, 2019

### 1.1.1 Celulose

A celulose, um polissacarídeo de cadeia linear, insolúvel e altamente resistente à hidrólise, é o componente mais abundante na célula vegetal. A molécula de celulose é constituída por milhares de unidades de glicose unidas através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, orientadas através de uma repetição alternada, a uma distância de 180° uma unidade da outra (PRASAD *et al.*, 2019), podendo variar em tamanho de centenas até mais 10.000 unidades de glicose por cadeia (HORN *et al.*, 2012). A estrutura do polímero de celulose apresenta regiões cristalinas altamente compactas e regiões amorfas (HORN *et al.*, 2012), sendo que a parte cristalina é mais resistente a quebra devido à dificuldade de acesso que oferece às enzimas celulolíticas e pequenas moléculas, uma consequência de sua configuração compacta (ARANTES & SADDLER, 2010). Em contrapartida, a região amorfa da celulose pode ser mais facilmente hidrolisada, sendo convertida em monômeros de glicose pela ação de enzimas celulasas (LEE *et al.*, 1983; HALL *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2008). A celulose pode ainda ser convertida em etanol, butanol, ácido láctico ou ácido succínico através da sua quebra até monômeros de glicose pela ação de ácidos fortes, altas temperaturas (acima de 300°C) ou por hidrólise enzimática, seguida de fermentação (ADSUL *et al.*, 2011).

As principais enzimas produzidas por fungos envolvidas na degradação da celulose são: 1) endo-1,4- $\beta$ -glucanases, pertencentes a família das glicosil hidrolases, responsáveis por clivar ligações internas nas cadeias de celulose; 2) exo-1,4- $\beta$ -glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis por clivar as extremidades redutoras ou não das cadeias de celulose; 3)  $\beta$ -glucosidases que hidrolisam a celobiose em duas moléculas de glicose e 4) polissacarídeo monooxigenases, pertencentes a uma nova classe de enzimas dependentes de cobre responsáveis por catalisar a clivagem oxidativa da celulose na presença de um doador externo de elétrons (CANTAREL *et al.*, 2009; VAN DEN BRIK; VRIES, 2011; BEESON *et al.*, 2012).

Em condições indutoras de celulasas, *Trichoderma reesei* tem 80% das proteínas totais secretadas representadas por duas celobio-hidrolases (Cel7A/CBH1 e Cel6A/CBH2). E em *N. crassa*, quatro celulasas (CBH-1, GH6-2, GH5-1, e GH3-4) compõem 65% do secretoma, também em condições indutoras (NUMMI *et al.*, 1983; PHILLIPS *et al.*, 1991)

### 1.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são polímeros de natureza carboidrato que estão presentes na parede celular primária e secundária das plantas (EBRINGEROV *et al.*, 2005; SORIEUL *et al.*, 2016). A composição química das hemiceluloses varia de acordo com as diferentes espécies de plantas. Na sua maioria, estes polissacarídeos são heteropolímeros apresentando cadeias ramificadas, constituídas principalmente por açúcares simples dos tipos pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose), e por açúcares complexos (ácido glucurônico, galacturônico e metilgalacturônico) (SAHA, 2003; ADSUL *et al.*, 2011).

Diferente da celulose, sua quebra não gera apenas glicose e sim uma mistura de açúcares (em sua maioria pentoses) que a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* não é capaz de fermentar (BANERJEE *et al.*, 2010; HORN *et al.*, 2012). Devido à variedade de açúcares e diferentes tipos de ligações químicas presentes em uma mesma cadeia, são necessários diferentes tipos de enzimas para sua completa hidrólise (ALVAREZ *et al.*, 2016). No entanto, sua hidrólise ainda é mais fácil que a degradação da celulose (AGGER *et al.*, 2010).

As principais enzimas responsáveis pela degradação das hemiceluloses são: 1) endo- $\beta$ -1,4 xilanases; 2)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases; 3)  $\beta$ -xilosidases; 4) acetilxilana estereases; e 5) estereases do ácido ferúlico (GLASS *et al.*, 2013).

Em *A. niger* e *T. reesei*, genes de hemicelulase e enzimas envolvidas na utilização da xilose são induzidos na presença de xilose (ANDERSEN *et al.*, 2008; DE VRIES *et al.*, 1999; MACH-AIGNER *et al.*, 2010). Também em *T. reesei*, xilanases podem ser induzidas na presença de L-arabitol, um metabólito presente na cascata de degradação da L-arabinose (MACH-AIGNER *et al.*, 2011). Ao contrário de *A. niger* e *T. reesei*, em *N. crassa* a presença de xilose não induz a maioria dos genes que codificam hemicelulases, e sim na presença de xilana, induzindo aproximadamente 350 genes, incluindo muitas enzimas hemicelulase descritas acima, bem como genes codificando proteínas de função bioquímica desconhecida (isto é, proteínas hipotéticas) (SUN *et al.*, 2012).

### 1.1.3 Lignina

Diferente da celulose e hemiceluloses que são polímeros carboidratos, a lignina é um heteropolímero aromático de alto peso molecular formado pela polimerização dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, os quais correspondem, respectivamente, ao monômeros de *p*-hidrofenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) na lignina polimérica. (FAIX, 1991; WONG, 2009). A lignina natural é incolor ou amarelo pálido, mas no tratamento com ácido ou alcalino, sua cor muda para marrom ou marrom escuro (AGRAWAL; KAUSHIK; BISWAS, 2014).

Dentre os componentes da biomassa vegetal, a lignina corresponde a aproximadamente 15-30% do seu peso seco e responde pelo esqueleto das plantas, unindo as fibras de celulose para endurecer, conferir rigidez, impermeabilidade e reforçar a parede primária e secundária das células vegetais. Além da sua função estrutural, a lignina também desempenha função protetora, formando uma espécie de barreira contra a ação de enzimas microbianas na degradação da parede vegetal. Este polímero pode ser encontrado em todas as plantas vascularizadas e tanto a porcentagem da própria lignina quanto dos monômeros presente em sua estrutura química, podem variar entre as espécies (BOERJAN *et al.*, 2003; LEONOWICZ *et al.*, 1999). Nas folhas, por exemplo, a porcentagem de lignina é zero, já em madeiras de eucalipto e bagaço de cana-de-açúcar a concentração é de 20 e 21% respectivamente (tabela 1) (PRASAD, 2019).

A lignina pode ser obtida a partir de diversas fontes renováveis como o bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, casca de nozes, dentre diversos tipos de madeira, sendo classificada em três grupos principais, dependendo da sua origem: 1) a lignina de madeira macia, também conhecida como guaiacil lignina e é formada pelo álcool coniferílico e pequenas quantidades de unidades derivadas dos álcoois sinapílico e *p*-cumarílico; 2) lignina de madeira dura, também conhecidas como guaiacil-siringil lignina, contendo praticamente partes iguais de álcool coniferílico e álcool sinapílico (metade de cada) ; e 3) a lignina de gramínea, que possui maior quantidade de álcool *p*-cumarílico em relação as outras classificações (tabela 1A) (UPTON; KASKO, 2015).

**Tabela 1** – Composição da lignina e de materiais lignocelulósicos

| <b>A</b>                    |  | Álcool coniferílico | Álcool sinapílico | Álcool p-cumarílico |
|-----------------------------|--|---------------------|-------------------|---------------------|
| Lignina de madeira macia    |  | 95%                 | 1%                | 4%                  |
| Lignina de madeira dura (*) |  | 50%                 | 50%               | 2%                  |
| Lignina de gramínea         |  | 70%                 | 25%               | 30%                 |

| <b>B</b>                     |                 | Lignina (%) | Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Referências                 |
|------------------------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|-----------------------------|
| Madeira macia (gimnospermas) | folhas          | 0           | 15 - 20      | 80 - 85          | HOWARD <i>et al.</i> , 2003 |
| Madeira dura (angiospermas)  | álamos          | 16          | 52           | 27               | ISIKGOR; BECER, 2015        |
|                              | eucalipto       | 21          | 54           | 18               | ISIKGOR; BECER, 2015        |
|                              | carvalho        | 24          | 40           | 36               | ISIKGOR; BECER, 2015        |
| Gramíneas (angiospermas)     | grama           | 10 - 30     | 25 - 40      | 25 - 50          | MALHERBE; CLOETE, 2002      |
| Resíduos Lignocelulósicos    | bagaço de cana  | 20          | 42           | 25               | KIM; DAY, 2011              |
|                              | sorgo doce      | 21          | 45           | 27               | KIM; DAY, 2011              |
|                              | espiga de milho | 15          | 45           | 35               | HOWARD <i>et al.</i> , 2003 |
|                              | palha de arroz  | 18          | 32,1         | 24               | HOWARD <i>et al.</i> , 2003 |
|                              | jornal          | 18 - 30     | 40 - 55      | 25 - 40          | HOWARD <i>et al.</i> , 2003 |
|                              | casca de nozes  | 30 - 40     | 25 - 30      | 25 - 30          | PRASAD <i>et al.</i> , 2007 |
|                              | casca de cevada | 16          | 34           | 36               | ISIKGOR; BECER, 2015        |
|                              | palha de trigo  | 15 - 20     | 33 - 40      | 20 - 25          | PRASAD <i>et al.</i> , 2007 |
|                              | palha de milho  | 7 - 18      | 35 - 40      | 17 - 35          | BYADGI; KALBURGI, 2016      |

(A) Porcentagem dos monômeros presentes em média nas diferentes ligninas. (\*) A maioria das ligninas de madeira é composta de quantidades aproximadamente iguais de álcool coniferílico e sinapílico, mas são conhecidas algumas exceções. (B) Porcentagem de Lignina e dos outros principais polímeros presentes em diferentes biomassas vegetais.

**FONTE:** (A) Adaptado de PRASAD *et al.*, 2019; (B) Adaptado de BRUNOW, 2010

## 1.2 Enzimas lignolíticas

A natureza complexa da lignina exige que sua desconstrução ocorra pela ação conjunta de várias oxidases microbianas (Figura 2). As oxidases fúngicas são as principais enzimas responsáveis por essa desconstrução e podem ser divididas em dois grupos, as heme-peroxidases e as fenol oxidases dependentes de cobre. O grupo das heme-peroxidases é representado pelas lignina peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14), manganês-peroxidases (MnP; EC 1.11.1.13) e peroxidases versáteis (VP; EC 1.11.1.16), enquanto que as fenol oxidases são representadas pelas lacases (EC 1.10.3.2) (LEONOWICZ *et al.*, 2001; GUERRIERO *et al.*, 2016). As dioxigenases, como a protocatechuate 3,4-dioxigenase (P34D; EC1.13.11.3), 1,2,4-trihidroxibenzeno 1,2-dioxigenase (TBH12D) e catecol 1,2- dioxigênese (C12D; EC 1.13.11.1) também estão diretamente envolvidas nessa desconstrução. Essas enzimas já citadas estão envolvidas em ataque direto da madeira (LEONOWICZ, 1999).

Um segundo grupo de enzimas inclui superóxido dismutase (SOD; EC1.15.1.1) e glioxal oxidase (GLO; EC 1.2.3.5). Essas enzimas cooperam com as enzimas do primeiro grupo, mas nunca atacam a madeira por conta própria. O terceiro grupo consiste em glicose 1-oxidase (GOD EC 1.1.3.4), álcool arílico oxidases (AAO; EC 1.1.3.7), álcool verátrico oxidase (VAO), piranose 2-oxidase (P2O; EC 1.1.3.10), celobiose oxidoreductase (CBQ; EC 1.1.5.1), celobiose desidrogenase (CDH; EC 1.1.99.18) e a celobiose/quinona oxireductase (EC 1.1.5.1) que auxiliam na degradação da lignina por reduzir os radicais metoxi gerados pela LiP, MnP e lacase e gerar o peróxido de hidrogênio necessário para as atividades peroxidases, como no caso da glioxal oxidase, da glicose oxidase e da aril-álcool oxidase (ANDER; MARZULLO, 1997). Estas são as chamadas enzimas do tipo feedback, porque desempenham um papel fundamental na combinação de cadeias metabólicas durante a degradação da madeira. Todas essas enzimas podem funcionar separadamente ou em cooperação entre si e o amadurecimento extracelular dessas proteínas pode ser alcançado pela participação de enzimas proteolíticas secretadas simultaneamente (STASZCZAK *et al.*, 1996).

Uma nova família de peroxidases descorantes (DyP; *dye peroxidase decolourising*) foi identificada tanto em fungos quanto em bactérias (SUGANO, 2009)

e encontra-se relacionada com a degradação de corantes artificiais e compostos lignínicos  $\beta$ -O-4 não fenólicos (LIERS *et al.*, 2010).

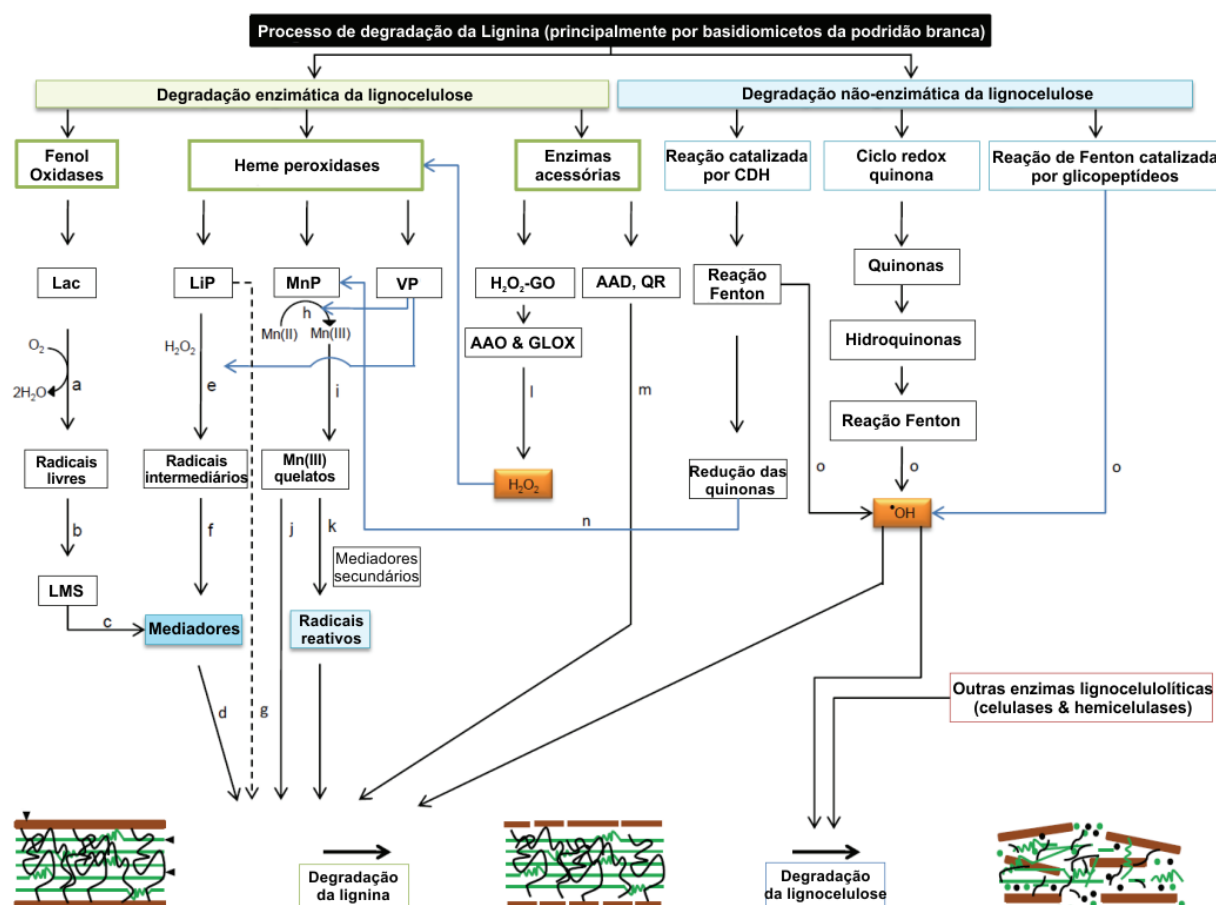
### 1.3 Uso das enzimas lignolíticas

Grande quantidade da biomassa de lignocelulose é gerada como subproduto em diversas indústrias, sendo convencionalmente usada para geração de energia, na alimentação animal, ou como *mulching* (técnica de cobertura do solo utilizada para proteger e evitar crescimento de ervas daninhas) em áreas de plantação. Parte da biomassa lignocelulósica remanescente é queimada ou deixada para se decompor naturalmente, o que levará anos. No entanto, a maior parte da biomassa lignocelulósica gerada pelos setores agrícolas não é totalmente utilizada e descartada sistematicamente, sendo assim, essa biomassa remanescente pode ser utilizada para obter produtos de maior valor agregados como biocombustíveis (MASRAN *et al.*, 2016).

A separação da lignina da celulose é denominada “deslignificação” e é um dos processos complexos da indústria de celulose e papel. Os produtos de lignina resultantes dos processos de deslignificação podem variar amplamente nas propriedades, dependendo de qual processo de deslignificação foi empregado e em que estágio de deslignificação a lignina foi isolada (BRUNOW, 2010)

A deslignificação de substratos lignocelulósicos mostrou ser importante para a produção de bioetanol de segunda geração a partir de diferentes biomassas como fonte alternativa para os combustíveis fósseis, já que a lignina ainda é uma barreira ao acesso da celulose. Assim, a liberação dos dois açúcares fermentáveis a partir dos carboidratos estruturais requer a desconstrução da lignina através de diferentes pré-tratamentos. Esse pré-tratamento pode ser físico (moagem da biomassa, aplicação de radiação), químico (pré-tratamento hidrotérmico, pré-tratamento em meio ácido ou básico), biológico (micro-organismos decompositores da madeira) ou a combinação desses (GALBE; ZACCHI, 2002). O tratamento biológico usando microrganismos lignolíticos (Figura 2) tem sido apontado como uma das maneiras mais vantajosas de substituir os tratamentos físico-químicos e remover moléculas inibitórias do processo de fermentação dos açúcares, pois fornecem condições de reação mais amenas e favoráveis ao meio ambiente, maior rendimento de hemiceluloses e celulose, liberação de poucos metabólitos indesejáveis para a fermentação e menor demanda

**Figura 2** – Diagrama esquemático da degradação de lignina por basidiomicetos da podridão branca: principais passos da degradação e enzimas envolvidas.



Lac: lacase; LMS: sistema mediador da lacase; LiP: lignina peroxidase; MnP: manganês peroxidase; VP: peroxidase versátil;  $H_2O_2$ -GO: oxidases geradoras de  $H_2O_2$ ; AAO: aril-álcool oxidase; GLOX: glicoxal oxidase;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio; AAD: aril-álcool desidrogenases; QR: quinona redutases e  $\cdot OH$ : radicais hidroxil livres.

**FONTE:** Adaptado de DASHTBAN *et al.*, 2010.

de energia (LEE, 1997).

Sendo assim, as enzimas lignolíticas tem um grande potencial de aplicações industriais e biotecnológicas. Seu uso na remoção da lignina gera condições ambientais muito mais favoráveis para a produção do bioetanol do que os pré-tratamentos químicos e térmicos, como o cozimento *Kraft* (WAN; LI, 2012). As hemeperoxidases e as lacases podem ser usadas tanto no processo de deslignificação quanto no branqueamento da polpa da madeira, substituindo o tradicional processamento da polpa que utiliza cloro e prejudica o meio ambiente. As DyP peroxidases microbianas podem ser usadas na degradação de corantes artificiais da indústria têxtil, devido sua alta capacidade de degradar compostos antraquinônicos (SUGANO, 2009). As lacases tem atraído muito a atenção devido ao seu uso favorável ao meio ambiente, pois além da ampla aplicação nas indústrias têxtil, de papel e de alimentos (CANAS, 2010), usam apenas oxigênio como doador de elétrons e produzem água como produto final (RIVA, 2006).

Na indústria de papel, a deslignificação é importante para a liberação da polpa de celulose e branqueamento, que ainda é realizado por processos químicos e/ou mecânicos. Os processos mecânicos liberam apenas as hemiceluloses, produzindo uma polpa de baixa qualidade, com fibras curtas e amareladas. Já o cozimento *Kraft* usa hidróxido e hidrossulfeto de sódio, que dissolvem a lignina e liberam uma polpa de celulose de melhor qualidade, mas promove a formação do licor negro e outros compostos químicos altamente poluentes, que são liberados nos efluentes. O uso de microrganismos lignolíticos antes do processamento químico e/ou mecânico torna a polpa da madeira mais macia, melhorando não só a resistência do papel como também reduzindo a liberação de substâncias tóxicas e o consumo de energia pelas caldeiras no processo de obtenção da polpa (MENDONÇA *et al.*, 2008). As lacases de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pleurotus chrisosporium*, por exemplo, embora degradem parcialmente a lignina, apresentam a vantagem da produção de uma polpa clara (PÉREZ *et al.*, 2002).

As peroxidases microbianas também podem ser usadas no tratamento de efluentes de destilarias. A aparência marrom escura das águas residuais das destilarias é devida, sobretudo, a presença de melanoidinas (reação de *Maillard*) e de compostos fenólicos provenientes das matérias-primas, caramelização de açúcares e produção de furfurais a partir da hidrólise ácida (KORT, 1979).

A detoxificação e descoloração destes efluentes é feita com lacases e peroxidases de bactérias, leveduras e fungos (RAJASUNDARI; MURUGESAN, 2011), como o *Coriolus versicolor* (WATANABE *et al.*, 1982) e o *P. chrisosporium* (DAHIYA *et al.*, 2001). Além da descoloração, estas enzimas ainda podem polimerizar ou copolimerizar estes contaminantes com outros substratos não tóxicos, facilitando sua remoção por sedimentação, adsorção ou filtração (GIANFREDA *et al.*, 2006).

O uso das enzimas lignolíticas na degradação de herbicidas também tem sido alvo de estudos. A LiP e MnP do fungo *P. chrisosporium* mostraram-se capazes de degradar isoproturon tanto *in vitro* e quanto *in vivo* (DEL PILAR CASTILLO *et al.*, 2001) enquanto que apenas a MnP é capaz de oxidar o benzaton na presença de  $Mn^{+2}$  e Tween-80 (CASTILLO *et al.*, 2000). Já a MnP de *Nematoloma frowardii* e a lacase de *Trametes versicolor* mostraram-se eficientes na degradação do glifosato (PIZZUL *et al.*, 2009). Estes dados mostram claramente a potencial aplicação das enzimas lignolíticas produzidas por fungos no tratamento do solo e das águas de drenagem contaminadas com herbicidas.

Na indústria têxtil, a água é usada como meio de remover as impurezas da aplicação de corantes e agentes finalizadores. Isso gera uma grande poluição dos efluentes destas indústrias. Estimativas indicam que estes efluentes podem conter mais de 2.000 diferentes produtos químicos, incluindo corantes, auxiliares de tingimento, contaminantes residuais provenientes das fibras e entre outros (ANASTASI *et al.*, 2010). Todos esses compostos são danosos ao meio ambiente, principalmente os corantes que são recalcitrantes e altamente solúveis em água (RAJAGANESH *et al.*, 2014). A produção mundial de corantes no setor têxtil é de aproximadamente 800.000 ton/ano. Por meio dos efluentes gerados, 10 a 15% desta produção é descartada no meio ambiente. Além das implicações ambientais, outra preocupação em relação a liberação indiscriminada destes rejeitos têxteis está relacionada com as suas características mutagênicas e tóxicas tanto aos organismos aquáticos como aos seres humanos (AKDOGAN; TOPUZ; URHAN, 2014). O uso da LiP e MnP de *Pleurotus chrisosporium* na degradação destes corantes artificiais tem mostrado uma alta capacidade de degradar grande variedade dos poluentes aromáticos (MEHTA, 2012). Além disso, alguns corantes artificiais, embora não sejam totalmente degradados pelas lacases, são oxidados pelas mesmas dando início à sua degradação (SCHLIEPHAKE *et al.*, 2000).

#### 1.4 Fungos com capacidade de degradar ou modificar a lignina

Devido a sua estrutura amorfa complexa (Figura 1), a lignina é bastante resistente à degradação pela maioria dos organismos e não pode ser hidrolisada como os outros componentes da parede celular vegetal. Sua desconstrução tem sido extensivamente estudada nos organismos que colonizam madeiras em decomposição, como os basidiomicetos (BOYLE *et al.*, 1992; LEONOWICZ, 1999).

Os fungos colonizadores da madeira podem ser divididos em três grupos conforme o tipo de degradação que causam na madeira: fungos de degradação branca, marrom e macia. Existem diversos fungos capazes de degradar madeira, e em sua maioria são Basidiomicetos, os mesmos são responsáveis pela degradação branca e são considerados os mais eficientes organismos degradadores de lignina devido à grande quantidade de oxidases lignolíticas que são capazes de secretar (MARTINEZ *et al.*, 2004; RUTTIMANN-JOHNSON *et al.*, 1993; WAN; LI, 2012). A degradação realizada por estes basidiomicetos na parede celular vegetal, ocorre praticamente só na lignina, sendo capazes de mineralizar a mesma, eventualmente até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (ORTH *et al.*, 1993; HATAKKA, 1994; TUOR *et al.*, 1995; BLANCHETTE *et al.*, 1994).

Mesmo a maioria dos fungos responsáveis pela degradação marrom também serem pertencentes ao grupo dos basidiomicetos, ao contrário dos fungos da degradação branca, os responsáveis pela degradação marrom mantêm a lignina praticamente intacta. Quebrando preferencialmente os polissacarídeos presentes na madeira, dando um aspecto marrom e quebradiço a madeira degradada (BLANCHETTE, 1991; RAYNER; BODDY, 1988). Apesar desses organismos não degradarem efetivamente a lignina, eles são capazes de realizar algumas modificações (JIN *et al.*, 1990)

Os fungos de degradação marrom e macia são capazes de degradar lignina em alguma extensão, embora preferencialmente ataquem a celulose na madeira. Alguns ascomicotas e e deutoromicotas também podem causar degradação na madeira, conhecida como degradação macia. Esses fungos colonizam geralmente madeiras duras e com alta umidade, metabolizando principalmente os polissacarídeos presentes nelas, e assim como os fungos da degradação marrom, são capazes de realizar algumas modificações na lignina (BLANCHETTE, 1991; ESLYN *et al.*, 1975). Um exemplo de ascomiceto é *Neurospora discreta*, que em um estudo recente

mostrou ser capaz de degradar mais de 40% da lignina presente no bagaço de cana e aproximadamente 16% da lignina presente da fibra de coco (PAMIDIPATI; AHMED, 2016).

