

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/11/2021.

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.

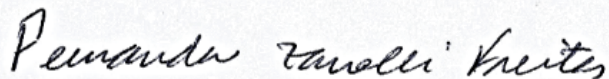
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

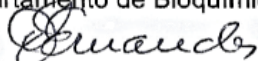
AUTORA: MARIA CAROLINA DA SILVA

ORIENTADORA: FERNANDA ZANOLLI FREITAS

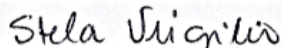
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof.^a Dr.^a 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.^a 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

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

46th 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 Virgilio 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 n^o. 448542/2014-5)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

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

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL	22
1.1.1	Celulose	24
1.1.2	Hemicelulose	25
1.1.3	Lignina	26
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	<i>NEUROSPORA CRASSA</i>	34
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS	41
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>	42
3.4.2	<i>Para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)</i> ..	42
3.4.3	<i>Para determinação de açúcares redutores pelo método de Benedict</i>	43
3.4.4	<i>Para determinação de proteínas totais</i>	44
3.4.5	<i>Para determinação das atividades enzimáticas</i>	45
3.4.6	<i>Para digestão trípica das amostras proteicas em solução</i>	45
3.5	REAGENTES.....	45
4	MÉTODOS	46
4.1	MANUTENÇÃO DA LINHAGEM SELVAGEM DE <i>N. CRASSA</i> E PROPAGAÇÃO	46
4.1.1	<i>Obtenção de conídios</i>	46
4.2	TRATAMENTOS DAS BIOMASSAS VEGETAIS.....	46
4.3	ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	47
4.3.1	<i>Análise do crescimento radial das colônias</i>	47
4.3.2	<i>Determinação da extensão apical das hifas basais em race tubes</i>	47

4.3.3	<i>Produção de hifas aéreas e conídios</i>	48
4.4	PADRONIZAÇÃO CULTURAS LÍQUIDAS E OBTENÇÃO DO SECRETOMAS	48
4.4.1	<i>Obtenção das proteínas secretadas</i>	49
4.5	TESTE DE BENEDICT	49
4.6	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	50
4.6.1	<i>Precipitação das proteínas totais com ácido tricloroacético (TCA) e acetona</i>	50
4.6.2	<i>Método de Hartree</i>	51
4.6.3	<i>Método de Bradford</i>	51
4.7	ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	51
4.7.1	<i>Atividade lacase</i>	51
4.7.2	<i>Ensaio qualitativo de oxidação da lignina</i>	52
4.8	ANÁLISE DO SECRETOMA	53
4.8.1	<i>Análise das proteínas secretadas por SDS-PAGE e 2D-PAGE</i>	53
4.8.2	<i>Digestão tríplica das amostras proteicas em solução</i>	54
4.8.3	<i>Sequenciamento dos peptídeos trípticos por LC-MS/MS</i>	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
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
6	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Composição da Biomassa Vegetal