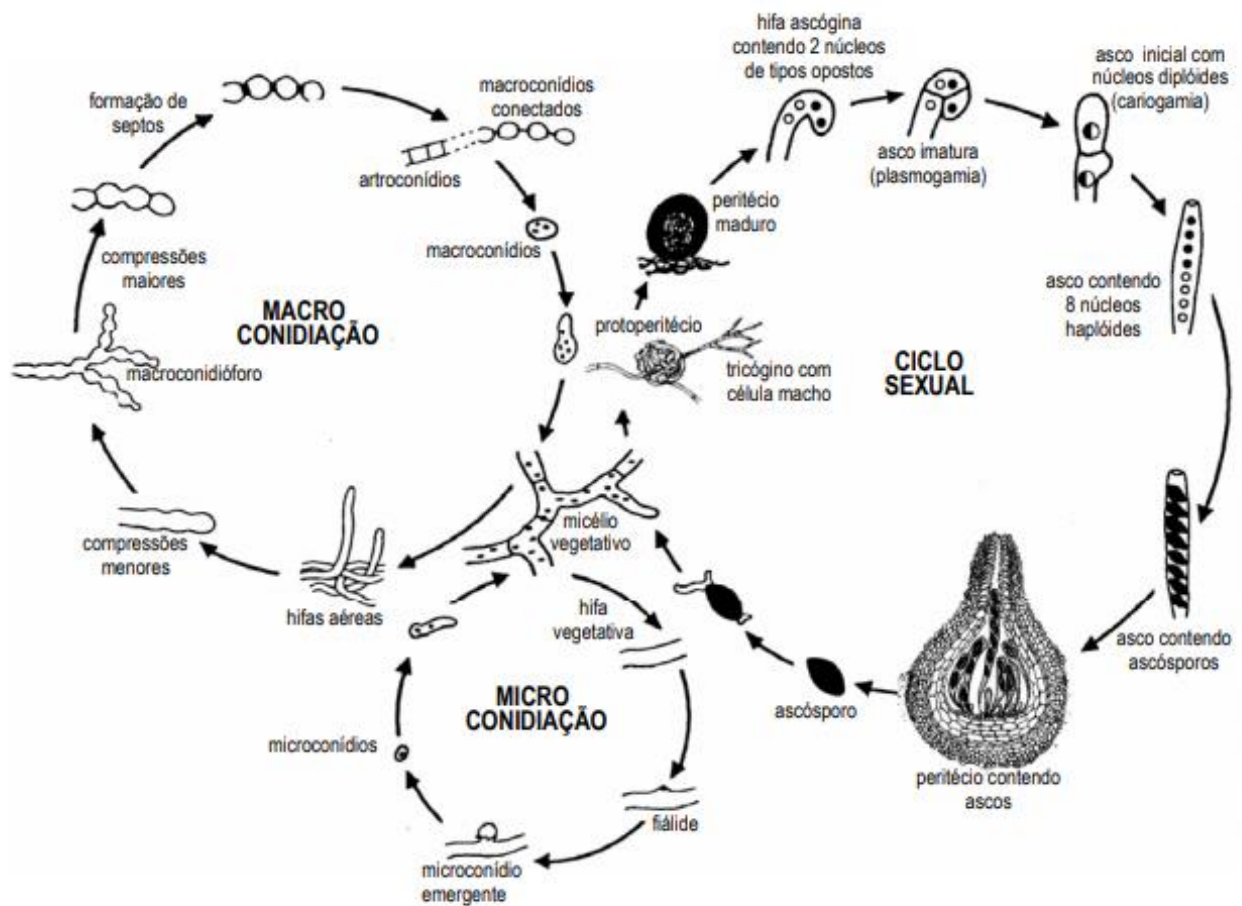
### 1.5 *Neurospora crassa*

São várias as razões para utilizar o ascomiceto *N. crassa* como organismo para o estudo da desconstrução da biomassa vegetal e os aspectos regulatórios desta desconstrução. *N. crassa* é um fungo que pode ser facilmente isolado em culturas de cana-de-açúcar e *Miscanthus*, ambas consideradas atrativas para a produção de biocombustíveis a partir de fontes renováveis (PERKINS *et al.*, 1976; PANDIT & MAHESHWARI, 1996; SMITH *et al.*, 2000). Embora há 30 anos tenha sido demonstrado degradar celulose (EBERHART *et al.*, 1977; ROMERO *et al.*, 1999), existe ainda pouca informação sobre *N. crassa* e a degradação da biomassa vegetal (TIAN *et al.*, 2009). A finalização do genoma demonstrou que *N. crassa* possui o dobro de genes codificando celulasas, comparado a *Hypocreia jecorina* (MARTINEZ *et al.*, 2008), bem como genes para hemicelulasas e outras enzimas envolvidas na degradação da parede vegetal. No entanto, vários genes mostrando estarem envolvidos na degradação da parede celular vegetal ainda se encontram anotados como codificando proteínas de funções desconhecidas (TIAN *et al.*, 2009).

*N. crassa* é um organismo modelo muito utilizado há cerca de 90 anos, em estudos de expressão gênica, desenvolvimento e diferenciação celular, ritmo circadiano, defesa do genoma, bem como outros aspectos da biologia de eucariotos (DAVIS; PERKINS, 2002).

Ao contrário das leveduras, é multicelular e possui pelo menos 28 tipos distintos de células, muitos dos quais derivam das hifas, que contribuem para seu complexo ciclo de vida (figura 3) (BORKOVICH *et al.*, 2004). Trata-se de um fungo filamentoso com hifas tubulares ramificadas e septadas, que permitem a passagem de organelas e núcleos entre os septos. Esta passagem promove a formação de heterocários, os quais múltiplos genomas contribuem para o metabolismo de um único micélio. É um organismo saprófito e não patogênico, que apresenta ambos os ciclos sexuado e assexuado influenciado por fatores do meio ambiente, como nutrientes, luz e temperatura (PERKINS *et al.*, 1976). Seu genoma tem cerca de 40 Mb (GALAGAN *et al.*, 2003),

**Figura 3** – Ciclo de vida do fungo *Neurospora crassa*.



FONTE: Adaptado de BORKOVICH *et al.*, 2004

organizados em sete cromossomos que variam entre 4 a 10 Mb (SCHULTE *et al.*, 2002).

A resolução do seu genoma revelou um total de 10.082 genes codificadores de proteínas (44%) e destes, 41% não possuem ortólogos conhecidos depositados em bancos de dados, refletindo o baixo conhecimento dos genomas dos fungos. O grande número de genes ainda com funções desconhecidas aponta *N. crassa* como um organismo modelo interessante para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos não identificados até o momento, os quais podem possivelmente ser representados por genes com novas funções ou novos genes desempenhando maneiras diferentes de realizar funções conhecidas.

Existe atualmente a possibilidade da comunidade científica solicitar junto ao *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA) linhagens de *N. crassa* mutantes em quaisquer um dos 10.000 genes codificadores de proteínas (COLOT *et al.*, 2006). O nocaute dos genes tem como objetivo determinar a função de cada deles, pois apenas 15% dos genes identificados após a resolução do genoma do fungo estão associados ao fenótipo e pouco mais de um terço destes genes não possuem ortólogos em outros organismos, não existindo evidências de suas funções (DUNLAP *et al.*, 2007).

Estudos de bioprospecção mostraram que em condições laboratoriais, *N. crassa* é capaz de degradar 18,7% de uma cultura de *Miscanthus* em decomposição num período de oito semanas (SHRESTHA *et al.*, 2015), reforçando que embora *N. crassa* não seja adequada para ser usada como um sistema heterólogo de expressão de proteínas de interesse biotecnológico, este organismo possivelmente possui uma grande diversidade de enzimas lignocelulolíticas, o que o torna um organismo eficiente no processo de degradação da biomassa vegetal. Uma busca por ortólogos lignolíticos no banco de dados de *N. crassa* (*FungiDB - The Fungal and Oomycete Genomics Resource*, <http://fungidb.org/fungidb/>) retornou pelo menos nove genes codificando proteínas com provável atividade lacase (ORFs NCU04528, NCU05113, NCU00526, NCU07920, NCU04593, NCU05604, NCU09279, NCU09023, NCU02201) e dez genes codificando prováveis enzimas com atividade peroxidase (ORFs NCU03297, NCU09210, NCU05770, NCU11286, NCU11046, NCU16942, NCU03646, NCU09534, NCU05858, NCU00776), incluindo uma ORF codificando uma provável peroxidase descolorante (NCU09210), além de diversas outras prováveis oxidoredutases acessórias. Portanto, *N. crassa* pode ser considerado um modelo de

estudo para decifrar o sistema lignolítico de fungos filamentosos bastante promissor e também um organismo extremamente interessante sob o ponto de vista biotecnológico.

*Objetivos*

## 2 OBJETIVOS

Os fungos filamentosos são excelentes produtores de enzimas lignocelulolíticas e a resolução do genoma de *N. crassa* permitiu identificar nove genes codificando proteínas com provável atividade lacase, dez genes codificando prováveis enzimas com atividade peroxidase, incluindo uma ORF codificando uma provável peroxidase descolorante, além de diversas outras prováveis oxidoredutases acessórias, tornando este ascomiceto extremamente interessante sob o ponto de vista biotecnológico. O objetivo principal deste projeto foi determinar os secretomas do fungo *N. crassa* cultivado na presença de lignina comercial, bagaço de cana-de-açúcar e serragem como fonte de carbono alternativa e identificar nos mesmos, enzimas com atividades lignolíticas promissoras, que possam ser incorporadas futuramente em coquetéis enzimáticos adaptados para a desconstrução da parede vegetal, entre outras finalidades.

Para atender ao objetivo principal deste projeto, realizamos a:

1. Avaliação da capacidade do fungo *N. crassa* em utilizar fontes de carbono alternativas para o crescimento. Esta etapa foi realizada cultivando o fungo em meio sólido adequado, suplementado de diferentes fontes de carbono alternativas (lignina, bagaço de cana de açúcar e serragem);
2. Padronização das condições de cultivo do fungo em meio líquido contendo as fontes de carbono alternativas para a obtenção dos respectivos secretomas;
3. Determinação da atividade lignolítica nos secretomas obtidos a partir do cultivo do fungo na presença das diferentes fontes de carbono;
4. Avaliação dos secretomas obtidos nas diferentes fontes de carbono alternativas por ensaios de eletroforese SDS-PAGE e bidimensional,
5. Identificação das proteínas contidas nos secretomas analisados por técnicas de espectrometria de massas, seguido de análises das proteínas identificadas por bioinformática.

## *Materiais e Métodos*

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Linhagens de microrganismos

- ***Neurospora crassa* 74-OR23-1VA:** FGSC 2489 (A, linhagem selvagem), adquirida junto ao *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC), disponível em nosso laboratório (COLOT *et al.*, 2006).

#### 3.2 Substratos lignocelulósicos

Para os ensaios de degradação de biomassa vegetal e indução da secreção de ligninases pelo fungo, foram usados o bagaço de cana de açúcar e a serragem. O bagaço da cana de açúcar é proveniente de um sítio da cidade de Bebedouro, SP. A serragem usada é composta por uma mistura de restos de madeiras mole e dura e foi cedida pelo SENAI – Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, da cidade de Araraquara, SP.

#### 3.3 Meios de cultura

##### Meio mínimo de Vogel

O meio de cultivo utilizado para o crescimento, manutenção das linhagens do fungo *N. crassa* e para os experimentos, foi o meio mínimo de Vogel 1x (VM) (Vogel, 1956). Para as culturas realizadas em meio sólido, o meio VM 1x foi acrescido de ágar 2%.

O meio VM é um meio quimicamente definido, preparado a partir da diluição de uma solução estoque 50x concentrada:

##### Sais de Vogel (50x)

Citrato de sódio·2H<sub>2</sub>O 0,5M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anidro 1,85M; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> anidro 1,25M; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,08M; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,03M; 5 mL de solução de biotina (0,5mg/mL em etanol 50% v/v); 5 mL solução de elementos traços; 2 mL clorofórmio; água destilada em quantidade suficiente para (q.s.p) 1000 mL

##### Solução de elementos traços

Ácido cítrico.H<sub>2</sub>O 0,5M; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,4M; Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,05M; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,02M; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,006M; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> anidro 0,02M; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,004M; 100µL de clorofórmio, água destilada q.s.p 100 mL.

### 3.4 Soluções e tampões

#### 3.4.1 Para o preparo das amostras de proteínas

##### Tampão com inibidores de protease

Tris-HCl 0,05M pH 8,0; fluoreto de sódio (NaF) 0,05M; ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,001M pH 8,0; benzamidina 0,001M; tosil fenilalanil clorometil cetona (TLCK) 0,002 M; Ditioneitol (DTT) 0,001M; fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,001M Aprotinina e pepstatina A (1µg/mL cada)

#### 3.4.2 Para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

##### Tampão Tris-glicina 10 x:

Tris-HCl 250 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0; glicina 2,5 M.

##### Tampão de Amostra:

Tris-HCl 100 Mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,8; dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%; Azul de bromofenol 0,2%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol 0,2%.

##### Resolving buffer 5x:

1,875M Tris base; 1% SDS; acertar pH em 8,8 com HCl.

##### Stacking buffer 5x:

1,875M Tris base; 1% SDS; acertar pH em 6,8 com HCl.

##### Gel de poliacrilamida desnaturante 12%

*Gel de separação:* 4 mL solução acrilamida:bisacrilamida (30:0,8); 4 mL H<sub>2</sub>O; 2 mL *Resolving buffer* 5x; 100 µL persulfato de amônio (APS) 10%; 10 µL N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED).

*Gel de empacotamento*: 900  $\mu$ L solução acrilamida:bisacrilamida (30:0,8); 3,2 mL H<sub>2</sub>O; 1 mL *Stacking buffer* 5x; 50  $\mu$ L APS 10%; 5  $\mu$ L TEMED

#### 3.4.2.1 Para revelação dos géis de poliacrilamida

##### 3.4.2.1.1 Coloração com Azul de *Coomassie*

###### Solução Corante

2,5 g *Coomassie Brilliant Blue R*; 450 mL metanol; 100 mL ácido acético glacial; q.s.p 1000 mL água destilada.

###### Solução Descorante

450 mL metanol; 100 mL ácido acético glacial; q.s.p 1000 mL água ultrapura.

##### 3.4.2.1.2 Coloração com solução de nitrato de prata

###### Solução Fixadora

125 mL etanol absoluto; 30 mL ácido acético glacial; 188  $\mu$ L de formaldeído 37%; água destilada q.s.p 250 mL.

###### Solução de Lavagem

100 mL de etanol absoluto; 100 mL água destilada.

###### Solução de Nitrato de Prata

0,5 g de AgNO<sub>3</sub>; 188  $\mu$ L de formaldeído; água destilada q.s.p 250 mL.

###### Solução Reveladora

15 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 5 mL de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 125  $\mu$ L de formaldeído; água destilada q.s.p 250 mL

#### 3.4.3 Para determinação de açúcares redutores pelo método de Benedict

###### Reagente de Benedict

*Solução A*: 173 g de citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O); 90 g de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); 600 ml de água destilada quente (~80°C) (filtrar após a dissolução).

*Solução B:* 17,3 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) (dissolver em 200 mL de água destilada).

Adicionar a solução B na solução A e completar o volume q.s.p. 1000 mL

### 3.4.4 Para determinação de proteínas totais

#### 3.4.4.1 *Precipitação das proteínas totais com ácido tricloroacético (TCA) e acetona*

##### Solução de TCA 100%

10 g de TCA em 4,54 mL de água destilada (volume final = 10 mL)

##### Solução de Precipitação

TCA 10 % (v/v) em acetona, contendo DTT  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ .

##### Solução de Lavagem

DTT  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  em acetona.

#### 3.4.4.2 Método de Hartree

##### Soluções Estoque

2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (preparada em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ); 1% tartarato de Na e K (preparada em água destilada); 1%  $\text{CuSO}_4$  (preparada em água destilada).

##### Solução Reagente:

100  $\mu\text{L}$  tartarato 1%; 100  $\mu\text{L}$   $\text{CuSO}_4$ ; 9,8 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%.

#### 3.4.4.3 Método de Bradford

##### Reagente de Bradford

10 mg *Comassie Brilliant Blue* G-250; 5 mL etanol 95%; 10 mL ácido fosfórico 85%; água destilada q.s.p. 100 mL.

### 3.4.5 Para determinação das atividades enzimáticas

#### Solução Alcoólica de Siringaldazina

0,05 g de siringaldazina; q.s.p 50 mL etanol absoluto.

#### Solução Tampão Citrato-Fosfato

Solução A: 1,05 g de ácido cítrico em 50 mL de água destilada.

Solução B: 1,41g de fosfato de sódio dibásico em 50mL de água destilada.

A solução A foi adicionada a solução B e o pH ajustado para 5,0 com NaOH.

#### Solução $\text{FeCl}_3$ e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (teste qualitativo de oxidação da lignina)

$\text{FeCl}_3$  e  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 1% de cada (m/v), em solução aquosa.

#### Tintura de iodo

$\text{I}_2$  e KI, 0,25% de cada (m/v), em solução aquosa.

### 3.4.6 Para digestão trípica das amostras proteicas em solução

#### Solução de DTT

0,5 M de DTT, preparada em solução tampão bicarbonato de amônio 50 mM pH 7,8

#### Solução de IAA

0,5 M de IAA, preparada em solução tampão bicarbonato de amônio 50 mM pH 7,8

#### Solução de Tripsina

Tripsina  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ , preparada em solução tampão bicarbonato de amônio 50 mM pH 7,8

## 3.5 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e fornecidos pelas empresas Sigma, Amresco ou Merck. A enzima tripsina, utilizada nas análises de espectrometria de massas, foi fornecida pela Promega. A lignina purificada, usada como fonte de carbono alternativa, foi obtida junto à Sigma (cat. 47003).

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Manutenção da linhagem selvagem de *N. crassa* e propagação

#### 4.1.1 Obtenção de conídios

Para a obtenção de conídios, as diferentes linhagens foram cultivadas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM sólido, acrescido de sacarose 2%, a 30°C durante 3 dias. Em seguida, as linhagens foram expostas à luz e à temperatura ambiente por aproximadamente 7 dias. Após esse período, os conídios foram coletados com água destilada estéril gelada, filtrados através de gaze estéril, e as suspensões centrifugadas a 3.000 rpm para a separação do micélio remanescente presente no sobrenadante, dos conídios. A concentração das suspensões de conídios foi determinada em câmara de Neubauer e os valores expressos em conídios mL<sup>-1</sup> de suspensão.

### 4.2 Tratamentos das biomassas vegetais

Para os ensaios de crescimento em placas, padronização do cultivo do fungo em meio líquido e obtenção dos secretomas do fungo, foram utilizados como fontes de carbono alternativas naturais as biomassas vegetais bagaço de cana de açúcar e serragem, os quais foram adicionados aos meios de cultivo, previamente tratados ou não, conforme descrito em Shrestha *et al.* (2011). Para isto, bagaço da cana de açúcar e serragem foram triturados e submetidos a dois pré-tratamentos: 1) alta temperatura e 2) alta temperatura acoplada a hidrólise ácida.

Para o tratamento com alta temperatura acoplado à hidrólise ácida, os substratos foram primeiramente fervidos em forno micro-ondas durante três minutos, na presença de uma solução de ácido sulfúrico 1 % (v/v), numa proporção de 1 g de substrato triturado:10 volumes de solução ácida. Este procedimento foi repetido cinco vezes. Em seguida, os substratos tratados foram lavados em água corrente até que os pHs dos mesmos atingissem o valor de 5,8. Após a correção do pH, as biomassas foram coletadas por filtração em filtros de tecido de algodão, desidratadas em estufa até que seus pesos atingissem valores constantes. Para o tratamento com alta

temperatura, os meios de cultivo contendo os diferentes substratos (sem tratamento prévio ou hidrolisados com ácido sulfúrico) foram autoclavados por 30 min a 120°C e 1 atm, juntamente com o meio VM, estes suplementados na proporção de 1 g substrato:10 mL meio VM.

### 4.3 Análises Morfológicas

Para todas as análises morfológicas descritas a seguir, foram realizados três experimentos biológicos independentes, em triplicatas experimentais.

#### 4.3.1 Análise do crescimento radial das colônias

Para analisar o crescimento radial de *N. crassa* na presença das fontes de carbono alternativas, foram preparadas placas de Petri contendo meio VM sólido acrescido de bagaço de cana-de-açúcar ou de serragem, previamente tratados e adicionados na proporção de 1:10 (m/v), ou lignina purificada, nas concentrações de 0,05%; 0,1%; 0,5%, 1%, 2% e 10% (m/v). Como controle para os experimentos, foram preparadas placas de Petri sem a adição das fontes de carbono alternativas, contendo apenas 1) ágar e água; 2) meio VM sólido sem adição de fonte de carbono, e 3) meio VM sólido acrescido de sacarose 2%.

10 µL de uma suspensão contendo  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> foram inoculados no centro das placas e incubados a 30°C durante três dias. Imagens dos crescimentos radiais foram adquiridas após 24 h, 48 h e 72 h de cultivo e medidas dos diâmetros das colônias foram determinados em centímetros a cada 12 h. Paralelamente, imagens das extremidades apicais das hifas basais e dos pontos de inóculo das colônias obtidas após 24 h de cultivo foram adquiridas por microscopia de contraste diferencial (DIC) nos aumentos de 32x e 80x, com o auxílio de uma câmera AxioCam ICc3 acoplada a um estereomicroscópio trinocular Discovery V8 (Zeiss), para os diferentes meios de cultivo.

#### 4.3.2 Determinação da extensão apical das hifas basais em *race tubes*

Para analisar o crescimento linear do fungo usando lignina como fonte de carbono, foram preparados *race tubes* contendo 15 mL meio VM sólido acrescido de

lignina nas concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 10%, tendo como controle meio VM acrescido de sacarose 2%. 10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão contendo  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  foram inoculados em uma das extremidades dos tubos e incubados durante uma noite, sob luz constante para zerar o relógio biológico do fungo. No dia seguinte, as extremidades apicais das hifas basais estendidas foram marcadas e adotadas como sendo o ponto de partida para a determinação das taxas de crescimentos lineares basais. Em seguida, os tubos foram transferidos para a condição de escuro total e medidas dos crescimentos (em centímetros) foram realizadas a cada 24 h, até que qualquer uma das culturas atingisse primeiro a outra extremidade do tubo. Este ponto foi adotado como sendo o ponto final das leituras das taxas de crescimentos para todos os demais tubos. A determinação das extensões apicais não pôde ser realizada na presença de bagaço de cana de açúcar ou de serragem devido à limitação da técnica (as texturas dos meios de cultivos contendo bagaço de cana ou serragem não permitiram o preenchimento correto dos *race tubes*).

#### 4.3.3 Produção de hifas aéreas e conídios

Para analisar a produção de hifas aéreas, 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de conídios de *N. crassa* na concentração de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram inoculados em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio VM sólido acrescidos dos substratos vegetais tratados, na proporção de 1:10 (m/v), ou de lignina purificada nas concentrações de 0,05%; 0,1%; 0,5%, 1%, 2% e 10%. Como controle para os experimentos, foram preparados Erlenmeyers sem a adição das fontes de carbono alternativas, contendo apenas 1) ágar e água; 2) meio VM sólido sem adição de fonte de carbono, e 3) meio VM sólido acrescido de sacarose 2%. Os inóculos foram incubados a 30°C, na ausência de luz, durante três dias e em seguida, as culturas foram transferidas para as condições ambientes de temperatura e luminosidade por mais sete dias, totalizando dez dias de cultivo, onde foram avaliadas a produção de hifas aéreas e conídios.

#### 4.4 Padronização culturas líquidas e obtenção do secretomas

Para a padronização das culturas líquidas e obtenção do secretomas, foram preparados Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio VM

líquido, acrescido das seguintes fontes de carbono: sacarose 2% (controle), bagaço de cana-de-açúcar ou serragem previamente tratados na proporção de 1 g substrato:10 mL meio VM e lignina purificada, nas concentrações de 0,5% e 10% (m/v).

Para os ensaios de biodegradação e obtenção dos secretomas,  $2 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de *N. crassa* foram inoculados nos respectivos meios de cultura e cultivados a 30 °C / 250 rpm por até 28 dias. Alíquotas das culturas (meio de cultivo e micélios) foram removidas após um dia, quatro dias, sete dias, 14 dias e 28 dias de cultivo. Os meios de cultivo foram separados dos micélios por filtração e usados como fonte de proteínas secretadas. Os micélios coletados após a filtração foram armazenados a -80 °C e futuramente serão utilizados como fonte de ácidos nucleicos, para análises de expressão gênica por qPCR, dos alvos selecionados a partir dos ensaios de espectrometria de massas. Todos os ensaios de biodegradação foram realizados em triplicatas biológicas.

#### 4.4.1 Obtenção das proteínas secretadas

Após os diferentes períodos de cultivo, os micélios e todo o resíduo de biomassa vegetal foram removidos por filtração seguidos de centrifugação. Os caldos contendo as proteínas secretadas foram adicionados de uma solução tampão contendo inibidores de proteases e glicerol 2% e armazenados a -80 °C para análises posteriores. As proteínas totais das amostras foram determinadas pelos métodos de Hartree (HARTREE, 1972) ou de Bradford (BRADFORD, 1976) usando BSA (Sigma) como padrão e expressas em  $\text{mg mL}^{-1}$ .

#### 4.5 Teste de Benedict

O teste de Benedict (BENEDICT, 1909) foi utilizado para detectar a presença de açúcares redutores (monossacarídeos e oligossacarídeos) nos substratos vegetais usados como fontes de carbono alternativas, após os tratamentos térmico e térmico acoplado a ácido. O princípio do método se baseia na capacidade de redução dos íons cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ), presentes no reagente de Benedict, a íons cuprosos ( $\text{Cu}^+$ ) pelos carbonos anoméricos livres dos açúcares presentes em solução, formando então um precipitado de cor amarelo ou alaranjado.

Para isso, os meios de cultivo foram preparados e autoclavados. Em seguida, alíquotas de 1 mL de cada um dos meios de cultivo foram filtrados para a remoção das partes sólidas provenientes da biomassa vegetal e adicionados 2 mL do reagente de Benedict. A reação foi mantida em banho-maria fervente por 5 minutos, resfriadas em temperatura ambiente e as colorações foram observadas, tendo como controles água, VM e VM adicionado de sacarose 2%.

A presença de sacarose ou outros oligossacarídeos residuais não redutores nos meios de cultivo, provenientes da cana de açúcar ou da serragem, foi determinado hidrolisando-se previamente as amostras dos meios de cultivo com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , uma vez que as ligações glicosídicas são facilmente hidrolisáveis na presença de ácidos. Para isto, três gotas de ácido sulfúrico concentrado foram previamente adicionadas nas alíquotas de 1 mL dos meios de cultivo e incubadas em banho-maria fervente por 1 minuto. Após a hidrólise ácida, as amostras foram neutralizadas com 6 gotas de NaOH 6 N e submetidas ao teste de Benedict.

## 4.6 Determinação de proteínas totais

### 4.6.1 Precipitação das proteínas totais com ácido tricloroacético (TCA) e acetona

Para os ensaios onde se fez necessário, e por se tratar de amostras de secretoma onde a quantidade de proteínas totais pode variar, as proteínas totais presentes nas amostras foram primeiramente precipitadas, usando o protocolo de TCA-acetona. Para isto, amostras de proteínas totais foram adicionadas de 3 volumes de uma solução de TCA 10 % (v/v) em acetona, contendo DTT  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , e estas foram incubadas a  $-80^\circ\text{C}$  por pelo menos 30 min. Em seguida, as proteínas precipitadas foram coletadas a  $14.000 \text{ rpm}/4^\circ\text{C}/20 \text{ min}$  e os *pellets* foram lavados com  $500 \mu\text{L}$  de uma solução de DTT  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  em acetona. Após a lavagem, a acetona residual das amostras foi removida por evaporação e os *pellets* foram dissolvidos em tampão  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 8,0.

#### 4.6.2 Método de Hartree

As proteínas totais das amostras foram determinadas pelo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972). Para isto, as amostras foram preparadas diluindo-se 5  $\mu\text{L}$  em 195  $\mu\text{L}$  de água, adicionadas de 1 mL de solução reagente e incubadas em temperatura ambiente durante 15 min. Em seguida, as amostras foram adicionadas de 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin 1:1 em água (v/v) e incubadas por mais 30 min em temperatura ambiente. Após a incubação as absorvâncias das amostras foram determinadas a 650 nm e usadas para determinar as concentrações de proteínas totais das amostras em  $\text{mg mL}^{-1}$ , usando a equação da reta obtida a partir de uma curva padrão preparada com soroalbumina bovina.

#### 4.6.3 Método de Bradford

As proteínas totais das amostras também foram determinadas pelo método Bradford (BRADFORD, 1976), onde foram adicionados a um tubo de microcentrífuga 10  $\mu\text{L}$  de amostra com 790  $\mu\text{L}$  de água destilada e 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. As reações foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e a absorvância foi medida em 595 nm. A curva padrão foi construída a partir da soroalbumina bovina e uma reação com apenas água e reagente de Bradford foi utilizado como branco.

### 4.7 Análise das Atividades enzimáticas

#### 4.7.1 Atividade lacase

Para a determinação da atividade lacase,  $2 \cdot 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de *N. crassa* linhagem selvagem foram inoculados em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio VM líquido suplementado com sacarose 2% (controle) ou os substratos serragem e bagaço de cana de açúcar previamente tratados (1 g substrato:10 mL meio) e incubados a 30°C/200 rpm. Alíquotas dos secretomas foram removidas em diferentes tempos de cultivo (24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 96 h, sete dias, 14 dias e 28 dias) e ensaiadas para atividade lacase, tendo como substrato a siringaldazina (SKLARZ *et al.*, 1989).

Para o ensaio enzimático, 300  $\mu\text{L}$  de extrato proteico (amostras do secretomas) foram adicionados de 600  $\mu\text{L}$  de solução tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0, homogeneizados e incubados a 50°C durante 2 min. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de uma solução alcoólica de siringaldazina 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  foram adicionados ao tubo reagente, rapidamente homogeneizados e reincubados a 50°C durante exatamente 5 min. A atividade lacase foi determinada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 525 nm. O espectrofotômetro foi zerado com água. Como BRANCO, foram utilizadas as próprias amostras de secretomas previamente fervidas em banho-maria durante 10 min e os valores das absorbâncias obtidas nas amostras fervidas foram subtraídos das absorbâncias obtidas nos ensaios de oxidação da siringaldazina com as amostras não fervidas.

As unidades de atividade lacase foram determinadas a partir da oxidação de 1  $\mu\text{mol}$  de siringaldazina para sua forma quinona, usando-se o coeficiente de absorvidade molar de  $6,5 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (BAUER; RUPE, 1971). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de lacase requerida para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de siringaldazina por minuto de reação e foi expressa em unidades (U) por mg de proteínas totais ( $\text{U mg}^{-1}$ ). Os experimentos de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### 4.7.2 Ensaio qualitativo de oxidação da lignina

O teste qualitativo da oxidação da lignina foi realizado conforme descrito em Pointing (1999), em placas de Petri contendo meio VM sólido acrescido de lignina 0,25% e glicose 0,2%.  $10^4$  conídios de *N. crassa* linhagem selvagem foram inoculados no centro das placas de Petri e incubados a 30°C durante dez dias em BOD. As culturas obtidas foram então imersas em uma solução fresca contendo  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , até o aparecimento de cor. Como controles negativos do ensaio, foram usadas placas de Petri contendo o meio VM sólido acrescido de lignina 0,25% e glicose 0,2% sem o inóculo e placas de Petri contendo o meio VM sólido acrescido de glicose 0,2% inoculada com  $10^4$  conídios da linhagem selvagem de *N. crassa*. Foram considerados resultados positivos para o teste qualitativo, as placas que desenvolveram na presença do  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  um halo ao redor da colônia do fungo indicando a lignina oxidada, com coloração azul esverdeada onde a lignina se encontra não degradada.

## 4.8 Análise do secretoma

Todas etapas de preparo das amostras para as análises do secretoma por espectrometria de massa foram realizados tomando-se os cuidados necessários para evitar contaminação com queratina humana. As vidrarias e tubos de microcentrífuga foram previamente tratados com metanol. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q.

### 4.8.1 Análise das proteínas secretadas por SDS-PAGE e 2D-PAGE

As amostras coletadas durante a padronização dos ensaios de cultivo do fungo nas diferentes fontes de carbono e também para os ensaios de desconstrução de lignina foram primeiramente analisadas por SDS-PAGE, conforme protocolo padronizado em nosso laboratório (LAEMMLI, 1970). Rapidamente, amostras de proteínas totais extraídas das diferentes condições de cultivo foram separadas em géis de poliacrilamida 12% em condição desnaturante, a 200 V em tampão de Tris-glicina 1x. Após a eletroforese, os géis foram revelados com solução de *Commassie* e/ou prata para a visualização das proteínas.

Para a análise das proteínas secretadas nas diferentes condições de cultivo por eletroforese bidimensional, amostras das proteínas totais secretadas nos diferentes meios de cultivo foram primeiramente filtradas em filtros contendo membranas com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Millipore) e concentradas em filtros contendo membranas com poros seletivos para proteínas de tamanhos de 10 kDa (Amicon, Millipore). As proteínas totais foram determinadas pelo método de cobre residual (2D Quant kit, GE HealthCare), usando BSA como padrão.

As amostras de proteínas totais foram separadas por 2D-PAGE usando o sistema de focalização isoelétrica IPGphor™ (GE Healthcare) e tiras Immobiline™ DryStrip de 13 cm, com gradiente linear de pH 3-10 (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante. Após a eletrofocalização, as tiras foram reduzidas e alquiladas. As proteínas foram separadas na segunda dimensão em gel SDS-PAGE 12,5 % utilizando o sistema Hoefer™ SE 600 (GE Healthcare) em tampão de corrida Tris-glicina (LAEMMLI, 1970). Para a visualização das proteínas secretadas, os géis foram revelados com azul de *Coomassie* e/ou prata.

#### 4.8.1.1 *Revelação dos géis com solução de azul de Coomassie*

Após a separação das proteínas, os géis foram mantidos por no mínimo 10 minutos na solução corante sob agitação, esta foi retida e a solução descorante foi adicionada e trocada assim que necessário para uma melhor descoloração, mantendo os géis nesta, preferencialmente durante uma noite, para uma melhor visualização das bandas.

#### 4.8.1.2 *Coloração com Prata*

Após o término da eletroforese, os géis já corados ou não com azul de Coomassie foram fixados durante 1h, em temperatura ambiente e sem agitação. Em seguida, foram lavados 3 vezes em solução de lavagem, durante 20 min com agitação suave. A solução de lavagem foi removida e os géis ficaram imersos durante um minuto em uma solução de tiosulfato de sódio recém-preparada. Em seguida, a solução de tiosulfato foi removida e os géis foram lavados 3 vezes durante 20 seg cada, com água destilada. Após a lavagem, foi adicionada a solução de nitrato de prata aos géis, incubando durante 20 min. Após a incubação com a prata, a solução foi removida, os géis foram novamente lavados 3 vezes em água destilada e as bandas proteicas foram visualizadas pela revelação dos géis com solução reveladora.

#### 4.8.2 *Digestão tríptica das amostras proteicas em solução*

Após o cultivo do fungo nas condições selecionadas, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm para separação dos sólidos e do caldo contendo as proteínas secretadas. As proteínas contidas no caldo foram precipitadas e concentradas com solução TCA-acetona. Os *pellets* obtidos foram solubilizados em um volume mínimo de uma solução de ureia 8 M, em banho de gelo por aproximadamente 10 min. As amostras solubilizadas tiveram as proteínas totais determinadas pelo método de Bradford e amostras dos secretomas contendo aproximadamente 10 µg de proteínas totais submetidas à digestão com tripsina. Para isto, as amostras foram reduzidas com 5 mM de DTT em temperatura ambiente por 45 min. Em seguida, as amostras foram alquiladas com 14 mM de iodoacetamida (IAA) ao abrigo da luz, por 45 min em temperatura ambiente. A IAA adicionada às amostras

foi inativada pela adição de 5 mM de DTT em temperatura ambiente, durante 15 min. A concentração de ureia das amostras foi reduzida para 1,6 M pela adição de tampão bicarbonato de amônio 50 mM. Em seguida, as amostras foram adicionadas de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  e digeridas durante 16 h a 37°C com 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de tripsina 0,02 mg  $\text{mL}^{-1}$  (Trypsin Gold, Promega). Após a digestão, as amostras foram adicionadas de 0,4% de ácido trifluoracético (TFA) para interromper a ação enzimática e reduzir os valores de pH abaixo de 2,0 e centrifugadas para remoção de possíveis precipitados formados durante o procedimento.

#### 4.8.2.1 Dessalinização das amostras

As amostras tripsinizadas foram dessalinizadas em colunas C18 (ZipTip® Pipette Tips, Millipore), de acordo com as seguintes etapas:

- 1°) Lavagem com ACN 100%;
- 2°) Lavagem com uma solução de ACN 60% contendo TFA 0,1%;
- 3°) Lavagem com uma solução de TFA 0,1%;
- 4°) Ligação da amostra na coluna;
- 5°) Lavagem com uma solução de TFA 0,1%;
- 6°) Eluição da amostra em 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de ACN 60% contendo TFA 0,1%.

As etapas acima foram realizadas sucessivas vezes, até que todas as amostras digeridas tivessem passado pela coluna C18. Os peptídeos trípticos coletados foram secos (SpeedVac® Plus SC110 A, Savant) e submetidas à espectrometria de massas.

#### 4.8.3 Sequenciamento dos peptídeos trípticos por LC-MS/MS

Os peptídeos trípticos proveniente do secretoma obtido após 96 h de cultivo do fungo em lignina 0,5% foram enviados para o Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo – Central Analítica, Instituto de Química, USP, SP, onde foram sequenciados por *shotgun*, através de cromatografia líquida de alta eficiência (Nano HPLC, Shimadzu) acoplada a espectrometria de massas (MaXis-QTOF) no modo ESI-QUAD-TOF MS/MS.

Os peptídeos trípticos provenientes dos secretomas obtidos após 20 h de cultivo do fungo em lignina 0,5% 96 h de cultivo do fungo em bagaço de cana-de-

açúcar previamente tratado com ácido/calor foram enviadas para o Centro de Facilidades para a Pesquisa – CEFAP, Instituto de Ciências Biomédicas IBC, USP, SP, onde foram sequenciadas por *shotgun*, através de cromatografia líquida de alta eficiência (Easy nanoLC II, Thermo) acoplada a espectrometria de massas (LTQ-Orbitrap Velos ETD) no modo ESI-TRAP MS/MS.

Os espectros de massas obtidos não interpretados foram analisados conforme descrito por Freitas *et al.* (2008), contra o banco de dados de *N. crassa* (FungiDB), usando a ferramenta de busca de íons-fragmento (MS/MS) do programa MASCOT versão 2.3 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), disponível no servidor do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio – CNPEM, Campinas, SP).

Como parâmetros de busca, para o equipamento foram usados o máximo de uma perda de sítio de clivagem de tripsina, como modificações fixas foram adotadas a carbamidometilação das cisteínas e como modificações variáveis foram adotados a oxidação das metioninas e acetilação dos N-terminais. Foi adotada ainda a tolerância de 1 Da de variação de massa para a identificação dos íons precursores (MS) e de 0,5 Da de variação de massa para a identificação dos íons fragmento (MS/MS).

Os peptídeos foram considerados identificados quando os valores de score excederam a identidade ou excederam um valor de homologia extensa calculado pelo próprio MASCOT, no modo de identificação *decoy* a fim de eliminarmos a identificação de falsos positivos. Para eliminar a redundância causada pelas proteínas que apareceram em múltiplas bases de dados com diferentes nomes e números de acesso, a nomenclatura foi adaptada para todas as proteínas identificadas. As ORFs obtidas foram anotadas funcionalmente, usando a plataforma *Blast2GO* versão 3.0.1. (<https://www.blast2go.com>). As ORFs que se mostraram promissoras após a anotação foram ainda analisadas para a presença de sequencias de endereçamento celular ou extracelular usando a plataforma Wolf PSORT - *Protein Subcellular Localization Prediction* (<https://wolfpsort.hgc.jp/>)

Amostras obtidas através de experimentos realizados na presença serragem previamente tratada com calor acoplado a hidrólise ácida e na presença de sacarose como controle se encontram tripsinizadas, dessalinizadas e armazenadas a -80°C e deverão ser analisadas futuramente.

## *Resultados e Discussão*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 *N. crassa* é capaz de usar lignina proveniente de herbáceas e madeira como fonte alternativa de carbono

Diversos trabalhos têm mostrado que não apenas os basidiomicetos, mas ascomicetos como *Aspergillus* e *Trichoderma* (SHRESTHA *et al.*, 2015), são capazes de utilizar biomassa vegetal de maneira bastante eficiente na natureza, em decorrência da quantidade e variedade de enzimas lignocelulolíticas que estes fungos secretam. No entanto, os esforços para entender os mecanismos de utilização da biomassa vegetal pelos ascomicetos estão concentrados em processos celulares envolvendo atividades celulasas e hemicelulasas, deixando as atividades ligninases em segundo plano.

Foram vários os motivos que nos levaram a estudar a degradação de ligninas pelo fungo *N. crassa*. Em primeiro lugar, consideramos que as ligninas representam uma grande fonte de carbono renovável de origem não carboidrato, que pode ser usada para a síntese de importantes biomoléculas de valor agregado. Em segundo lugar, pouco ainda se sabe sobre os processos biológicos envolvidos na degradação e/ou modificação das ligninas pelos fungos filamentosos e seu conhecimento deve trazer grandes benefícios para as indústrias como a têxtil e a de papel, facilitando processos de branqueamento de polpa de celulose para a confecção de papel ou linho, por exemplo. Ainda neste quesito, será possível identificar proteínas de interesse comercial associadas a processos de biorremediação ambiente. Ou seja, o conhecimento dos processos biológicos associados à degradação/modificação das ligninas possibilitaria a descoberta de proteínas de interesse comercial, as quais poderiam num futuro próximo, ser adicionadas a coquetéis enzimáticos com finalidades específicas, permitindo baratear linhas de produção, facilitar processos industriais e reduzir danos ambientais.

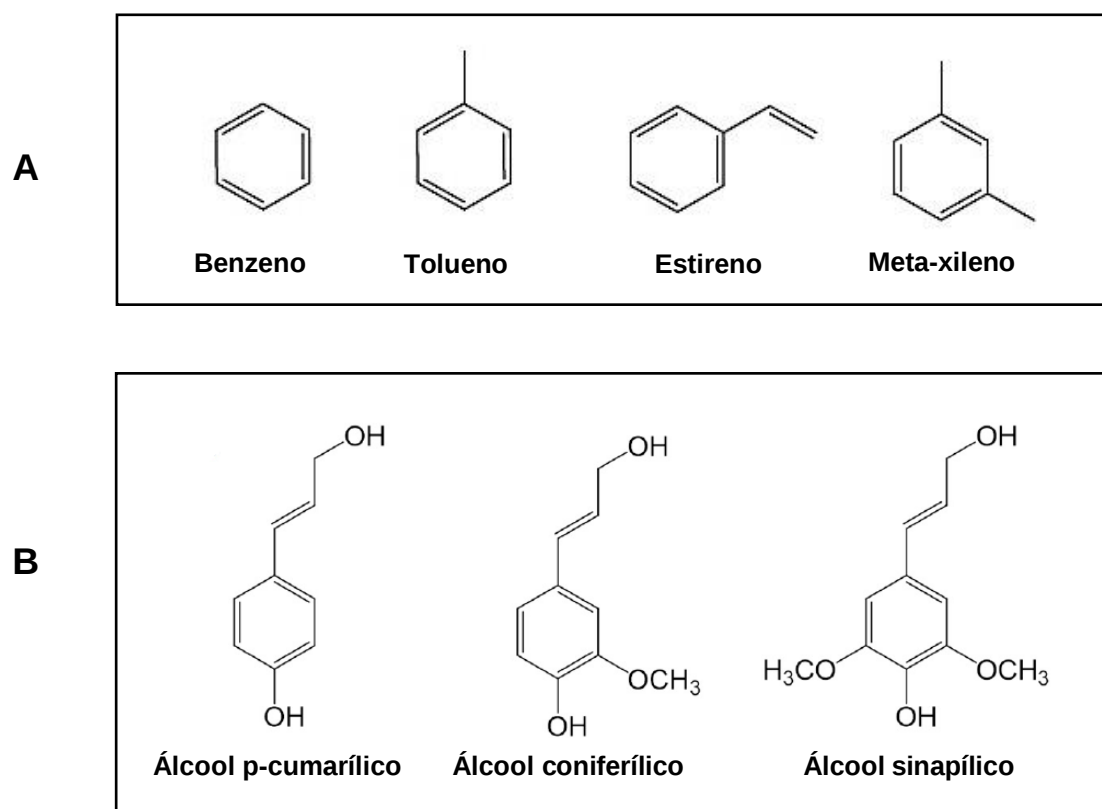
Em terceiro lugar, as ligninas possuem um grande potencial para serem convertidas em compostos fenólicos de alta importância industrial (LI *et al.*, 2015). As principais diferenças entre o petróleo bruto (fonte de carbono não renovável) e as ligninas (fonte de carbono renovável) está em que o petróleo bruto é composto principalmente de cadeias de hidrocarbonetos contendo apenas átomos de carbono e hidrogênio ( $C_nH_{2n+2}$ ), que são destilados para obter diferentes frações, utilizadas

principalmente como combustíveis. Já a biomassa vegetal é composta por moléculas contendo carbono, hidrogênio e oxigênio e sua decomposição é, portanto, capaz de originar não só derivados semelhantes ao do petróleo, como também polímeros de natureza diversificada. A lignina é o único polímero disponível em grandes quantidades na natureza que fornece compostos aromáticos capazes de substituir aqueles produzidos pela indústria petroquímica, como os derivados da nafta. A nafta é um composto químico formado por moléculas contendo entre 4 e 8 carbonos, que pode ser processada dando diferentes derivados, tais como o etileno, propileno, butadieno, e os aromáticos como benzeno ( $C_6H_6$ ), tolueno, estireno e meta-xileno (Fig. 4A). O grande desafio está em separar a lignina da biomassa vegetal, já que este polímero se encontra misturado às células vegetais de maneira bastante íntima. Além disso, a estrutura e a composição química da lignina variam bastante entre as diferentes espécies vegetais, aumentando muito a complexidade do processamento de lignina e reduzindo sua aplicação nos processos industriais em consequência desta dificuldade inerente (RAGAUSKAS *et al.*, 2014; CONSTANT *et al.*, 2016).

Em geral, os métodos utilizados para extrair a lignina da matéria-prima lignocelulósica são o processamento enzimático, o método Klason, o processo Kraft, organossolventes e pré-tratamentos seletivos com líquidos iônicos (UPTON; KASKO, 2016; SATHITSUKSANO *et al.*, 2014; KARIMI; TAHERZADEH, 2016). Encontrar enzimas capazes de minimizar esta dificuldade de processamento pode alavancar a produção interna de coquetéis enzimáticos adaptados a estes processos industriais. Cerca de 60% das indústrias que vendem estes tipos de enzimas encontram-se na Europa, as outras 40% estão concentradas nos Estados Unidos e Japão. A utilização de enzimas lignocelulolíticas em rações animais, em alimentos e indústrias têxtil e de papel respondem por praticamente 20% do mercado mundial (BHAT, 2000). De acordo com os dados do Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior do Governo Federal, sobre o mercado de enzimas do Brasil, no ano de 2005, o total de importações brasileiras foi de US\$ 95,7 milhões, enquanto as exportações foram de US\$ 5,4 milhões, mostrando que o mercado brasileiro é essencialmente importador, ressaltando nossa desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país.

E em quarto lugar, porém não menos importante, a publicação de pesquisas mostrando que *N. crassa* degrada biomassa vegetal de maneira eficiente (SHRESTHA

**Figura 4** – Compostos aromáticos provenientes da Nafta e Lignina



(A) Exemplos de compostos aromáticos produzidos a partir da nafta. (B) Principais monômeros que compõem a lignina.

Fonte: (A) Adaptado de CHIRAT, 2017; (B) Adaptado de MU *et al.*, 2018

et al., 2015), somado à nossa experiência em manuseio e domínio das técnicas moleculares associadas a este fungo, juntamente com a resolução do seu genoma, o qual revelou a presença de genes codificando proteínas com prováveis atividades lacase, peroxidase, peroxidase descolorante e prováveis oxidoredutases acessórias, tornaram *N. crassa* bastante atrativa sob o ponto de vista biotecnológico. Não pela quantidade de enzimas que são secretadas pelo fungo e que são capazes de degradar a parede celular vegetal, mas pela variedade de prováveis enzimas com funções associadas à esta atividade de degradação e/ou modificação. Além dos genes já anotados no banco de dados do fungo, apresentando atividades relacionadas ao nosso objeto de estudo, existe ainda muitas ORFs não anotadas, as quais podem vir a ser em decorrência deste estudo.

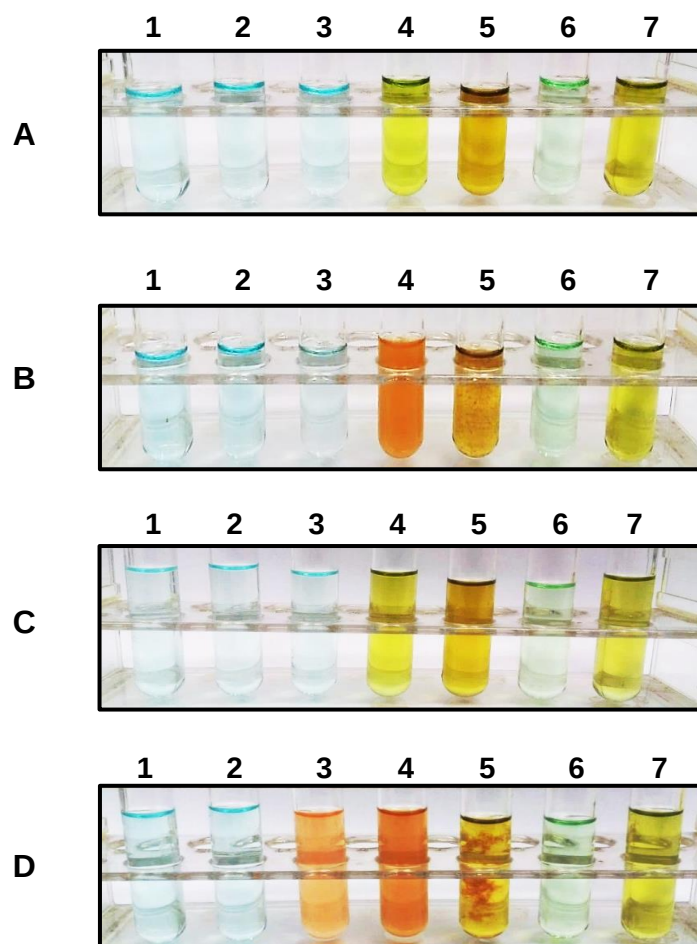
A fim de identificar estas proteínas com atividades lignolíticas, iniciamos nossos estudos partindo de dois tipos de substratos vegetais abundantes na natureza e que contém diferentes tipos de ligninas: o bagaço da cana de açúcar e a serragem. As estruturas e propriedades físico-químicas das ligninas estão intrinsicamente relacionadas à taxonomia das plantas. A lignina de madeira macia, por exemplo, contém maior teor do álcool coniferílico, enquanto que a lignina de madeira dura apresenta uma mistura de álcool coniferílico e álcool sinapílico. Já as ligninas das herbáceas ou gramíneas apresentam uma mistura das três unidades aromáticas (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) (NITSOS et al., 2016), como mostrado na Figura (4B). Utilizando estes dois modelos de substratos, ampliamos as nossas chances de identificação de enzimas provenientes de *N. crassa* apresentando ação lignolíticas, uma vez que mimetizamos os habitats naturais onde este ascomiceto pode ser encontrado: madeiras em decomposição e herbáceas como o *Miscanthus*, uma espécie correlata da cana de açúcar. Além disso, a utilização do bagaço para os ensaios de produção enzimática, é uma alternativa para as indústrias de biotecnologia obterem enzimas hidrolíticas e oxidativas com um custo mais barato em relação às enzimas que estão no mercado. Além destas vantagens já mencionadas, a produção destas enzimas utilizando o bagaço de cana dispõe-se também como uma maneira viável de agregar valor a estes resíduos e outros com características similares ao bagaço de cana, como resíduos de palha e casca de arroz, sabugo de milho, entre outros, diminuindo assim o impacto ao meio ambiente (VALASKOVÁ; BALDRAN, 2006).

Iniciamos nossos estudos de biodegradação, analisando a capacidade de *N. crassa* em utilizar as biomassas vegetais escolhidas como fontes alternativas de carbono, por meio de ensaios de crescimento do fungo nos diferentes substratos, tratados ou não com ácido e/ou calor. Por se tratar de substratos provenientes de plantas que naturalmente também contém carboidratos de natureza simples disponíveis como fonte de carbono para o crescimento do fungo, e a fim de garantirmos que durante os ensaios de crescimento, o fungo estivesse usando como fonte de carbono apenas os carboidratos de natureza complexa e derivados polifenólicos da lignina, analisamos os substratos de maneira qualitativa, para a presença de açúcares redutores. Para isto, os meios de cultivo adicionados dos diferentes substratos, tratados ou não, foram preparados, autoclavado e testados para a presença de açúcares. Como controle negativo para este experimento, utilizamos o meio VM sem adição de fonte de carbono e água. Para determinarmos a presença de açúcares totais nas amostras dos substratos, o teste de Benedict também foi realizado utilizando os substratos hidrolisados com  $H_2SO_4$ .

Primeiramente o teste foi realizado sem hidrólise ácida dos meios de cultivo com  $H_2SO_4$ . Comparando os resultados apresentados nas Figuras 5 A e B, podemos notar que houve mudança de cor após a fervura em banho-maria na presença do reagente de Benedict apenas nos tubos contendo bagaço de cana e serragem tratados com calor, com uma coloração laranja intensa no tubo referente à cana tratada com calor e apenas alguns precipitados alaranjados no tubo contendo serragem (Fig. 5, A e B). Os prováveis dissacarídeos não redutores foram então hidrolisados na presença do ácido forte e as amostras de meio tratadas foram novamente testadas para a presença de açúcares redutores. Comparando-se as Figuras 5B e 5C, observa-se que o tubo contendo meio de cultivo adicionado de sacarose também adquiriu coloração alaranjada após a fervura em banho-maria na presença do reagente de Benedict, indicando que a sacarose foi hidrolisada e convertida a glicose e frutose, reduzindo os íons cúpricos  $Cu^{2+}$  presentes no reagente de Benedict a íons cuprosos  $Cu^+$ .

Observando os resultados, nota-se a presença de monossacarídeos mesmo antes da adição do  $H_2SO_4$ , provavelmente pelo fato das biomassas terem sofrido hidrólise de uma pequena parte de oligos e polissacarídeos, gerando açúcares de fácil assimilação como glicose, xilose, arabinose, entre outros, presentes nas cadeias de carboidratos mais complexos como da celulose e hemiceluloses.

**Figura 5** – Presença de açúcares redutores nos substratos usados como fontes de carbono alternativas para o cultivo de *N. crassa*.



A presença de açúcares redutores nos substratos foi detectada qualitativamente pelo Teste de Benedict. Para isto, 1 mL de cada um dos meios de cultivo preparados com os diferentes substratos, tratados ou não, foram ensaiados na presença do reagente de Benedict, conforme descrito em Materiais e Métodos. **(A)** Amostras adicionadas do reagente de Benedict antes banho-maria fervente; **(B)** Amostras adicionadas do reagente de Benedict, após banho-maria fervente; **(C)** Amostras adicionadas do reagente de Benedict, hidrolisados com  $H_2SO_4$ , antes do banho-maria fervente; **(D)** Amostras adicionadas do reagente de Benedict, hidrolisados com  $H_2SO_4$ , após o banho-maria fervente. Linhas **1.** Água destilada; **2.** Meio VM; **3.** Meio VM contendo sacarose 2%; **4.** Meio VM contendo bagaço de cana-de-açúcar 10% pré-tratado com calor; **5.** Meio VM acrescido de serragem 10%, pré-tratado com calor; **6.** Meio VM acrescido de bagaço de cana-de-açúcar 10%, pré-tratado com calor e hidrólise ácida; **7.** Meio VM acrescido de serragem 10%, pré-tratado com calor e hidrólise ácida.

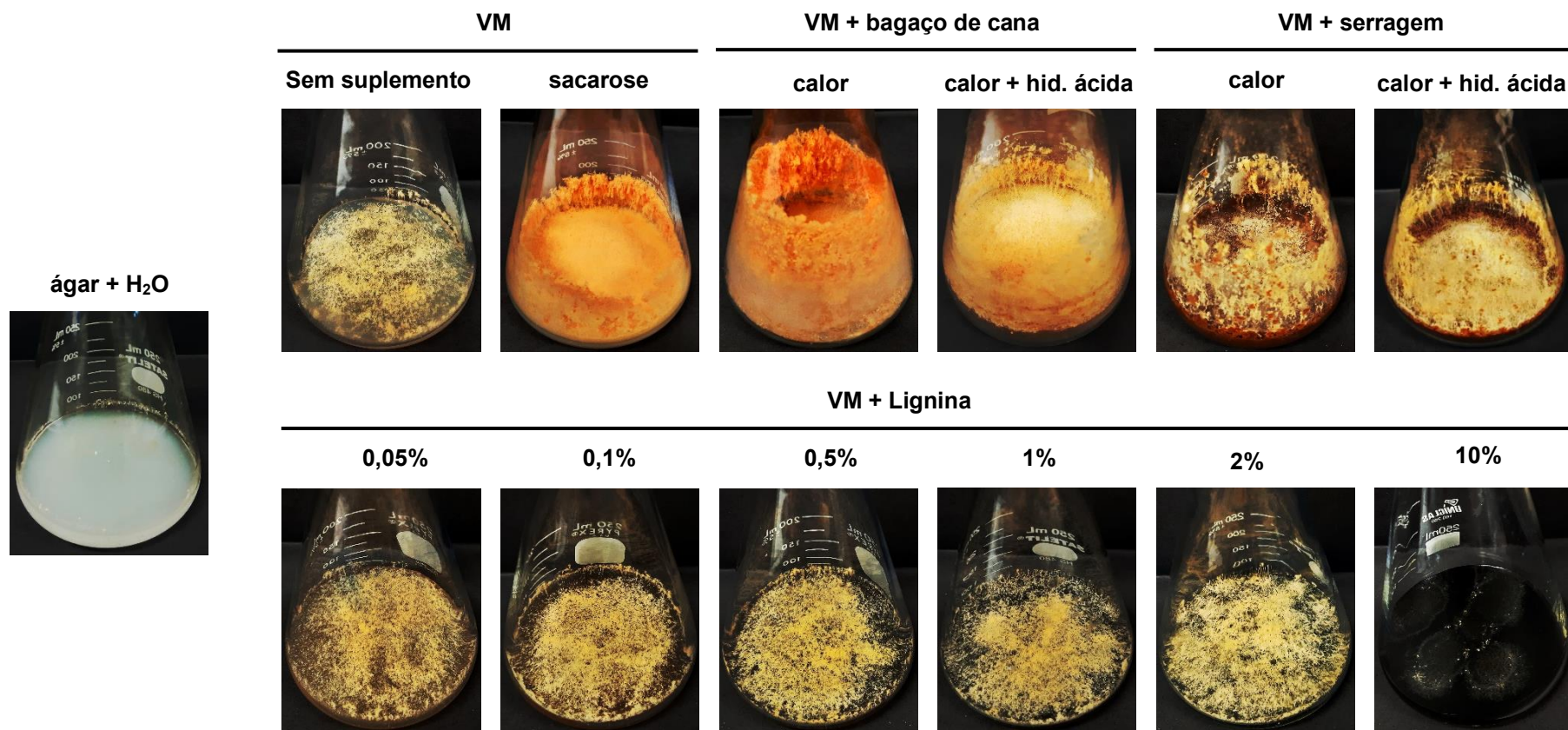
**FONTE:** Autoria própria.

A fim de observarmos a capacidade de *N. crassa* em crescer nas diferentes fontes de carbono utilizadas neste trabalho, foram obtidas culturas de 10 dias do fungo, cultivado em frascos contendo meio VM sólido, acrescido ou não com as diferentes fontes de carbono: bagaço de cana-de-açúcar 10% ou serragem 10% previamente tratados, ou lignina purificada em diferentes concentrações (0,05%; 0,1%; 0,5%, 1%, 2% e 10%). Como controle negativo para os experimentos, foram preparados frascos contendo apenas ágar e água. Como controle positivo, representando as condições de cultivo laboratoriais, usamos um frasco contendo meio VM acrescido de sacarose 2% (PERKINS *et al*, 1976).

Durante o período de cultivo, pudemos observar que no frasco contendo apenas meio VM sólido, o fungo apresentou um crescimento basal, com pouca produção de carotenóide característico dele (coloração alaranjada), que pode ser atribuído à presença da biotina nos sais de Vogel, que é a única exigência nutricional do fungo no preparo do meio sintético (Fig. 6). Para a condição na presença de bagaço de cana, é possível afirmar que o fungo consegue se desenvolver de maneira bastante satisfatória neste substrato, com formação de micélio, hifas aéreas, conídios e produção de carotenóides (Fig. 6). Para o bagaço previamente tratado com calor, o fungo alcançou um crescimento bastante semelhante ao cultivo na presença de sacarose (controle) (Fig. 6, comparar com frasco contendo sacarose). No entanto, quando o bagaço de cana foi tratado com calor acoplado a hidrólise ácida, o crescimento do fungo se mostrou prejudicado (Fig. 6, comparar com frasco contendo sacarose e frasco contendo bagaço de cana tratado com calor). Provavelmente este crescimento defectivo em relação ao substrato tratado apenas com calor se deva ao fato de que a hidrólise ácida seguida da lavagem do substrato em água corrente permitiu a remoção do açúcar residual disponível no bagaço, deixando para o fungo como fonte de carbono apenas a biomassa vegetal, que contém açúcares complexos e a lignina.

Para os meios de cultivo contendo serragem, tornou-se evidente que este substrato não é facilmente utilizado pelo fungo, tanto para a serragem tratada apenas com calor quanto para a serragem tratada com calor acoplado a hidrólise ácida (Fig. 6). Além disso, para a serragem tratada apenas com calor é necessário um tempo maior para que o fungo comece a desenvolver suas hifas e estendê-las comparado à serragem tratada com calor e hidrólise ácida (Fig. 6, comparar frascos de serragem

**Figura 6** – Desenvolvimento de hifas aéreas



Inóculos na ordem de  $10^7$  conídios de *N. crassa* foram realizadas em *Erlenmeyers* contendo meio de cultura sólido, e após 10 dias de cultivo foi observada a morfologia do seu crescimento. Meios contendo apenas ágar e água, apenas VM sem suplementação com outra fonte de carbono, VM contendo 2% de sacarose foram utilizados como controles do crescimento.

FONTE: Autoria própria.

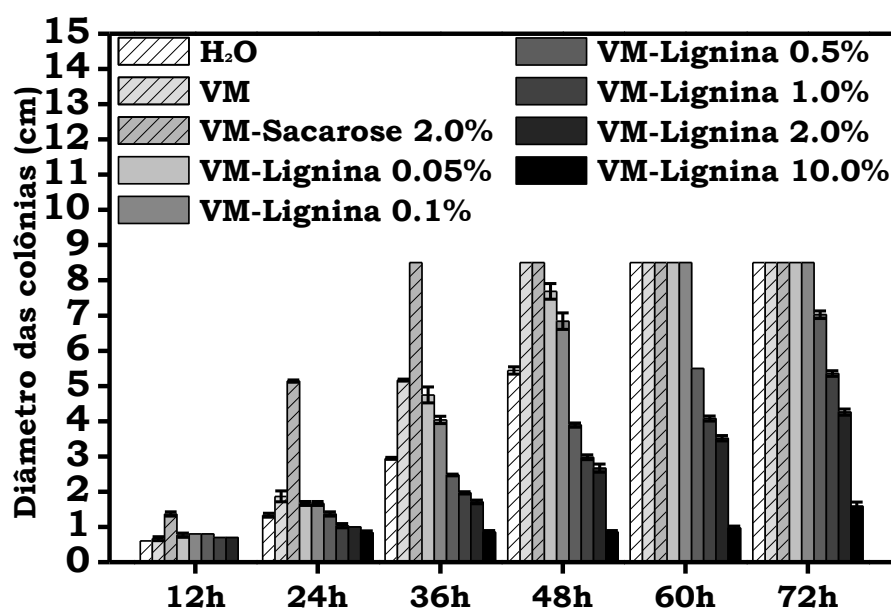
tratada). Para a serragem tratada com ácido e calor, foi possível observar a presença de algumas hifas aéreas e desenvolvimento de uma coloração laranja fraca (Fig. 6).

Quando *N. crassa* foi cultivada na presença de lignina purificada como única fonte de carbono, foi observado um crescimento defectivo do fungo comparado com as outras fontes de carbono de natureza carboidrato (Fig. 6). Com exceção do crescimento obtido na presença de lignina 10%, todos os demais crescimentos nas outras concentrações de lignina foram semelhantes: poucas hifas aéreas, baixa produção de conídios e baixa produção de carotenóide (Fig. 6), ficando estas características apenas um pouco mais acentuadas em relação ao frasco controle contendo apenas meio VM (Fig. 6, comparar frascos contendo lignina com frasco contendo meio VM). Um discreto aumento das hifas aéreas foi notado nos frascos contendo concentrações de lignina de 0,1%, 0,5% e 1,0%, talvez por também estarmos aumentando a disponibilidade de nutrientes para o fungo se desenvolver (Fig. 6, comparar os frascos contendo lignina 0,1%, 0,5% e 1,0% com o frasco contendo apenas meio VM). Para a concentração de lignina de 10%, foi possível observarmos que esta concentração é aparentemente tóxica para o fungo e permite apenas um pequeno desenvolvimento basal da colônia, provavelmente por estar causando um alto estresse oxidativo para o organismo em questão (Fig. 6). Juntos, estes resultados mostraram que *N. crassa* é capaz de utilizar biomassa vegetal para crescer de maneira eficiente, tendo uma maior preferência para biomassa proveniente das gramíneas. Além disso, *N. crassa* também se mostrou capaz de crescer na presença de lignina como única fonte de carbono, porém em baixas concentrações deste polímero.

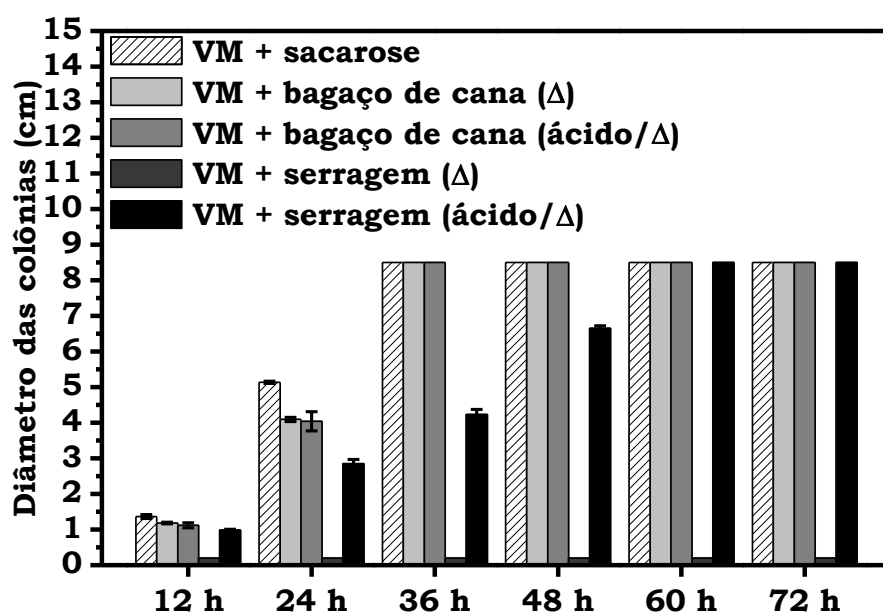
Prosseguimos com nossos ensaios analisando o crescimento radial do fungo nos diferentes substratos e as morfologias das colônias e hifas basais obtidas nos diferentes meios de cultivo, com o auxílio de um microscópio trinocular (lupa). Para os ensaios de crescimento radial, foi possível observarmos disparidades nos raios das colônias obtidas nos diferentes meios de cultivo (Fig 7). As colônias formadas na presença das biomassas vegetais e seus diferentes tratamentos encontram-se nas Figuras 7 e 8 e também na Tabela 2. Para o substrato serragem, quando esta foi tratada somente com calor, não foi possível observar extensão das hifas basais durante as 72 h de cultivo (Fig. 7 e 8). O contrário pode ser observado para a serragem tratada com calor acoplado a hidrólise ácida, onde as hifas basais se estenderam até a borda da placa, mesmo que em baixo número, após 24h de cultivo (Fig. 8).

**Figura 7** – Diâmetro das colônias de *N. crassa* na presença de diferentes fontes de carbono

**A**



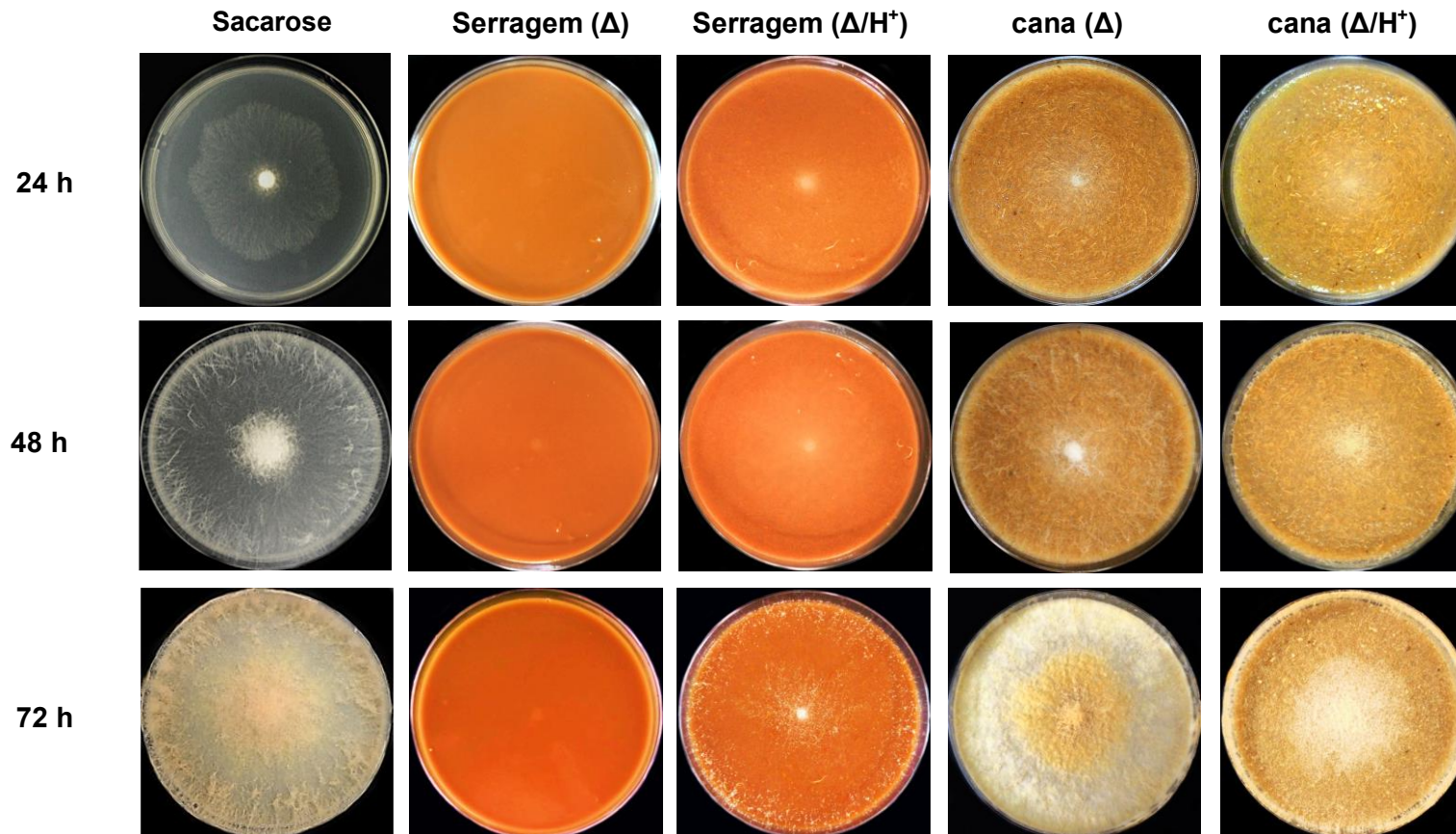
**B**



Conídios de uma linhagem selvagem de *N. crassa* foram inoculados na ordem de  $10^4$  conídios em meio VM sólido acrescido de diferentes substratos conforme previamente descrito. **A.** Crescimento radial de *N. crassa* na presença apenas de ágar e água, meio VM sem adição de fonte de carbono, VM acrescido de sacarose como controles e VM acrescido de lignina 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 10%. **B.** Crescimento radial de *N. crassa* na presença de sacarose (controle), bagaço de cana e serragem após tratamento térmico (Δ) e térmico acoplado à hidrólise ácida (Δ/H+).

**FONTE:** Autoria própria.

**Figura 8** – Crescimento radial das colônias de *N. crassa* na presença de bagaço de cana-de-açúcar e serragem.



Conídios de uma linhagem selvagem de *N. crassa* foram inoculados na ordem de  $10^4$  conídios em meio VM sólido acrescido de diferentes substratos conforme previamente descrito. Crescimento radial das colônias de *N. crassa* na presença de sacarose (controle), bagaço de cana e serragem após tratamento térmico ( $\Delta$ ) e térmico acoplado à hidrólise ácida ( $\Delta/H^+$ ).

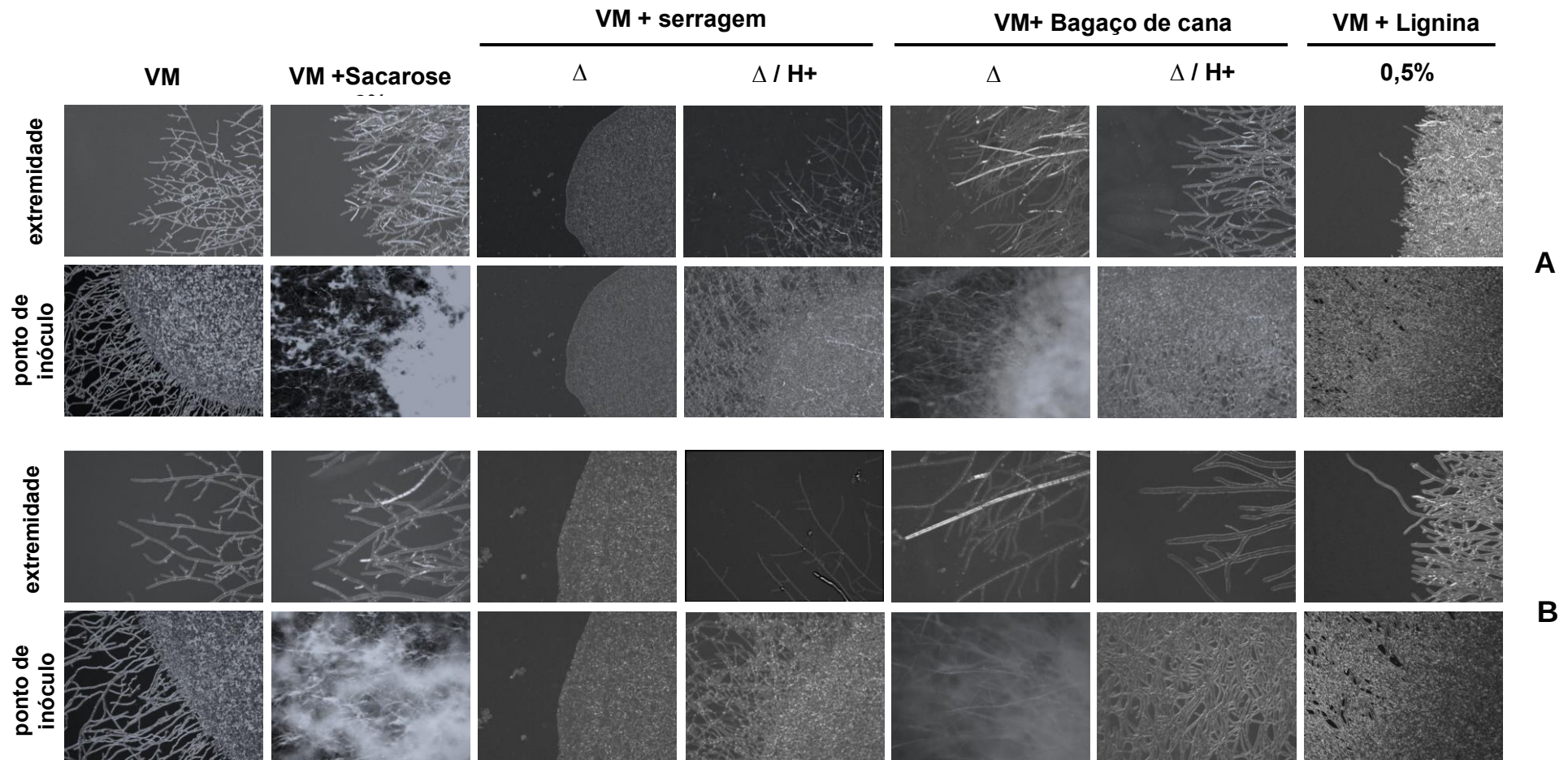
**FONTE:** Autoria própria.

**Tabela 2** – Crescimento de *N. crassa* na presença de bagaço de cana-de-açúcar e serragem.

| Meios de cultivo               | Período                                                         |                                                                                                    |                                                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                                | 24 h                                                            | 48 h                                                                                               | 72 h                                                              |
| VM + Sacarose                  | Volume de hifa bastante denso com início da extensão das mesmas | Rápida extensão das hifas com um volume grande                                                     | Houve conidiação com um volume alto de hifas                      |
| VM + 10% bagaço de cana        | Volume de hifa bastante denso com início da extensão das mesmas | Rápida extensão das hifas com um volume grande                                                     | Grande volume de hifas com conidiação (coloração laranja intensa) |
| VM + Cana tratamento ácido     | Volume de hifa bastante denso com início da extensão das mesmas | Rápida extensão das hifas com um volume grande                                                     | Houve conidiação com um volume alto de hifas                      |
| VM + Serragem                  | Não houve surgimento de hifas                                   | Não houve surgimento de hifas                                                                      | Não houve surgimento de hifas                                     |
| VM + Serragem tratamento ácido | Poucas hifas e início tímido da extensão de hifas               | Ainda com poucas hifas ralas e extensão de hifas menor em relação a cana e ao controle de sacarose | Aumento na densidade das hifas e extensão até a borda da placa    |

**FONTE:** Autoria própria.

**Figura 9** – Extremidades das hifas após o cultivo do fungo em diferentes fontes de carbono.



Inóculos de  $10^4$  células foram realizados nos diferentes meios de cultivo e as hifas foram observadas por microscopia de contraste diferencial (DIC) como descrito em Materias e Métodos. **(A)** 32 x de aumento; **(B)** 80 x de aumento

**FONTE:** Autoria própria.

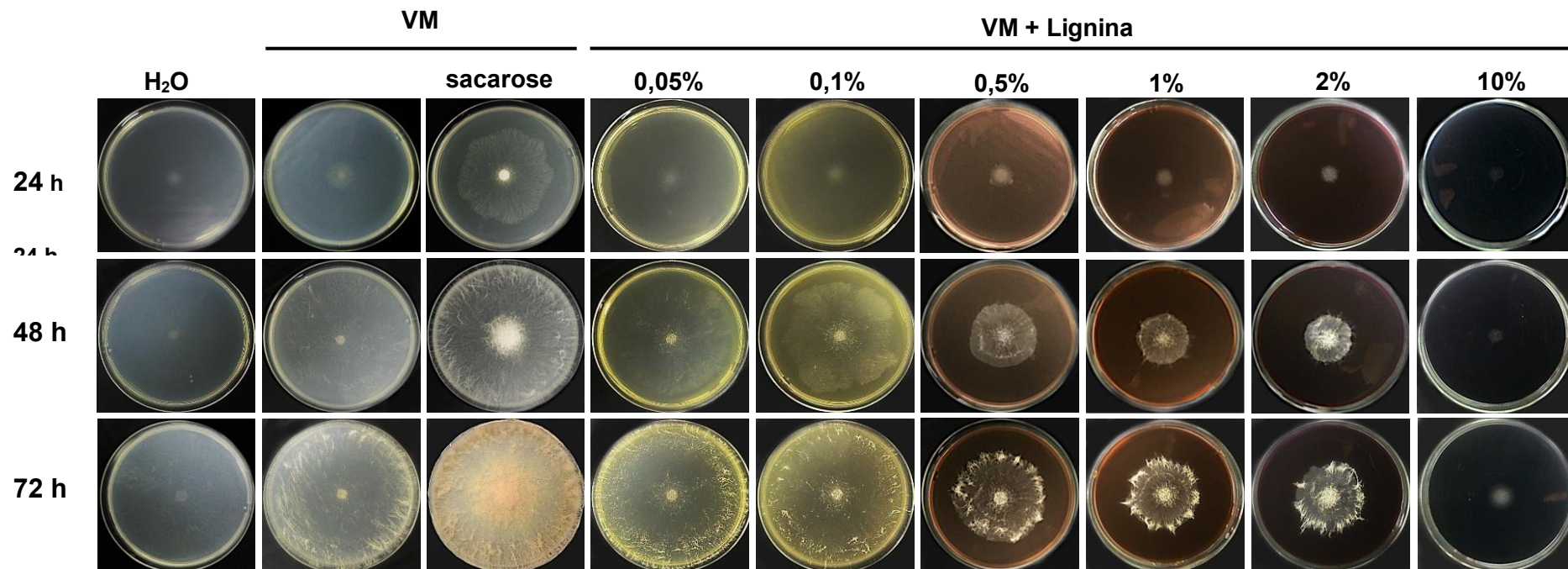
Para o bagaço de cana, quando este foi tratado apenas com calor ou calor acoplado a hidrólise ácida (Fig. 7 e 8), o fungo foi capaz de estender suas hifas basais em ambas as condições de cultivo. Além disso, a extensão das hifas basais ocorreu ligeiramente antes para a cana tratada apenas com calor, quando comparado à cana tratada com calor e ácido (Fig. 7 e 8). O número de hifas para o bagaço tratado apenas com calor também mostrou ser superior ao bagaço tratado com calor e ácido (Fig. 7 e 8).

Comparando os resultados obtidos para as biomassas vegetais e seus tratamentos, temos que *N. crassa* cultivada na presença de serragem apresentou um desenvolvimento micelial menor e mais lento, sobretudo quando a madeira foi tratada com calor acoplado a hidrólise ácida e praticamente nenhum crescimento durante as 72 h, para a serragem tratada apenas com calor (Fig. 7 e 8). Considerando o crescimento do fungo na presença de sacarose como sendo a condição ideal de cultivo em laboratório, concluímos que a serragem, de maneira geral, constitui um substrato mais difícil de ser utilizado pelo fungo do que a cana de açúcar e que seu crescimento neste tipo de biomassa só se torna possível quando o mesmo sofre tratamento prévio de calor acoplado a hidrólise ácida, confirmando os resultados obtidos inicialmente para os cultivos em frascos (Fig. 6)

Para o fungo cultivado na presença de diferentes concentrações de lignina, foi possível observarmos um padrão de crescimento e de extensão de hifas basais totalmente diferente daquele observado para as fontes de carbono complexas (Fig. 7 e 10 e Tabela 3). O desenvolvimento micelial torna-se prejudicado progressivamente, de acordo com o aumento da concentração de lignina, mostrando que este substrato, quando na sua condição purificada, interfere diretamente no crescimento do fungo. Para as concentrações de 0,05% e 0,1% de lignina nos meios (Fig. 10), o fungo foi capaz de estender suas hifas de maneira mais significativa, porém de forma mais lenta e menor em comparação ao fungo inoculado na presença de sacarose (Fig. 10) e com um ritmo muito parecido ao fungo inoculado no controle contendo apenas VM (Fig. 10), porém com uma quantidade de hifas maior do que neste último (Fig. 10).

Ao aumentarmos a concentração de lignina para 0,5%, 1% e 2%, observamos que o fungo apresentou uma morfologia diferente das observadas para as concentrações mais baixas (Fig. 10). Nestas concentrações, o crescimento também diminuiu de acordo com o aumento da concentração de lignina, porém a quantidade

**Figura 10** – A presença de lignina no meio de cultivo interfere no crescimento de *N. crassa*.



Conídios de uma linhagem selvagem de *N. crassa* foram inoculados na ordem de  $10^4$  conídios em meio VM sólido acrescido de diferentes substratos conforme previamente descrito. Crescimento radial das colônias de *N. crassa* na presença apenas de ágar e água, meio VM sem suplementação de fonte de carbono, VM suplementado com sacarose como controles e VM acrescido de lignina 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 10%.

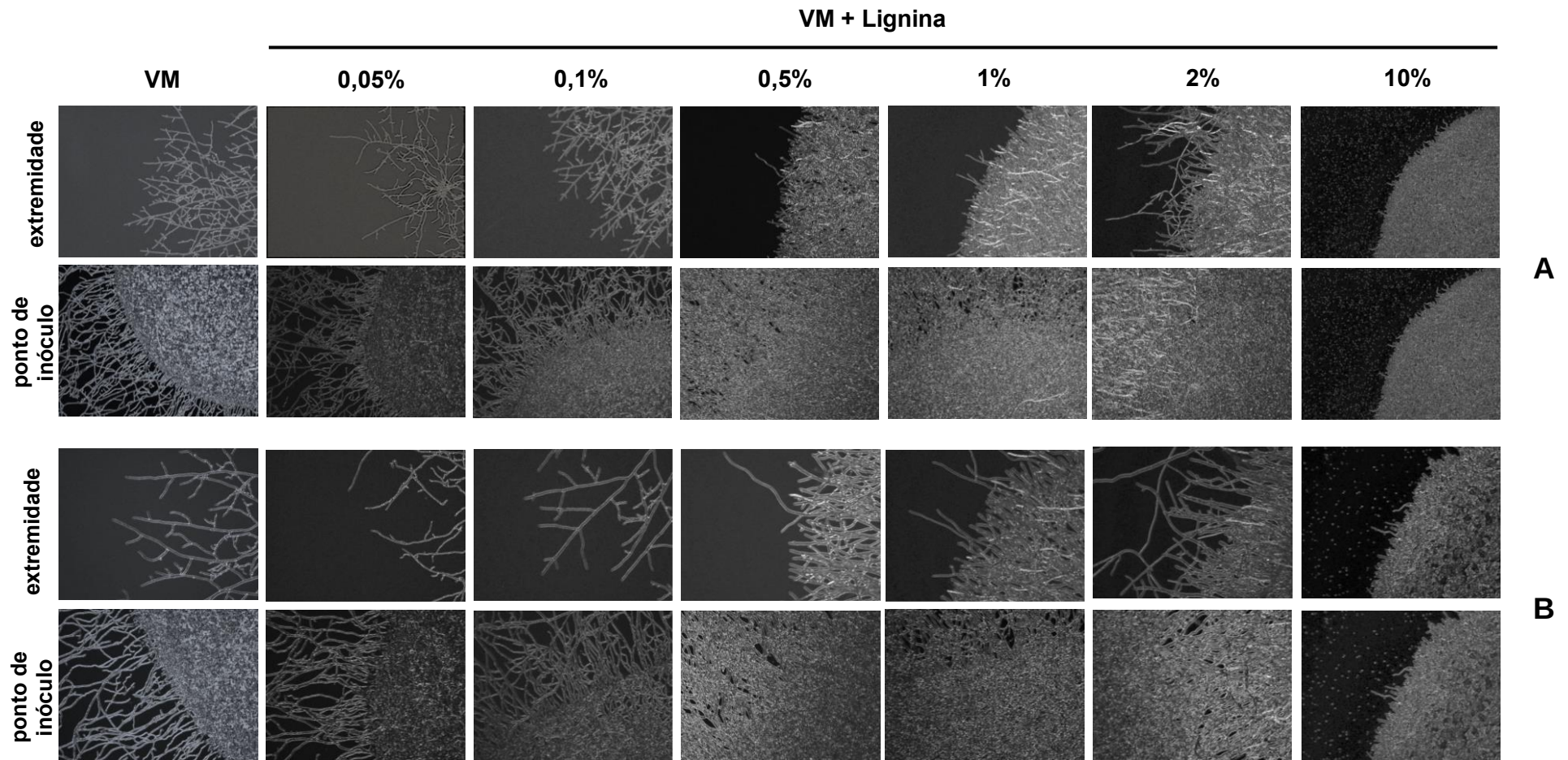
**FONTE:** Autoria própria.

**Tabela 3** – Crescimento de *N. crassa* na presença de diferentes concentrações de lignina.

| Meios de cultivo                  | Período                                                                                                                              |                                                                                                                                                  |                                                                                                          |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | 24 h                                                                                                                                 | 48 h                                                                                                                                             | 72 h                                                                                                     |
| H <sub>2</sub> O                  | Poucas hifas com muito pouco volume, praticamente não há hifas visíveis a olho nu (crescimento basal) e não houve extensão das hifas | Poucas hifas com muito pouco volume, praticamente não há hifas visíveis a olho nu (crescimento basal)                                            | Poucas hifas com muito pouco volume, praticamente não há hifas visíveis a olho nu (crescimento basal)    |
| VM sem adição de fonte de Carbono | Poucas hifas, com pouco volume, porém visíveis e com pequena extensão das hifas                                                      | Poucas hifas, com pouco mais de volume e visibilidade, com significativa extensão das hifas                                                      | Quantidade maior de hifas com um volume baixo porém maior em relação ao período anterior e sem conidiar. |
| VM + Sacarose                     | Volume de hifa mais denso em relação as outras condições com boa extensão das hifas.                                                 | Rápida extensão das hifas com um volume grande                                                                                                   | Houve conidiação com um volume alto de hifas                                                             |
| VM + 0,05% de lignina             | Poucas hifas, com pouco volume, porém visíveis e com pequena extensão das hifas                                                      | Poucas hifas, com pouco mais de volume e visibilidade, com significativa extensão das hifas                                                      | Quantidade maior de hifas com um volume baixo porém maior em relação ao período anterior e sem conidiar  |
| VM + 0,1% de lignina              | Poucas hifas, com pouco um pouco maior em relação a concentração mais baixa de lignina (0,05%), e com pequena extensão das hifas     | Ainda com poucas hifas e com volume mais significativo que a concentração anterior (0,05%), porém com extensão de hifas menor em relação a mesma | Com extensão das hifas até a borda da placa e aumento no volume, também maior do que me 0,05% de lignina |
| VM + 0,5% de lignina              | Poucas hifas com pequena extensão das mesmas                                                                                         | Hifas com volume maior em relação as concentrações de 0,05% e 0,1% com uma extensão de hifas menor                                               | Aumento na extensão das hifas, ainda menor em relação do que em 0,05% e 0,1%, porém com volume maior     |
| VM + 1% de lignina                | Poucas hifas com pequena extensão das mesmas                                                                                         | Hifas ainda com mais volume, porém com extensão menor em relação as concentrações mais baixas                                                    | Hifas ainda com mais volume, porém com extensão menor em relação as concentrações mais baixas            |
| 2%                                | Poucas hifas com pequena extensão das mesmas                                                                                         | Hifas ainda com mais volume, porém com extensão menor em relação as concentrações mais baixas                                                    | Hifas ainda com mais volume, porém com extensão menor em relação as concentrações mais baixas            |
| 10%                               | Sem nenhum desenvolvimento de hifas                                                                                                  | Desenvolvimento de poucas hifas apenas no local do inóculo, sem extensão                                                                         | Extensão tímida das hifas e com baixo volume                                                             |

**FONTE:** Autoria própria.

**Figura 11** – Extremidades das hifas após o cultivo do fungo em diferentes fontes de carbono



Inóculos de  $10^4$  células foram realizados nos diferentes meios de cultivo e as hifas foram observadas por microscopia de contraste diferencial (DIC) como descrito em Materias e Métodos (**A**) 32 x de aumento; (**B**) 80 x de aumento. **FONTE:** Autoria própria..

de hifas obtidas foi maior e apresentaram morfologia bem diferente em relação aos resultados obtidos nas condições controles (Fig. 10, comparar placas com crescimento na presença de ágar e água, VM sólido e VM sólido acrescido de sacarose). Por fim, na presença de lignina 10%, o fungo praticamente não apresentou crescimento colonial, com uma extensão da hifa basal bastante retardada em relação às demais concentrações (Fig 10).

A morfologia das hifas também foi observada com o auxílio de uma lupa (Fig. 9 e 11). Quando *N. crassa* foi cultivada na presença de apenas de meio VM, foram observadas hifas basais finas, ramificadas e em baixo número, mostrando que mesmo que o fungo tenha conseguido estender suas hifas até a borda da placa ao fim das 72 h, tratavam-se apenas de hifas de crescimento basal, com uma morfologia afetada pela privação de nutrientes, uma vez que o meio de cultivo não está adicionado de fonte de carbono (Fig. 9, comparar com crescimento em VM + sacarose). Para *N. crassa* cultivada na presença de serragem tratada com calor acoplado à hidrólise ácida, foi possível observar que as hifas estendidas se mostraram bastante delgadas e pouco ramificadas (Fig. 9, comparar com crescimento em VM + sacarose), enquanto que para serragem tratada apenas com calor, não foi observado a extensão de hifas no período analisado (Fig. 9). No entanto, as hifas produzidas pelo fungo cultivado na presença de bagaço de cana, independente da forma de tratamento prévio, foram muito semelhantes as encontradas para o fungo cultivado na presença de sacarose (Fig. 9, comparar com crescimento em VM + sacarose). Para *N. crassa* cultivada na presença de concentrações crescentes de lignina (Fig. 11), foi observado que embora as hifas não tenham se estendido da mesma maneira que na condição controle (meio VM + sacarose), ou seja, tenham se mostradas mais curtas, estas se mostraram bastante ramificadas e com espessura ligeiramente menor que da condição controle (VM + sacarose) (Fig. 9). O número de hifas parece também ter aumentado proporcionalmente ao aumento da concentração de lignina, até a concentração de 2% (Fig. 11). Para a concentração de 10% de lignina, houve pouca formação de hifas basais, predominando hifas aéreas e em pouca quantidade, sugerindo que em altas concentrações, a lignina apresenta um efeito inibitório sobre o desenvolvimento micelial do fungo, provavelmente por estar desencadeando algum tipo de estresse oxidativo nas células (Fig. 11).

A fim de confirmarmos o efeito inibitório da lignina sobre o crescimento do fungo, analisamos a extensão apical das hifas basais em *race tubes* contendo meio

VM acrescido das diferentes concentrações de lignina (Fig. 12). Os resultados obtidos demonstraram que quando o fungo é cultivado em concentrações elevadas de lignina, a taxa de extensão das hifas basais diminui drasticamente a medida que a concentração de lignina aumenta, confirmando nossa hipótese de que a lignina em excesso é prejudicial ao desenvolvimento do fungo.

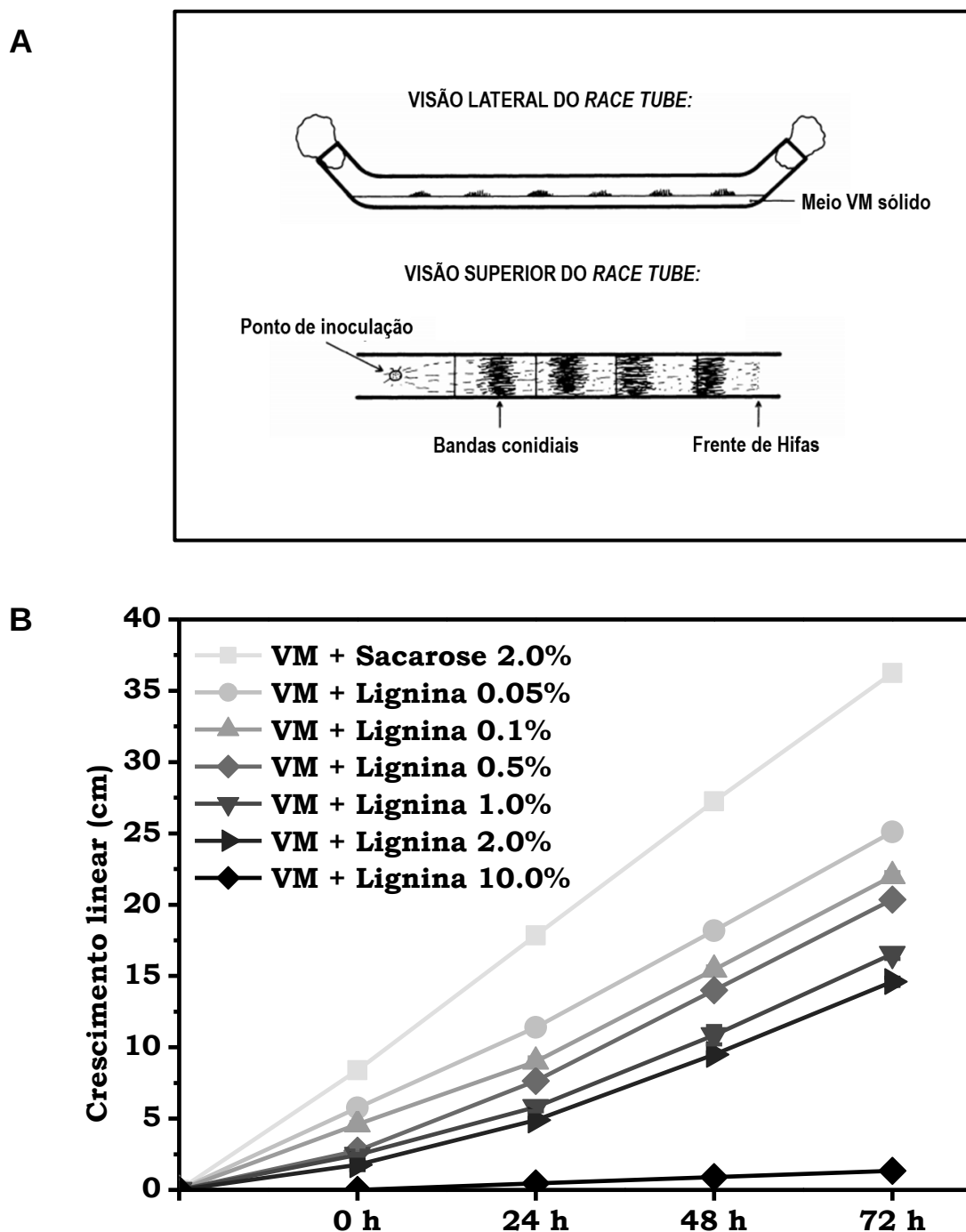
Juntos, os resultados das análises morfológicas mostraram que *N. crassa* é capaz de se desenvolver de maneira eficiente em fontes alternativas de carbono, como a serragem e o bagaço de cana, preferencialmente após o tratamento destes substratos com altas temperaturas acopladas à hidrólise ácida. Contudo, quando cultivada na presença de lignina purificada, *N. crassa* apresentou um crescimento prejudicado pelas concentrações crescentes deste polímero. Uma vez que nosso principal objetivo neste trabalho é identificar enzimas lignolíticas capazes de modificar ou degradar a lignina presente na serragem ou bagaço de cana, adotamos como substratos para o cultivo do fungo e determinação dos secretomas lignolíticos, o bagaço de cana de açúcar e a serragem previamente tratados com calor acoplado a hidrólise ácida e lignina purificada nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%.

## **5.2 *N. crassa* secreta proteínas na presença de serragem, bagaço de cana de açúcar e lignina purificada**

Para padronizar o crescimento do fungo nas diferentes fontes de carbono, conídios foram cultivados em meio VM contendo sacarose (controle), bagaço de cana-de-açúcar e serragem previamente tratados com calor e/ou ácido, e lignina comercial. Os meios de cultivo foram coletados por filtração após diferentes tempos de incubação e as proteínas totais secretadas foram concentradas usando TCA/Acetona e quantificadas. Amostras contendo aproximadamente 30 µg de proteínas totais secretadas foram separadas por SDS-PAGE 12% e reveladas com nitrato de prata. Após a revelação dos géis, foi possível estabelecer um perfil de degradação específico para cada condição de crescimento analisada, comparando os géis obtidos a partir do fungo cultivado nos diferentes substratos.

Quando *N. crassa* é cultivada na presença de bagaço de cana como fonte de carbono (Fig. 13), bandas de proteínas secretadas especificamente para este substrato, tanto após o tratamento com calor (Fig. 13B), quanto após o tratamento acoplado calor à hidrólise ácida (Fig. 13C) puderam ser visualizadas, comparado ao

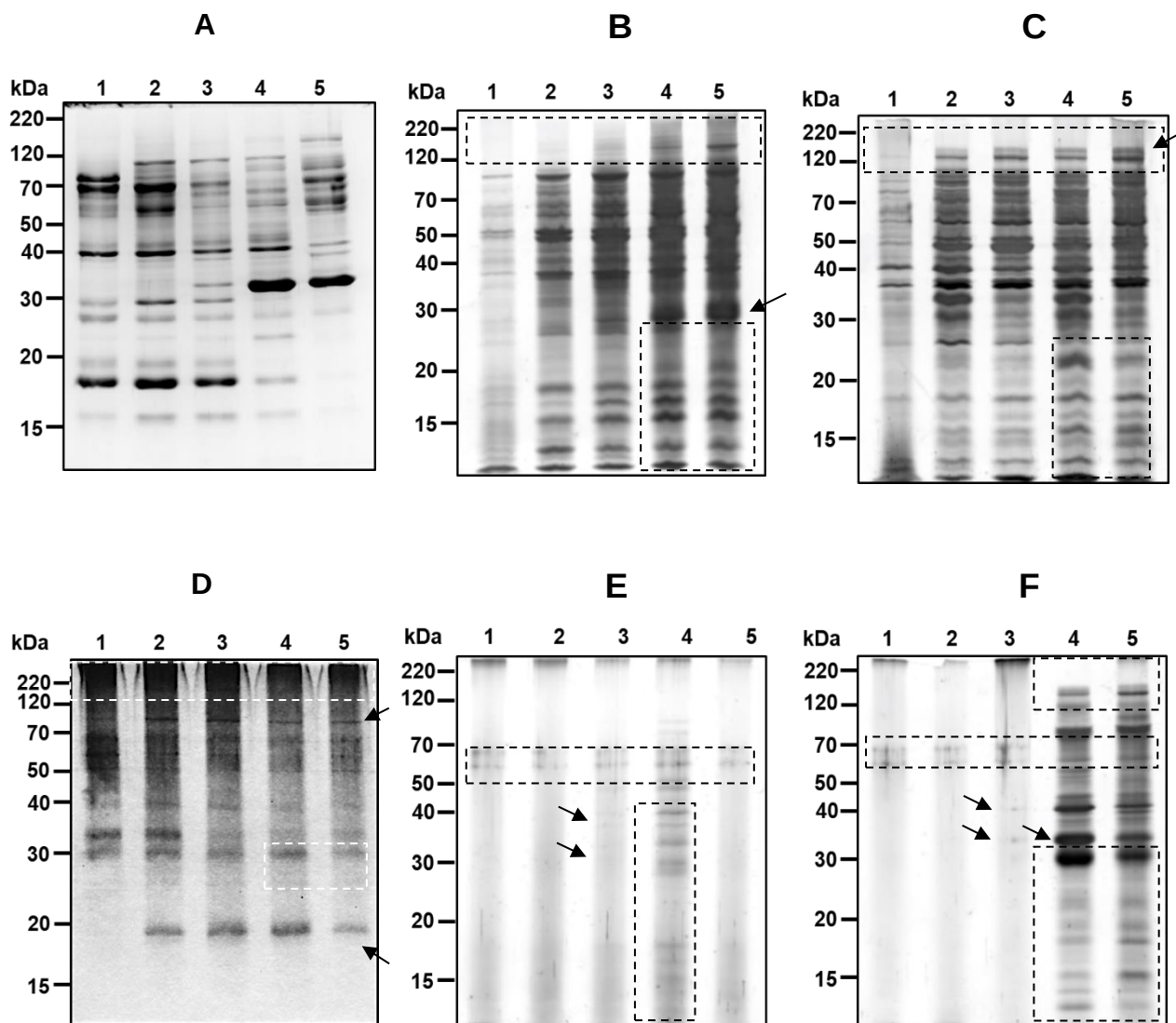
**Figura 12** – Extensão apical das hifas basais em *race tubes*.



Conídios de uma linhagem selvagem de *N. crassa* foram inoculados na ordem de  $10^4$  em meio VM sólido acrescido de diferentes concentrações de lignina e o crescimento foi comparado ao controle (sacarose). (A) Esquema de representação do ensaio em *race tubes* indicando onde foram realizadas as medidas das extensões de hifas; (B) Taxa de crescimento linear das hifas de *N. crassa* nas diferentes concentrações de lignina.

**FONTE:** (A) Adaptado de FELDMAN, J (1983); (B) Autoria própria.

**Figura 13** – Proteínas secretadas pelo fungo *N. crassa* em diferentes substratos lignocelulolíticos.



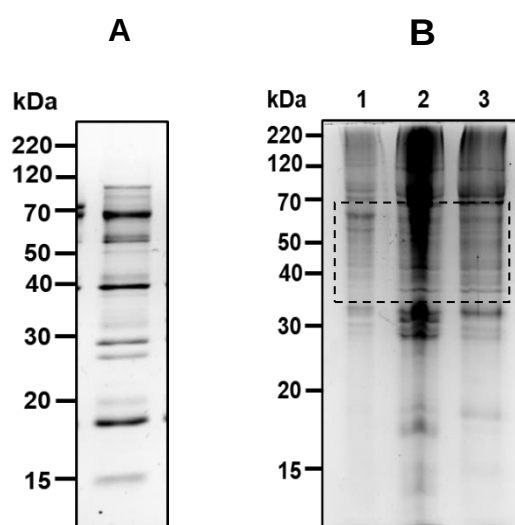
Análise por eletroforese em géis de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE) das proteínas secretadas por *N. crassa* quando (A) cultivada na presença de sacarose 2% como fonte de carbono (controle), (B) cultivada na presença de bagaço de cana pré-tratado com alta temperatura, e (C) cultivada na presença de bagaço de cana pré-tratado com alta temperatura acoplada a hidrólise ácida, (D) cultivada na presença 10% lignina; (E) cultivada na presença de serragem pré-tratada com alta temperatura; (F) cultivada na presença de serragem pré-tratada com alta temperatura acoplada a hidrólise ácida. As linhas identificadas acima de cada gel correspondem aos períodos das coletas: 1. Um dia; 2. Quatro dias; 3. Uma semana; 4. Duas semanas; 5. Quatro semanas. Os géis foram corados com prata e as demarcações das massas moleculares ao lado dos géis foram orientadas mediante o uso do padrão molecular BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies). As setas apontam para as proteínas que foram secretadas de maneira específica.

**FONTE:** Autoria própria

controle (Figura 13A), sugerindo que na presença deste substrato, enzimas do complexo lignocelulolítico são secretadas para que o fungo modifique a lignina e tenha acesso às fontes de carbono fermentescíveis (celulose e hemiceluloses). Além disso, foi observado que o tratamento ácido da biomassa vegetal favoreceu uma maior secreção de proteínas provavelmente envolvidas na desconstrução da parede vegetal fragilizada, uma vez que um maior número de bandas de alta massa molecular foi observado logo para as primeiras 24 h de cultivo do fungo (Figura 13C). Para *N. crassa* cultivada presença de serragem tratada com calor ou calor acoplado à hidrólise ácida como fonte de carbono, bandas de proteínas específicas para este tipo de substrato também puderam ser observadas após 2 semanas de incubação (Figura 13, comparar géis E e F com o gel A). No entanto, apenas quando a serragem foi tratada com hidrólise ácida é que bandas de alta e baixa massa molecular puderam ser observadas serem secretadas em maior quantidade após 2 e 4 semanas de cultivo (Figura 13F, linhas 4 e 5), sugerindo que para este tipo de substrato (madeira macia ou dura), o tratamento ácido é importante para a secreção de proteínas provavelmente para a desconstrução da parede vegetal. Para *N. crassa* cultivada na presença de 10 % de lignina purificada como única fonte de carbono, bandas de proteínas secretadas especificamente para este substrato puderam ser observadas nos diferentes tempos de cultivo (Figura 13, comparar géis A e D), sobretudo proteínas de altas massas moleculares e de massas moleculares entre 20 e 40 kDa (Figura 13D).

Uma vez que os ensaios morfológicos apontaram que *N. crassa* é capaz de crescer de maneira satisfatória em baixas concentrações de lignina (0,5%, 1% e 2%) cultivamos o fungo em meio VM Líquido acrescido das referidas concentrações de lignina durante 4 dias e analisamos seus secretomas por SDS-PAGE (Fig. 14B). Os resultados obtidos mostraram que o padrão de bandas proteicas é muito semelhante nas três condições testadas. Sendo assim, para eliminarmos uma possível contaminação por lignina nas amostras a serem submetidas para as análises de espectrometria de massas e minimizar o surgimento de bandas de proteínas possivelmente relacionadas apoptose devido à toxicidade deste polímero, escolhemos a concentração de 0,5% lignina para dar continuidade com a determinação do secretoma do fungo.

**Figura 14** – Proteínas secretadas pela *N. crassa* na presença de lignina purificada em diferentes concentrações



As proteínas secretadas após 4 dias de cultivo do fungo na presença de lignina foram analisadas por SDS-PAGE 12%, em tampão Tris-glicina 1x. **(A)** controle (sacarose 2%), **(B)** secretomas obtidos após o cultivo do fungo nas concentrações de lignina de 0,5% (linha 1), 1% (linha 2) e 2% (linha 3). **kDa**- padrão de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies).

**FONTE:** autoria própria

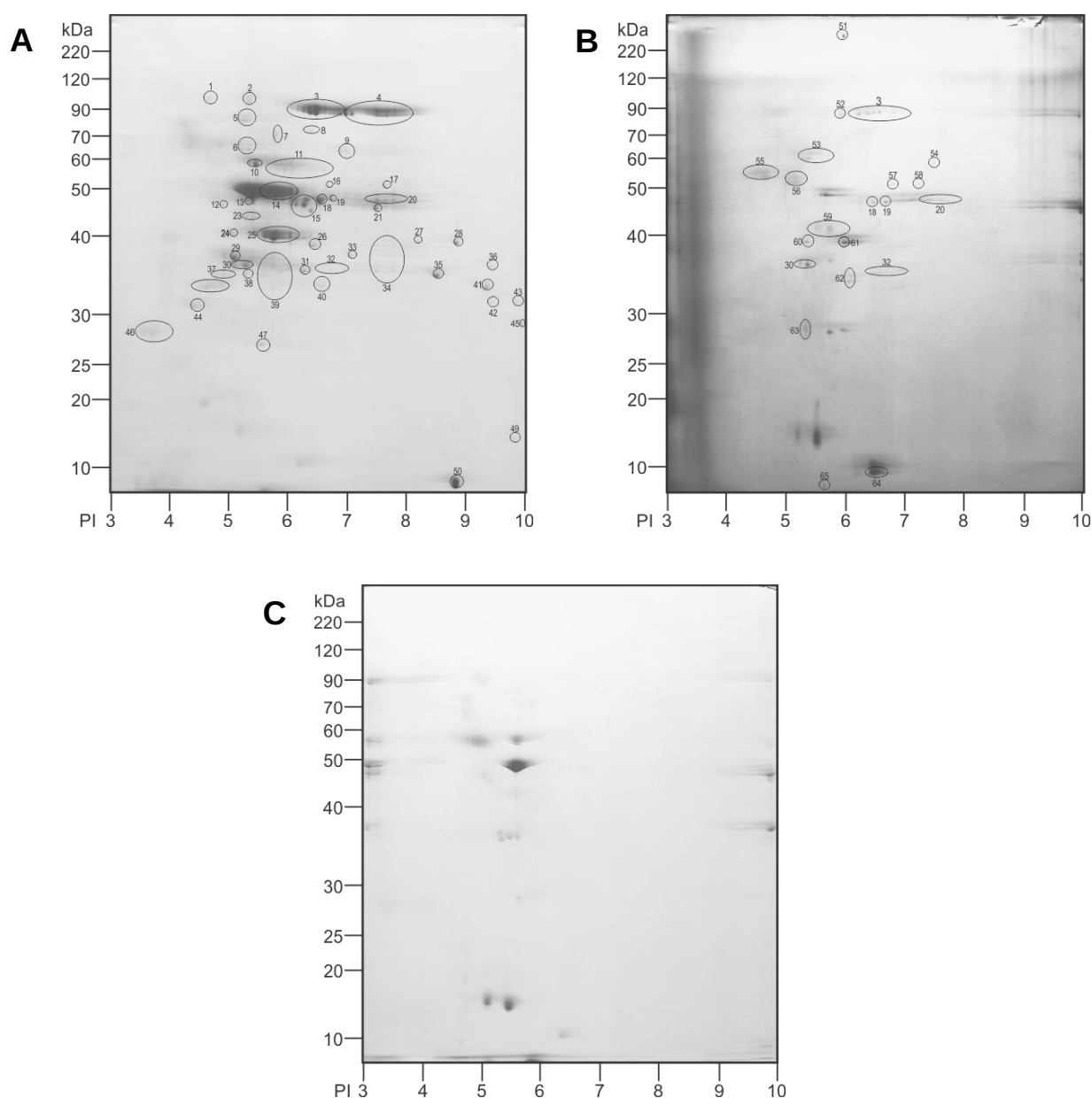
### 5.3 Análise das proteínas de *N. crassa* expressas nas diferentes fontes de carbono

Para analisar as proteínas diferencialmente expressas por *N. crassa* nas fontes de carbono alternativas escolhidas, foram selecionados os extratos proteicos preparados a partir das culturas do fungo em bagaço de cana ou serragem, cujas proteínas secretadas foram detectadas nos géis de SDS-PAGE (Fig. 13). O nosso objetivo neste ensaio foi o de analisar as proteínas que são secretadas quando o fungo é cultivado na presença de cana de açúcar tratado com calor e com calor acoplado à hidrólise ácida (Fig. 13B e 13C). Para a serragem, analisamos apenas as amostras provenientes dos cultivos de 1, 2 e 4 semanas, uma vez que a produção de proteínas extracelulares nesta condição se mostrou mais difícil (Fig. 13E e 13F).

Para isto, iniciamos nossas análises de 2D-PAGE comparando amostras de proteínas obtidas a partir 7 dias de cultivo do fungo na presença de bagaço de cana ou serragem, tratados com altas temperaturas. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 15. Como é possível observar na figura, foram detectados uma grande quantidade de *spots*, correspondendo a proteínas diferencialmente expressas na presença de bagaço de cana de açúcar (Fig. 15A) ou serragem (Fig. 15B) após 7 dias de cultivo, as quais não são possíveis de serem detectadas quando o fungo foi cultivado na presença de sacarose (Fig. 15C, controle) sugerindo que as mesmas estejam envolvidas na degradação da parede celular vegetal. Outra observação importante é a de que proteínas com *pI* acima de 8,0 ou *pI* abaixo de 5,0 foram detectadas apenas nos géis obtidos para as amostras de bagaço de cana tratado com calor (Fig 15A, comparar com Fig. 15C).

Proteínas diferencialmente expressas também foram detectadas para as amostras de bagaço de cana tratado com calor após 14 dias de cultivo do fungo, quando comparado com o cultivo na presença de sacarose (Fig. 16, comparar géis A e B). Para as proteínas secretadas na presença de 0,5 % de lignina foram realizadas várias tentativas de análises bidimensionais, porém sem sucesso na etapa de focalização isoeletrica, o que não nos permitiu observar proteínas expressas de maneira diferencial (Fig. 16D, comparar com Fig. 16C). Embora bandas correspondendo a proteínas secretadas na presença de lignina tenham sido visualizadas nos ensaios de padronização de crescimento do fungo (Fig. 13D e

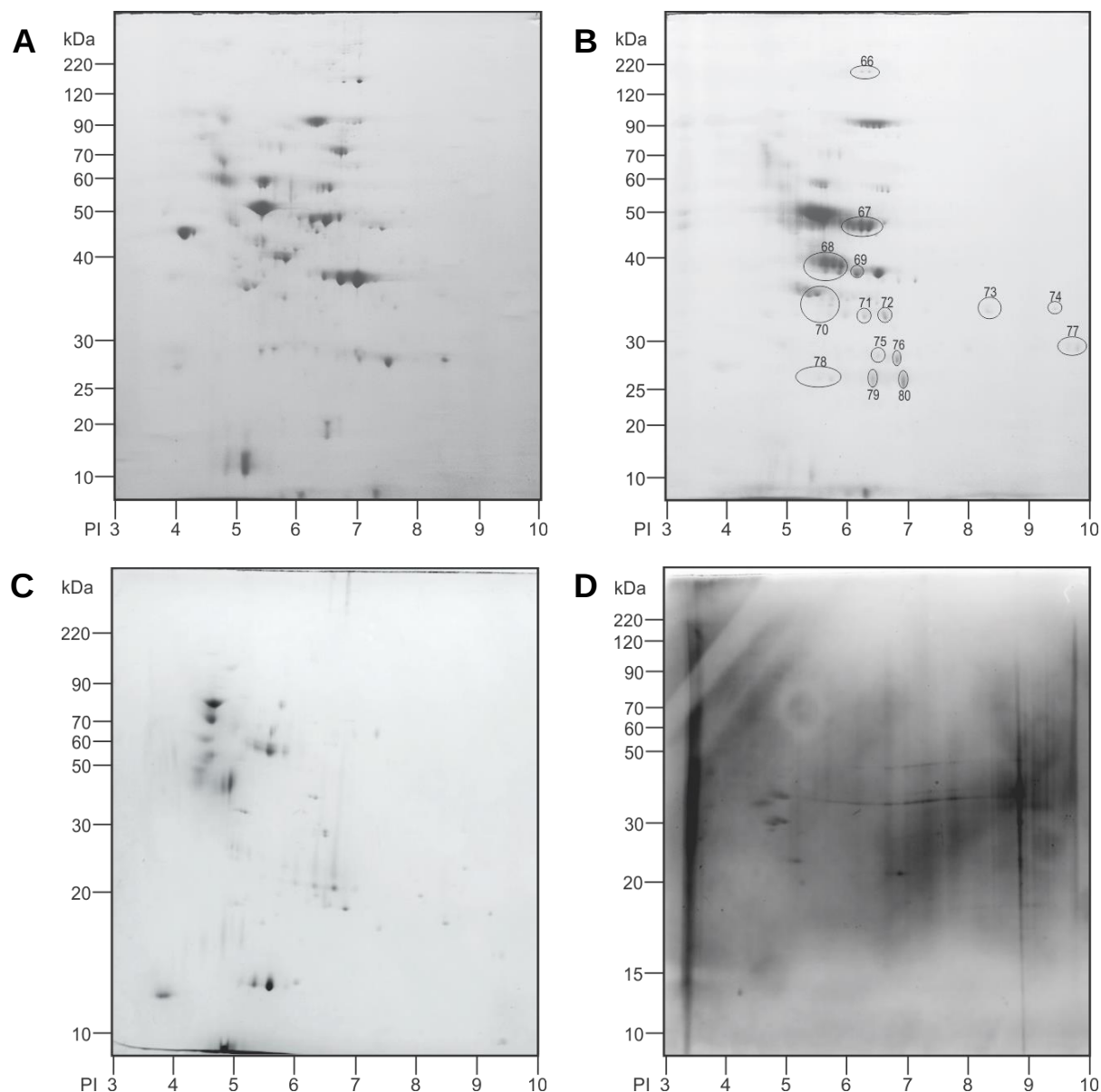
**Figura 15** – Eletroforese bidimensional das proteínas secretadas por *N. crassa* no período de sete dias, na presença de bagaço de cana de açúcar e serragem.



As proteínas totais secretadas por *N. crassa* após 7 dias de cultivo na presença de bagaço de cana (A) e serragem (B), **tratados com calor**, foram analisadas por 2D-PAGE 12,5%, tendo como controle o fungo cultivado na presença de sacarose 2% (C), conforme descrito em Materiais e Métodos. Os géis foram revelados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* ou prata e as proteínas diferencialmente expressas estão assinaladas nos círculos. As respectivas massas moleculares foram estimadas utilizando BenchMark Protein Ladder (Life Technologies) e os valores do gradiente de pH foram indicados. Cada gel representa uma das triplicatas biológicas do experimento e pelo menos três replicadas foram utilizadas para cada análise.

**FONTE:** Autoria própria.

**Figura 16** – Eletroforese bidimensional das proteínas secretadas por *N. crassa* no período de 14 dias (A e B) e quatro dias (C e D) na presença de bagaço de cana de açúcar e lignina, respectivamente.



As proteínas totais secretadas por *N. crassa* após 14 dias de cultivo na presença de bagaço de cana tratado com calor (B) e sacarose 2% (A, controle) e após 4 dias na presença de lignina 0,5% (D) e sacarose 2% (C, controle) foram analisadas por 2D-PAGE 12,5%, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os géis foram revelados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* ou prata e as proteínas diferencialmente expressas estão assinaladas nos círculos. As respectivas massas moleculares foram estimadas utilizando BenchMark Protein Ladder (Life Technologies) e os valores do gradiente de pH foram indicados. Cada gel representa uma das triplicatas biológicas do experimento e pelo menos três replicadas foram utilizadas para cada análise.

**FONTE:** Autoria própria.

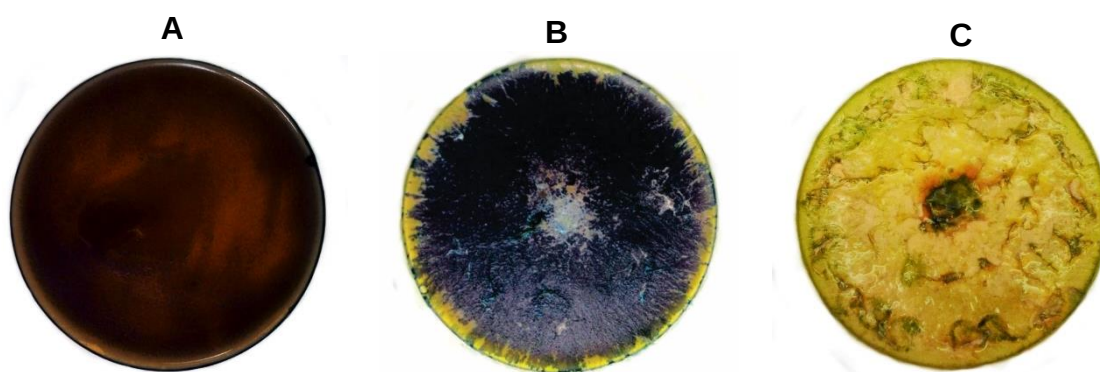
14B), as limitações impostas pela técnica de 2D-PAGE não permitiram uma focalização isoeletrica satisfatória, uma vez que diferentes métodos de precipitação e adsorção foram usados para remover a lignina das amostras proteicas precipitadas para serem submetidas a IEF, porém o *pellet* proteico ainda permanecia com coloração castanha sinalizando a presença do polímero.

#### **5.4 *N. crassa* apresenta atividade lacase específica significativa na presença de lignocelulose**

A fim de identificarmos atividade lignolítica nas culturas de *N. crassa* em substrato lignocelulósico, inicialmente realizamos um ensaio qualitativo. Os ensaios qualitativos são uma maneira simples de rastrear a produção de enzimas que degradam biomassa vegetal. Para isto, o fungo foi cultivado em placas contendo meio VM acrescido de lignina durante 10 dias e em seguida, as colônias obtidas foram banhadas com solução de ferrocianeto de potássio e cloreto férrico conforme descrito em Materiais e Métodos. A lignina modificada pelo fungo reage com o ferro/ferrocianeto dando uma coloração azul-esverdeada característica da não lignina oxidada. O resultado obtido encontra-se na Figura 17. Para a placa contendo meio VM adicionado de lignina sem inóculo, a solução de ferrocianeto/cloreto férrico não houve a formação de halo indicativo de degradação do polímero (Fig. 17A). O mesmo resultado pode ser observado, i.e., não houve detecção de halo de degradação de lignina na placa contendo meio VM contendo sacarose inoculado com o fungo (Fig. 17C). No entanto, quando *N. crassa* cresce na presença de lignina, a solução contendo ferro é capaz de reagir com a lignina não modificada formando um halo de coloração azul característica, o qual foi acompanhado de um halo incolor característico de lignina degradada ou modificada (Fig. 17B), indicando que *N. crassa* é capaz de modificar ou degradar a lignina e que, portanto, secreta enzimas lignolíticas quando cultivada na presença deste polímero como fonte de carbono alternativa.

Uma vez que *N. crassa* apresentou atividade lignolítica qualitativa, prosseguimos com a quantificação desta atividade lignolítica produzida pelo fungo cultivado na presença de biomassa vegetal ou do polímero recalcitrante purificado. A identificação de atividade lignolítica em quantidades significativas foi importante porque corroborou com nosso interesse em demonstrar que, embora *N. crassa* não seja um organismo considerado bom produtor de enzimas por não ser capaz de

**Figura 17** – Teste qualitativo para a detecção de atividades lignolíticas em cultura de *N. crassa*



O teste qualitativo para detecção de atividade enzimática lignolítica foi realizado em placa de Petri. Para isto, as colônias foram cultivadas em meio VM acrescido de lignina purificada durante 10 dias e em seguida, foram submergidas em solução fresca contendo ferrocianeto de potássio  $K_3[Fe(CN)_6]$  e cloreto férrico  $FeCl_3$ . Os fenóis na lignina não degradada marcam o meio com a cor azul esverdeada com zonas claras ao redor das colônias, indicando oxidação dos componentes fenólicos. (A) meio VM sólido suplementado 0,25% lignina e 0,2% glicose sem inóculo; (B) meio VM sólido suplementado com 0,25% lignina e 0,2% glicose, inoculado com *N. crassa*; (C) meio VM sólido suplementado com 2% sacarose, inoculado com *N. crassa*.

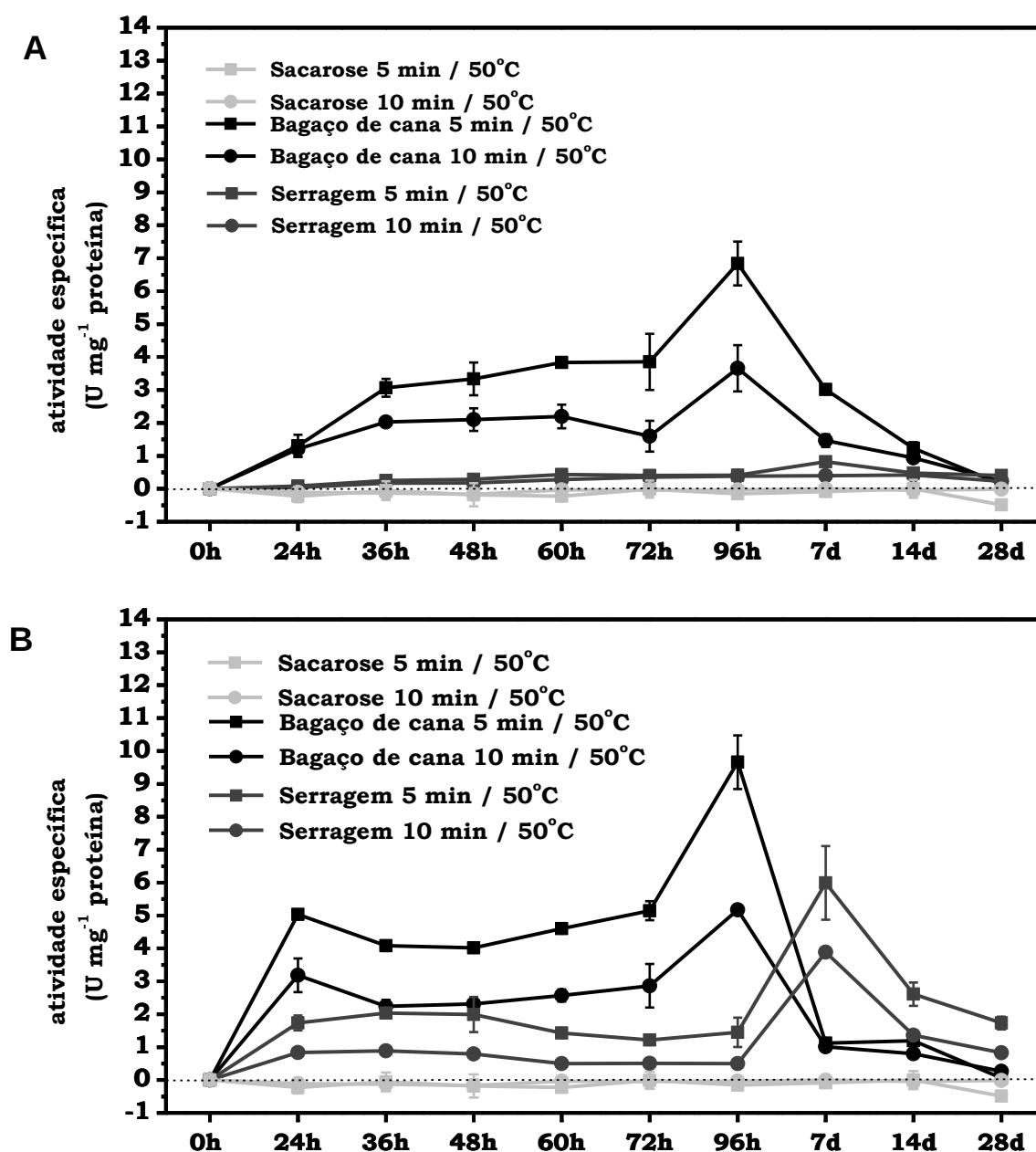
**FONTE:** Autoria própria

secretar estas proteínas em quantidades elevadas, este fungo pode ser considerado um organismo promissor para a detecção de novas enzimas de interesse biotecnológico apresentando alto valor agregado para determinadas indústrias. Para isto, selecionados dentre os possíveis ensaios enzimáticos para a detecção quantitativa de atividade lignolítica, a quantificação de atividade lacase no meio de cultura obtido a partir do cultivo do fungo nos diferentes substratos: bagaço de cana de açúcar ou serragem, tratados apenas com calor e com calor acoplado a hidrólise ácida, tendo como controle a atividade lacase determinada no caldo colhido a partir da cultura do fungo na presença de sacarose. A lignina purificada não foi possível ser usada para detecção de atividade lacase quantitativa devido a limitação da técnica, uma vez que o meio de cultivo contendo lignina é castanho escuro e o ensaio de detecção enzimática é colorimétrico (amarelo). A enzima lacase é uma glicoproteína polifenoloxidase que contém cobre no seu sítio ativo e catalisa a redução de  $O_2$  para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos. A catálise de substratos fenólicos e compostos modelos de lignina por lacases ocorre via transferência de um elétron, conduzindo à geração de radicais fenoxila, que podem ser convertidos a quinonas (LEONOWICZ *et al.*, 2001). O substrato escolhido para a detecção da atividade lacase foi a siringaldazina e a atividade lacase foi expressa como atividade específica. Os experimentos foram incubados por 5 e 10 minutos a  $50^\circ C$  a fim de verificarmos a melhor condição de ensaio.

A presença de atividade lacase foi detectada tanto nas amostras provenientes de serragem quanto nas amostras provenientes do cultivo em bagaço de cana. Para as amostras obtidas a partir do bagaço de cana, as atividades lacase foram significativas em quase todos os pontos de coleta (24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 96 h, 7 dias, 14 dias e 28 dias de cultivo) para ambas as formas de tratamento do substrato (Fig. 18, A e B). Para o bagaço tratado apenas com calor, um pico de atividade lacase foi detectado após 96 h de cultivo ( $6,84 \text{ U mg}^{-1}$  proteínas, em 5 min contra  $3,65 \text{ U mg}^{-1}$  proteínas, em 10 min) (Fig. 18A). Para o bagaço tratado com calor e hidrólise ácida, a maior atividade enzimática também foi obtida após 96 h de cultivo ( $9,65 \text{ U mg}^{-1}$  proteínas, em 5 min contra  $5,17 \text{ U mg}^{-1}$  proteínas, em 10 min) (Fig. 18B).

Para as amostras provenientes do cultivo na presença de serragem houve uma diferença mais expressiva na atividade enzimática considerando-se as duas formas de tratamento: calor e calor acoplado a hidrólise ácida. Quando as amostras foram obtidas a partir da serragem tratada apenas com calor, as atividades lacase foram

Figura 18 – Atividade Lacase.



Os experimentos de atividade lacase foram realizados utilizando siringaldazina como substrato. A oxidação da siringaldazina foi monitorada pelo aumento da absorbância a 525nm após 5 e 10 minutos de reação e a atividade específica (U mg<sup>-1</sup>) determinada pela quantidade de siringaldazina oxidada na reação por mg de proteínas totais nas amostras. **(A)** Biomassas vegetais pré-tratadas com calor; **(B)** Biomassas vegetais pré-tratadas com calor acoplado a hidrólise ácida.

Fonte: Autoria própria.

muito baixas durante todo o intervalo de cultivo (Fig. 18A). No entanto, as amostras oriundas da serragem tratada com calor acoplado a hidrólise ácida apresentaram um pico de atividade lacase significativo após 1 semana de cultivo ( $6,00 \text{ U mg}^{-1}$  proteínas, em 5 min contra  $3,88 \text{ U mg}^{-1}$  proteínas, em 10 min) (Fig. 18B). Os resultados obtidos forneceram informações importantes a respeito da determinação da atividade lacase em *N. crassa*: 1) o intervalo de tempo ideal para a determinação da atividade lacase do fungo foi de 5 min; 2) a atividade lacase é maior para ambos os substratos, quando os mesmos são tratados com calor acoplado a hidrólise ácida e 3) a secreção de lacases para a modificação de ligninas provenientes de herbáceas se dá em um menor intervalo de tempo, quando comparado com a secreção de lacases para degradar lignina proveniente de madeiras. Considerando que as ligninas nos substratos usados apresentam composições distintas, podemos sugerir que o acesso do fungo às ligninas provenientes das gramíneas e sua utilização como fonte de carbono alternativa, independente do tratamento prévio realizado, é mais fácil que o acesso e utilização das ligninas provenientes das madeiras.

Os basidiomicetos associados aos fenômenos de podridão da madeira são os fungos produtores de enzimas lacases mais estudados até o momento devido sua alta capacidade de decomposição de biomassa vegetal. Dados da literatura mostram que diferentes espécies de *Pleurotus* cultivados em bagaço de cana secretam lacases com picos de atividade enzimática de  $6,23 \text{ U L}^{-1}$  e  $4,68 \text{ U L}^{-1}$  após 15 e 20 dias de cultivo, respectivamente (MENEZES *et al.*, 2009). KUMARAN *et al.* (1997), apresentaram para o fungo *Pleurotus sajor-caju*  $10,6 \text{ U L}^{-1}$  de atividade de lacase em substrato lignocelulósico.

Os resultados obtidos em nosso laboratório para a produção de lacase pelo ascomiceto em bagaço de cana foram muito promissores do ponto de vista biotecnológico. Existem muitos relatos na literatura sobre a dificuldade de obtenção de enzimas lignolíticas por basidiomicetos cultivados em bagaço de cana, sobretudo devido à complexidade da estrutura da planta. RAJARATHNAM e BANO (1987) observaram em seus trabalhos, que diversas espécies de *Pleurotus* não se desenvolvem bem sobre o bagaço de cana e justificaram este fato à incapacidade metabólica do fungo em utilizar o açúcar sacarose. *N. crassa* secreta invertase de maneira eficiente em meio de cultivo e utiliza sacarose como fonte de carbono preferencial com grande facilidade. Nossos resultados apontaram o bagaço de cana como sendo um potencial substrato para a produção de enzimas lignolíticas, que

podem ser aplicadas em diversos processos industriais e biotecnológicos. Além disso, a atividade lacase encontrada no bagaço de cana se assemelhou bastante às atividades encontradas para os basidiomicetos nas mesmas condições. Considerando que para *N. crassa* a utilização de sacarose não é um fator limitante no seu desenvolvimento sobre este tipo de biomassa, é possível propor futuramente um modelo para a produção de lacases utilizando este organismo modelo que possibilitará uma alternativa importante para a reciclagem de resíduos lignocelulósicos provenientes de atividades agrícolas, contribuindo assim para resolver problemas ambientais decorrentes do acúmulo destes resíduos na natureza.

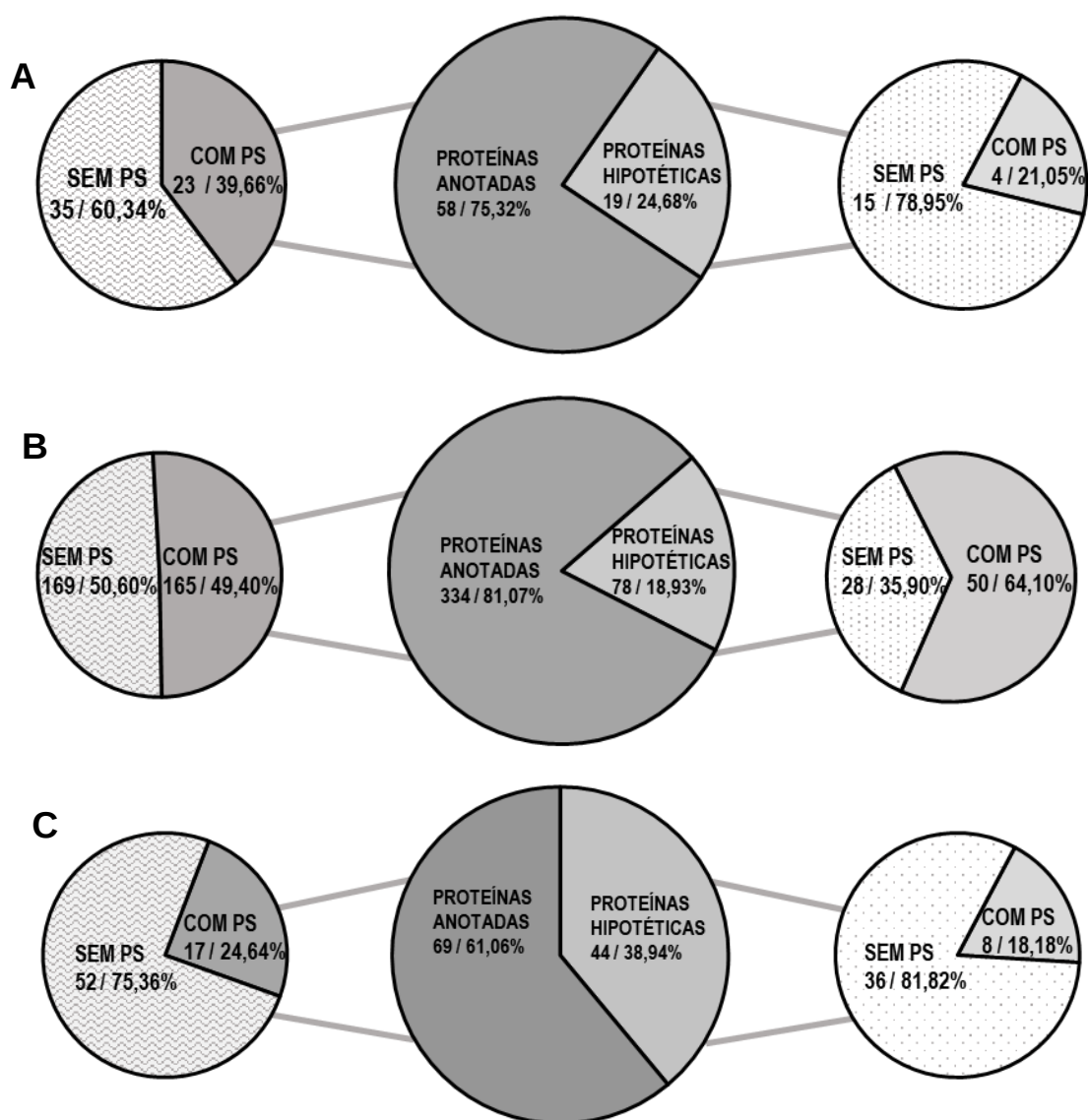
Estes resultados de atividade lacase também foram importantes para direcionar nossos estudos de identificação de proteínas com atividade lignolíticas secretadas pelo fungo nos diferentes substratos lignocelulósicos testados, pois permitiram selecionar o tempo de cultivo ideal para a detecção de enzimas lignolíticas e o pré-tratamento destes substratos.

### **5.5 *N. crassa* secreta proteínas com prováveis atividades lignolíticas na presença de diferentes substratos lignocelulósicos e de lignina purificada**

Baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios enzimáticos, determinamos os secretomas de *N. crassa* para o bagaço de cana de açúcar e serragem previamente tratados com calor acoplado a hidrólise ácida e também para lignina purificada. As proteínas secretadas foram determinadas por *shotgun*, nas condições estabelecidas previamente. Para esta etapa, as amostras foram tripsinizadas em nosso laboratório e enviada para laboratórios de apoio na cidade de São Paulo, SP. Os resultados brutos do sequenciamento foram analisados em nosso laboratório, usando a ferramenta MASCOT disponibilizada pelo LNBio, LNLS, Campinas, SP. Apenas os peptídeos apresentando picos monoisotópicos com  $p < 0,05$  e *score* acima de 35 foram considerados como “proteínas identificadas” e estão disponibilizados no Apêndice ao final deste trabalho, organizados em tabelas.

Os resultados obtidos para o secretoma em lignina 0,5% após 20 h de cultivo permitiram a identificação de 77 proteínas, sendo que no banco de dados do fungo, 58 já apresentam funções anotadas baseados em seus ortólogos funcionais (75,32%) e 19 ainda estão como hipotéticas (24,68%) (Fig. 19A). Das proteínas identificadas como anotadas, 23 apresentam peptídeo do sinal (39,66%). Das proteínas que se

**Figura 19** – Proteínas anotadas identificadas nos secretomas lignocelulósicos



Porcentagem de proteínas identificadas por espectrometria de massas nos secretomas de lignina e cana de açúcar e que se encontram anotadas no banco de dados de *N. crassa*. **(A)** Lignina 20 h; **(B)** Bagaço de cana-de-açúcar 96 h; **(C)** Lignina 96 h. **PS**- peptídeo do sinal.

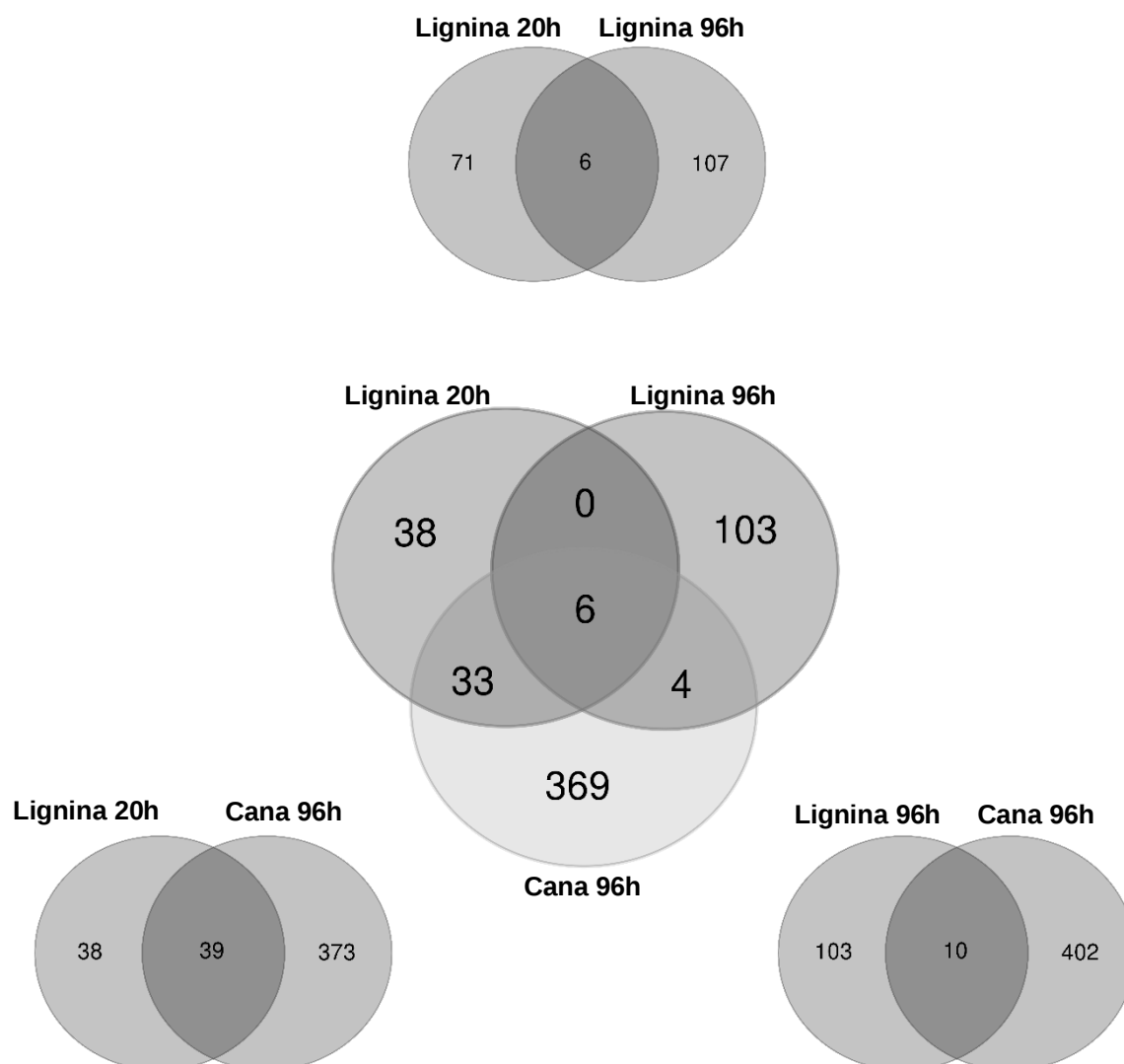
**FONTE:** Autoria própria

encontram anotadas como hipotéticas, apenas 4 possuem peptídeo do sinal (21,05%), indicando que são secretadas pelo fungo nesta condição de cultivo. Para o secretoma de lignina após 96 h de cultivo, foram identificados um total de 113 proteínas, sendo que 69 delas se encontram anotadas (61,06%) e 44 ainda estão como hipotéticas (38,94%). Das proteínas anotadas, 17 possuem peptídeo do sinal (24,64%) enquanto que das proteínas hipotéticas, apenas 8 apresentam peptídeo de sinal (18,18%) (Fig. 19C). Para o secretoma de 96 h de cultivo em bagaço de cana tratado com calor e hidrólise ácida, foram identificadas 412 proteínas, sendo 334 já anotadas (81,07%) e 78 hipotéticas (18,93%). Das proteínas anotadas, 165 apresentam peptídeo do sinal (49,40%) e enquanto que para as hipotéticas, 50 possuem peptídeo do sinal (64,10%) (Fig. 19B).

Análises comparativas dos dados obtidos permitiram verificar que muitas proteínas secretadas na presença de biomassa vegetal também foram secretadas na presença do polímero recalcitrante. Os resultados estão representados na Figura 20. Em comum para as três condições analisadas, foram encontrados 6 ORFs, as quais codificam uma arabinofuranosidase, uma glucanosiltransferase, três endo-1,4-beta-xilanases e uma *non-anchored cell wall protein* (Fig. 20). A presença de proteínas com atividade endo-beta-xilanase nos chamou a atenção pois esperávamos que uma proteína deste tipo estivesse ausente para o fungo cultivado na presença de lignina purificada e nos levou a especular sobre a existência de um *crosstalk* entre as vias de secreção de ligninases e hemicelulases, onde uma vez que o fungo tenha sentido a presença de lignina no ambiente, ele estaria interpretando este sinal como estando na presença de biomassa vegetal e passasse a secretar hemicelulases para a etapa subsequente, que seria a utilização desta fonte de carbono de natureza carboidrato para obtenção de energia.

Quando o fungo foi cultivado na presença de lignina purificada em dois intervalos de tempo diferentes (20 h e 96 h), também encontramos 6 ORFs compartilhadas, e coincidentemente foram as mesmas proteínas que se mostraram compartilhadas para os secretomas de 20 h e 96 h em lignina 0,5% e bagaço de cana tratado (Fig. 20). Para o fungo cultivado na presença de lignina durante 20 h e no bagaço de cana durante 96 h, encontramos 39 ORFs compartilhadas, codificando quatro hemicelulases (que se mostraram comum às três condições), uma celulase e uma provável ligninase. Já para os secretomas de lignina 96 h e cana 96 h, encontramos 10 ORFs compartilhadas, as quais codificam uma carboxi-cis,cis-

**Figura 20** – Proteínas compartilhadas nas diferentes condições de cultivo



Diagramas de *Venn* comparativos das ORFs compartilhadas nos secretomas de *N. crassa*. Resultados de espectrofotometria de massas obtidos a partir do cultivo de *N. crassa* em lignina 0,5% por 20 h e 96 h e em bagaço de cana-de-açúcar por 96 h. Diagramas gerados pelo site: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

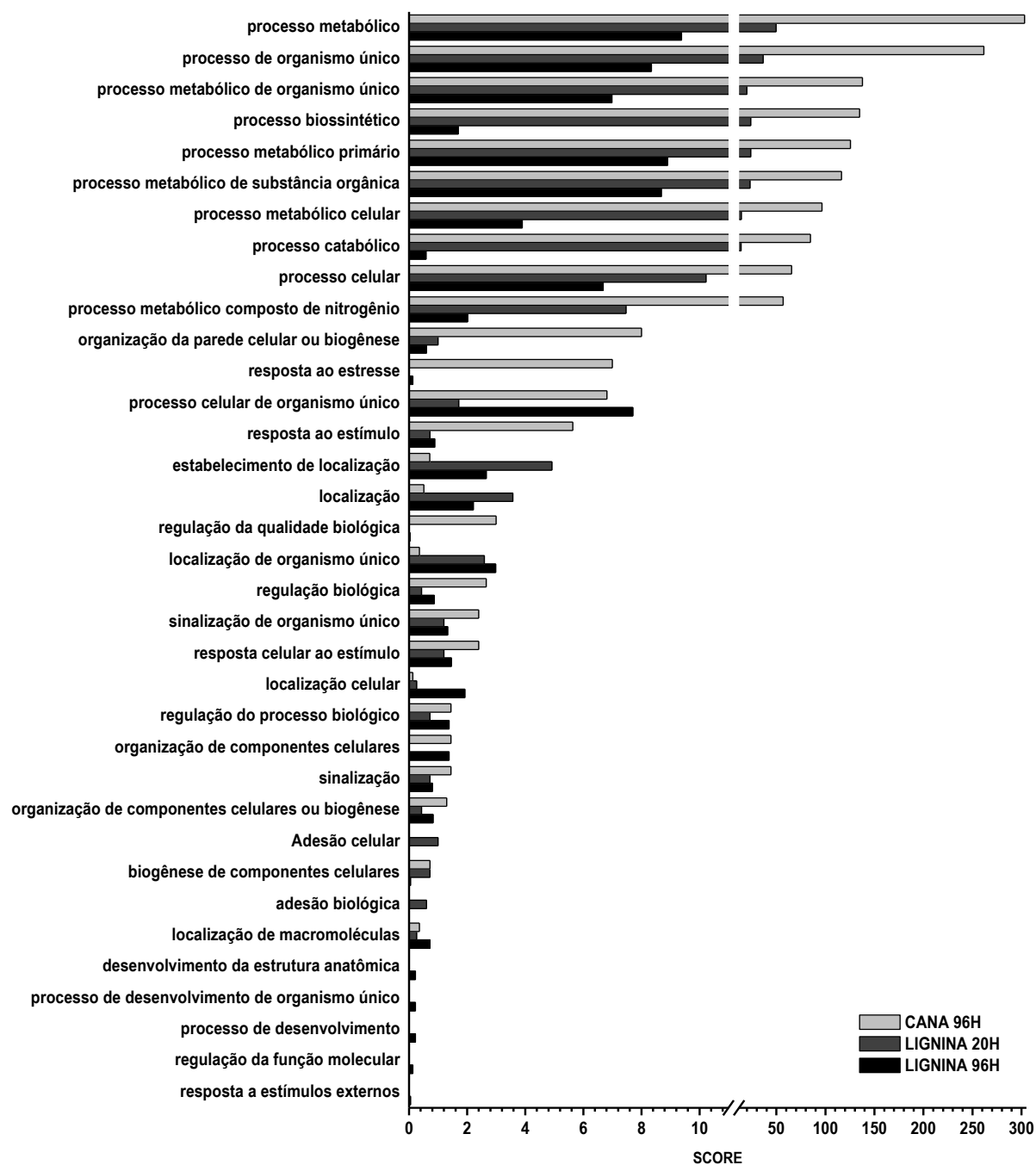
**FONTE:** Autoria própria

muconate ciclase, uma acilase, um fator de transporte nuclear, uma alfa-L-arabinofuranosidase, 3 endo-beta-xilanases, uma glucanosiltransferase, uma *non-anchored cell wall protein* e uma proteína hipotética.

Um resultado interessante foi a identificação de duas ORFs codificando proteínas envolvidas na degradação de hemiceluloses, atualmente anotadas no banco de dados do fungo, respectivamente, como um provável precursor da endo-1,4-beta-xilanase e uma endo-1,4-beta-xilanase. Também foram encontradas ORFs codificando uma proteína com atividade dimetilnilina monoxigenase, duas proteínas com atividade desidrogenase, uma proteína com atividade hidrolase, proteínas mitocondriais, uma proteína com atividade glucanosiltransferase e 42 ORFs codificando proteínas ainda anotadas como hipotéticas, o que nos oferece a possibilidade de identificar novas proteínas ou atribuir novas funções a proteínas já anotadas no banco de dados do fungo. Dentre as proteínas identificadas neste secretoma, 4 proteínas também foram identificadas por TIAN et. al. (2009), quando *N. crassa* foi cultivada em *Miscanthus* e segundo o autor, são proteínas relacionadas a degradação de hemiceluloses.

As análises ontológicas das ORFs identificadas neste trabalho encontram-se descritas nas Figuras 21, 22 e 23. Dentre os processos biológicos encontrados, chamamos a atenção para as respostas a estímulos estressantes que ocorrem quando o fungo é cultivado na presença de cana e lignina, sobretudo após 96 h de cultivo (Fig. 21). Para componentes celulares, foi encontrado que muitas das proteínas identificadas no secretoma do fungo em 96 h de cultivo em lignina são proteínas parte de membrana celular (Fig. 22), enquanto que para a função molecular, encontramos um alto número de proteínas apresentando atividade catalítica para os 3 secretomas analisados e dentro destas atividades, a maioria delas são representadas por proteínas que ligam íons e que apresentam atividade oxidorreductase (Fig. 23).

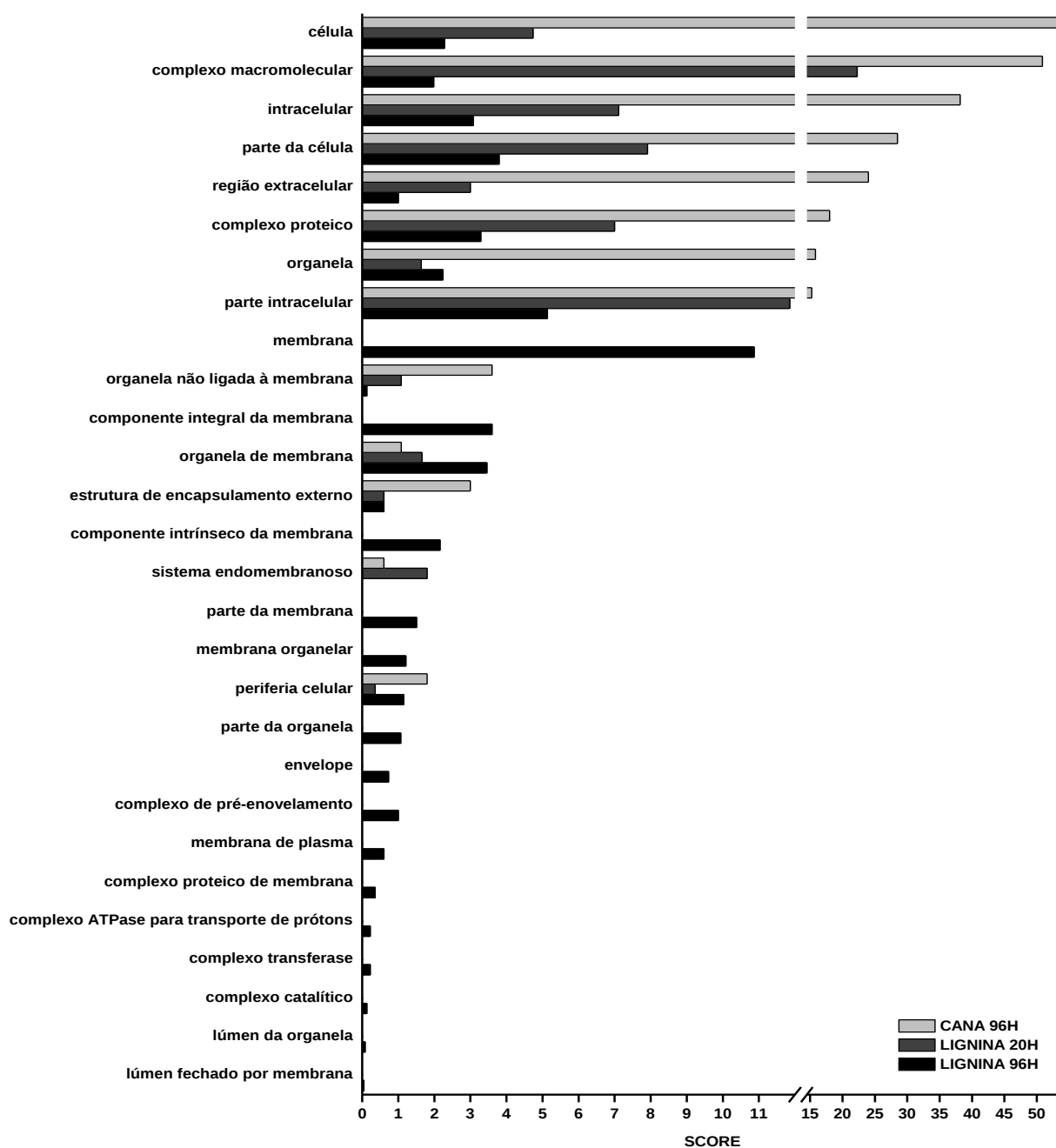
A presença de um alto número de proteínas com atividade enzimática nos levou a uma busca preliminar de possíveis alvos com atividades lignolíticas de potencial biotecnológico. Em uma primeira análise, para o secretoma de lignina 96 h, identificamos uma proteína com provável atividade ligninase. Para o secretoma de bagaço de cana 96 h, encontramos 28 celulasas; sendo cinco exoglucanases; quatro beta-glucosidases; 14 endoglucanases; duas celulasas; uma glucooligosacarideo oxidase; uma *mixed-linked* glucanase e uma *cell-wall* glucanase. Encontramos 26 hemicelulasas: sendo 3 arabinofuronosidases; 4 acetilxilana esterase; 4 endo-1,4-

**Figura 21** – Processos Biológicos.

As análises de Ontologia Genética (GO) foram realizadas usando a ferramenta Blast2GO, conforme descrito em Material e Métodos.

**FONTE:** Autoria própria

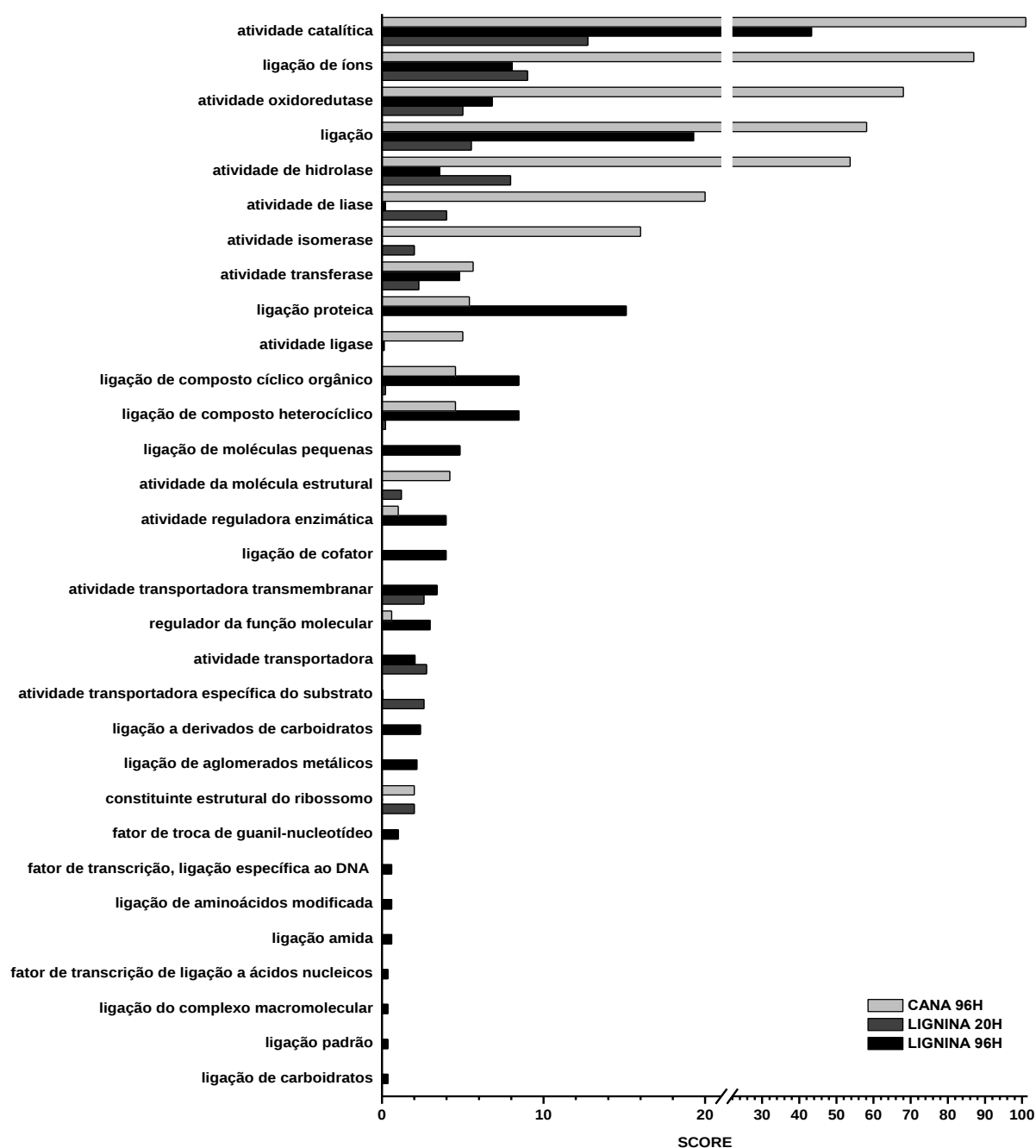
Figura 22 – Componente Celular



As análises de Ontologia Genética (GO) foram realizadas usando a ferramenta Blast2GO, conforme descrito em Material e Métodos.

**FONTE:** Autoria própria

**Figura 23 – Função Molecular**



As análises de Ontologia Genética (GO) foram realizadas usando a ferramenta Blast2GO, conforme descrito em Material e Métodos.

**FONTE:** Autoria própria

beta-xilanases; uma xilanase; uma feruloil esterase B; duas beta-galactosidases; duas poligalacturonase; uma rhamnogalacturonana acetilesterase; uma arabinogalactana endo-1,4-beta-galactosidase; uma xilosidase/arabinoxidase; três alfa-arabinofuranosidase; três beta-xilosidases. Também encontramos dez prováveis ligninases, dentre elas duas quinone oxidoreduases; duas celobiose desidrogenases; uma catecol dioxigenase; uma dioxigenase extracelular; uma álcool isoamilico oxidase; uma peroxidase/catalase; uma superoxide dismutase e uma *copper-radical* oxidase.

Para o secretoma de lignina 20 h, foram encontradas duas celulasas, quatro hemicelulasas, e uma ligninase com atividade de ligação a cobre.

Os resultados obtidos para os secretomas em lignina e bagaço de cana mostraram-se bastante promissores e reforçam nossa hipótese de *N. crassa*, um organismo modelo utilizado há muito tempo para estudos bioquímicos, também pode ser usado como um organismo para a identificação de novas proteínas de interesse biotecnológico apresentando atividades lignocelulolíticas interessantes. O secretoma do fungo na presença de serragem tratada encontra-se tripsinizado em nosso laboratório e deverá ser submetido a espectrometria de massas em breve.

## *Principais Conclusões*

## 6 PRINCIPAIS CONCLUSÕES

Dentre as principais conclusões obtidas a partir deste trabalho, podemos citar:

1. *N. crassa* mostrou crescer de maneira eficiente em substratos lignocelulolíticos como bagaço de cana e serragem, tratados com calor acoplado a hidrólise ácida e também em lignina purificada, quando em baixas concentrações (até 2%). A hidrólise prévia dos substratos escolhidos permitiu o acesso do fungo às fontes de carbono alternativas, sendo este acesso mais fácil na presença de bagaço de cana de açúcar que na presença de serragem, muito provavelmente devido à composição da lignina destes substratos, sinalizando uma preferência do fungo para as ligninas presentes nas plantas da família das gramíneas.
2. A preferência do fungo pelas gramíneas ficou evidente pela detecção de atividade lacase tanto para o bagaço de cana tratado previamente com calor quanto para o bagaço de cana tratado previamente com calor acoplado a hidrólise ácida, enquanto que para a serragem apenas quando o substrato recebeu o tratamento de calor acoplado a hidrólise ácida foi possível detectar atividade lacase. No entanto, a atividade lacase detectada para *N. crassa* mostrou-se equivalente às atividades reportadas em trabalhos publicados para basidiomicetos, considerados os melhores organismos produtores de lacases devido estarem associados a processos de podridão da madeira.
3. As análises dos secretomas do fungo na presença de lignina purificada e de bagaço de cana de açúcar demonstraram a existência de um crosstalk entre as vias que sinalizam a secreção de enzimas lignolíticas e enzimas hemicelulolíticas, sugerindo que quando o fungo sente a presença de fontes de ligninas na natureza, ele secreta simultaneamente enzimas com atividade hemicelulases, a fim de tornar mais eficiente o processo de utilização desta fonte de carbono alternativa de natureza carboidrato, concomitantemente com a modificação/degradação das ligninas.
4. Embora *N. crassa* seja um ascomiceto não considerado como bom organismo produtor de enzimas, seu genoma ainda abriga muitas proteínas com potencial biotecnológico, as quais poderão ser identificadas, caracterizadas e utilizadas sozinhas ou adicionadas a coquetéis enzimáticos de interesse industrial.

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

- ADSUL, M.G. *et al.* Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 4304 - 4312, 2011.
- AGGER, J., *et al.* Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 6141 - 6148, 2010.
- AGRAWAL, A; KAUSHIK, N; BISWAS, S. Derivatives & Applications of Lignin – An Insight. **The Scitech Journal**. v. 01 (7), p. 30-36, 2014.
- AKDOGAN, H. A.; TOPUZ, M. C; URHAN, A. A. Studies on decolorization of reactive blue 19 textile dye by *Coprinus plicatilis*. **J. Environm. Health Sci Engin**, v. 12, n. 49, 2014.
- ALVAREZ, C. *et al.* Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. **Microbial. biotech.** v.9, p. 149 - 156, 2016.
- ANDER, P.; MARZULLO L. Sugar oxireductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. **J. Biotechnol**, v. 53, p.115-131, 1997
- ANDERSEN, M. R. *et al.* A trispecies *Aspergillus* microarray: comparative transcriptomics of three *Aspergillus* species. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 105, p. 4387 - 4392, 2008
- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v.3, n.4, 2010.
- BORKOVICH, K.A. *et al.* Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 68: p.101 - 108, 2004.
- BANERJEE, G. *et al.* Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Research**. v. 3, p. 82-92, 2010.
- BAUER, R; RUPE, C. O. Use of Syringaldazine in a Photometric Method for Estimating “Free” Chlorine in Water. **Analytical Chemistry**, v. 43, p. 421 - 425, 1971.
- BEESON, W. T. *et al.* Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. **J. Am. Chem. Soc**, v. 134, p. 890 - 892, 2012.
- BENEDICT, S.R. A reagent for the detection of reducing sugars. **J Biol Chem.**; v.5, 485-487, 1909.
- BHAT, M.K.. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. **Biotechnol. Adv**, v. 18, p. 355 - 383, 2000.

BLANCHETTE, R. A. *et al.* Biodegradation of compression wood and tension by white and brown-rot fungi. **Holzforschung**, v. 48, p. 34 - 42, 1994.

BLANCHETTE, R.A. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 381 - 403, 1991.

BOERJAN, W. *et. al.* Lignin biosynthesis. **Annu Rev Plant Biol**, v. 54, p. 519-546, 2003

BOYLE, C. D.; KROPP, B. R.; REID, I. D. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. **Appl Environ Microbiol**, v. 58, p. 3217 - 3224, 1992

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 249 - 254, 1976.

BRUNOW. **Lignin chemistry and its role in biomass conversion**. G. BrunowB. Kamm, P.R. Gruber, M. Kamm (Eds.), Biorefineries - Industrial processes and products, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 151-163, 2010.

BURTON, R.A. *et al.* Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nat. Chem. Biol**, v. 6, p. 724 - 732, 2010.

BURTON, R.A.; FINCHER, G.B. Plant cell wall engineering: applications in biofuel production and improved human health. **Curr. Opin. Biotechnol**, v. 26, 79 - 84, 2014.

BYADGIA, S. A.; KALBURGIB, P. B. Production of Bioethanol from Waste Newspaper. **Procedia Environmental Sciences**. v. 35, p. 555 – 562, 2016

CANAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly. **Biotechnol Adv**, v 28, p. 694 - 705, 2010.

CANTAREL, B. L. *et al.* The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Res**. v.37, p. 233 - 238, 2009.

CASTILLO, M. D. P. *et al.* Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a solid substrate fermentation system. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 16, p. 289 - 295, 2000.

COLOT, H. V *et al.* A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10352–7, 2006.

CONSTANT, S.; *et al.* New insights into the structure and composition of technical lignins: A comparative characterisation study. **Green Chem.**, v.18, p. 2651 - 2665, 2016.

- COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 6, 850 - 861, 2005.
- COWLING, E.B.; KIRK, T.K. Properties of cellulose and lignocellulose materials and substrats for enzymatic conversion processes. **Biotechnol Bioeng Symp**, v. 6, p.95 - 123, 1976.
- DAHIYA, J. .*et al.*. Decolourisation of Synthetic and Spent Wash Melanoidins Using the Whit-rot Fungus *Phanerochaete Chrysosporium* JAG-40. **Bioresour Technol**, v. 78, p. 95-98, 2001
- DASHTBAN, M. *et al.* Fungal biodegradation and enzymatic modification. **Int J Biochem Mol Biol**, p. 36-50, 2010.
- DAVIS R. H.; PERKINS, D. D. *Neurospora*: a model of model microbes. **Nat Rev Genet**, v. 3, p. 397 - 403, 2002.
- DE VRIES, R. P. *et al.* CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. **Res. Microbiol.** V. 150, 281 - 285, 1999.
- DEL PILAR CASTILLO, M. *et al.* Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biol Fertil Soils**, v. 33, p. 521 - 528, 2001.
- DUNLAP, J. C. *et al.* Enabling a community to dissect an organism: overview of the Neurospora functional genomics project. **Advances in genetics**, v. 57, p. 49–96, 2007.
- EBERHART, B. M.; BECK, R. S.; GOOLSBY, K. M. Cellulase of *Neurospora crassa*. **J Bacteriol**, v. 130, p. 181- 186, 1977.
- EBRINGEROVÁ, A., *et al.* Hemicellulose, Polysaccharides. 1: Structure, Characterization and use. **Springer-Verlag**, vol. 186, p. 1 – 67, 2005. ecology. Chichester: John Wiley, 1998.
- ESLYN, W.E. *et al.* Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. **Phytopathology**, v. 65, p. 473 - 476, 1975.
- FAIX, O. Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. **Holzforschung**, v. 45, p. 21 - 27, 1991
- GALAGAN, J. E., *et al.* The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature** 422: 859-868. 2003
- GALBE, M.; ZACCHI, G.A. Review of the production of ethanol from softwood. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 618 - 628, 2002.
- GIANFREDA, L. *et al.* Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: a brief review. **Biocatal Biotransformation**, v. 24, p. 177 - 187, 2006.

GLASS, N. L. *et al.* Plant Cell Wall Deconstruction by Ascomycete Fungi. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 67, p. 477–98, 2013.

GUERRIERO, G. *et al.* Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engin. in Life Sci.**, v. 16, n. 1, p. 1 - 16, 2016.

HALL, M. *ET AL.* Cellulose crystallinity - a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **FEBS J**, v. 277, p. 1571 - 1582, 2010.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem**, v. 48, p. 422 - 427, 1972.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Review**, v.13, p. 125-135, 1994.

HORN, S.J. *et al.* Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 45, 2012.

HORN, S.J. *et al.* Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol. Biofuels**, v 25, n. 45, 2012.

HOWARD, R.L. *ET AL.* Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **A. J. Biotech.** v.2, 602 – 619, 2003

IOELOVICH, M. Optimal Conditions for Isolation of Nanocrystalline Cellulose Particles. **Nanosci and Nanotechnol**, v. 2, p. 9 - 13, 2010.

ISIKGOR F. H.; BECER C.R.. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v.6, p. 4497 – 4559, 2015

JIN, L.; *et al.* Structural characterization of brown-rotted lignin. **Holzforschung**, v. 44, p. 133 - 138, 1990.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. **Bioresour. Technol.**, v. 20, 1008 - 1018, 2016.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p 803 - 807, 2011.

KNOX, J.P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Curr. Opin. Plant Biol**, v. 11, 308 - 313, 2008.

KORT, M. J. Colour in the sugar industry, Science and Technology. *Applied Science*, p. 97 - 130, 1979.

- KUMAR, R., SINGH, S., SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, n. 5, p. 377 - 91, 2008.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 - 685, 1970.
- LAURICHESSE, S.; AVEROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Prog. Polym. Sci.**, v. 39, p. 1266 - 1290, 2014.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **J Biotechnol**, v. 56, p. 1 - 24, 1997.
- LEE, S.B. *et al.* Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism. **Biotechnol Bioeng**, v. 25, p. 33 - 51, 1983.
- LEONOWICZ, A. *et al.* Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v. 27, p. 175 - 185, 1999
- LEONOWICZ, A. *et al.* Fungal laccase: properties and activity on lignin. **J Basic Microbiol.**, v. 41, p. 185 - 227, 2001.
- LI, C. *et al.* Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. **Chem. Rev.**, v. 115, p. 11559 - 11624, 2015
- LIERS, C. *et al.* DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidizing nonphenolic lignin model compounds and high redox potential dyes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, p. 1869 - 1879, 2010.
- MACH-AIGNER, A. R. *et al.* D-xylose as a repressor or inducer of xylanase expression. in *Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p.1770–1776, 2010.
- MACH-AIGNER, A. R. L-arabitol is the actual inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.77, p. 5988 - 5994, 2011.
- MALHERBE, S., CLOETE, T.E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, p.105 - 114, 2002.
- MARTINEZ, D. *et al.* Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nat Biotechnol**, v. 22, p. 695 - 700, 2004.
- MARTINEZ, D. *et al.* Genome Sequencing and Analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei*. **Nat Biotechnol**, v. 26, p. 553-560, 2008.

- MASRAN, R. *et al.* Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 12, p. 5231 - 5246, 2016.
- MEHTA, R. Bioremediation of textile waste water. **Colourage**, v. 59, p. 46, 2012.
- MENDONÇA, R. T. *et al.* Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora* in biotechnological applications. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 1323 - 1330, 2008.
- MU, L. *et al.* N-Methyl-2-pyrrolidone C1-C4 carboxylic acid: A novel solvent system with exceptional lignin solubility. **Chem. Commun.**, v. 51, p. 13554 - 13557, 2015.
- NITSOS, C.; *et al.* Isolation and Characterization of Organosolv and Alkaline Lignins from Hardwood and Softwood Biomass. **ACS Sustain. Chem. Eng.**, v. 4, p. 5181 - 5193, 2016.
- NUMMI, M. *ET AL.* Cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei*. **Biochem. J.** v. 215, p. 677 - 83, 1983.
- ORTH, A.B, *et al.* Ubiquity of lignin wood-degrading fungi. **Ap Environ Microb**, v. 59, p. 4017 - 4023, 1993.
- PAMIDIPATI, S.; AHMED A., Degradation of Lignin in Agricultural Residues by locally Isolated Fungus *Neurospora discrete*. *Appl Biochem Biotechnol*, v.181, p. 1561 – 1572, 2016
- PAMIDIPATI, S.; AHMED A., Degradation of Lignin in Agricultural Residues by locally Isolated Fungus *Neurospora discrete*. **Appl Biochem Biotechnol**, v.181, p. 1561 – 1572, 2016
- PANDIT, A.; MAHESHWARI, R. Life-History of *Neurospora intermedia* in a sugarcane field. **J Biosci**, v. 21, p. 57 - 79, 1996.
- PÉREZ, J. *et al.* Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int Microbiol**, v. 5, p. 53 - 63, 2002.
- PERKINS, D. D.; TURNER, B. C.; BARRY, E. G. Strains of *Neurospora crassa* collected from nature. **Evolution**, v. 30, n. 2, p. 281-313, June 1976
- PHILLIPS, C.M. *et al.* Quantitative proteomic approach for cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **J. Proteome Res**, v. 10, p. 4177–4185, 2011.
- Phytopathology**, v. 29, p. 381 - 398, 1991.
- PIZZUL, L.; CASTILLO, M. D.P.; STENSTRÖM, J. "Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. **Biodegradation**, v. 20, p. 751 - 759, 2009.
- POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, p. 17 - 33, 1999.

PRASAD *et al.* Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential. **Chemosphere**, v. 231, p. 588-606, 2019.

PRASAD, S. *et al.* Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resources, **Conservation and Recycling**, v. 50, p. 1 - 39, 2007.

RAGAUSKAS, A.J *et al.* Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. **Science**, v. 16. 2014.

RAJAGANESH, *et al.* Characterization of textile dye effluent from komarapalayam, namakkal district, tamilnadu, india. **Indian Streams Reseach Journal**. v.4, n. 1, 2014.

RAJASUNDARI, K.; MURUGESAN, R. Decolourization of Distillery Waste Water – Role of Microbes and their Potential Oxidative Enzymes. **J Appl Environ Biol Sci**, v. 1, p. 54 - 68, 2011.

RAYNER, A.D.M.; BODDY, L. **Fungal decomposition of wood**: its biology and

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnol**, v. 24, p. 219 - 226, 2006.

ROMERO, M. D.; AGUADO, J. L. G.; LADERO, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme Microb Technol**, v. 25, p. 244 - 250, 1999.

RUTTIMANN-JOHNSON, C. *et al.* Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, p. 1792 - 1797, 1993.

SAHA, B.D. Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 279 - 291, 2003.

SATHITSUKSANO, N.; *et al.* Lignin fate and characterization during ionic liquid biomass pretreatment for renewable chemicals and fuels production. **Green Chem.**, v. 16, p. 1236 - 1247, 2014.

SCHLIEPHAKE, K. *et al.* Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Enzyme Microb Technol**, v. 27, p. 100 - 107, 2000.

SCHULTE, U. *et al.* Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa* . **Journal of biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 3–13, 14 2002.

SHRESTHA P. *et al.* Systematic search for cultivatable fungi that best deconstruct cell walls of Miscanthus and sugarcane in the field. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, p. 5490 - 504, 2011.

SHRESTHA, P. *et al.* Fungi isolated from Miscanthus and sugarcane: biomass conversion, fungal enzymes, and hydrolysis of plant cell wall polymers. **Biotechnol biofuels**, v. 8, n. 1, p. 38, 2015.

SLABAUGH, E. *et al.* Cellulose synthases: new insights from crystallography and modeling. **Trends Plant Sci**, v.19, 99 - 106, 2014.

SMITH, M.L. *et al.* Vegetative incompatibility in the het-6 region of *Neurospora crassa* is mediated by two linked genes. **Genetics**, v.155, p. 1095 - 1104, 2000.

SOMERVILLE, C *et al.* Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, p. 2206 - 2211, 2004.

SORIEUL, M. *et al.* Plantfibre: molecular structure and biomechanical properties, of a complex living material, influencing its deconstruction towards a biobased composite. **Materials**, v. 9, p. 618, 2016.

SUGANO, Y. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family **Cel Mol Life Sci**, v. 66, p. 1387 - 1403, 2009.

SUN, J. *et al.* Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryot. Cell**, v.11, p. 482 - 493, 2012.

STASZCZAK, M. *et al.* Activities in cultures of selected white-rot fungi. **J. Basic Microbiol.**, v. 3, p. 193-203, 1996.

SZKLARZ, G. *et al.* Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234 - 240, 1989.

TIAN, C. *et al.* Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, p. 22157 - 22162, 2009.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **J. Biotechnol.**, v. 41, p. 1 - 17, 1995.

UPTON, B. M.; KASKO, A.M. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric. **Chem Ver**, v.116, p. 2275 - 2306, 2016.

VALÁSKOVÁ, V; BALDRIAN P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus*--production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. **Microbiology**, v. 12, p. 3613 - 3622.

VAN DEN BRINK, J; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 91, p. 1477 - 1492, 2011

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnol Adv.**, v. 30, p. 1447 - 1457, 2012.

WATANABE, Y.; Sugi, R.; Tanaka, Y. Enzymatic decolourization of melanoidin by *Coriolus sp.* **Agricult Biol Chem**, v.46, p. 1623-1630, 1982.

WONG,D.W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 157, p. 174 - 209, 2009.

ZHAO, Q; DIXON, R.A. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? **Trends Plant Sci**, v. 16, 227 - 233, 2011.

ZHAO, Y *et al.* Advances in Imaging Plant Cell Walls. **Trends in Plant Science**, v. 24, p.867 - 878, 2019.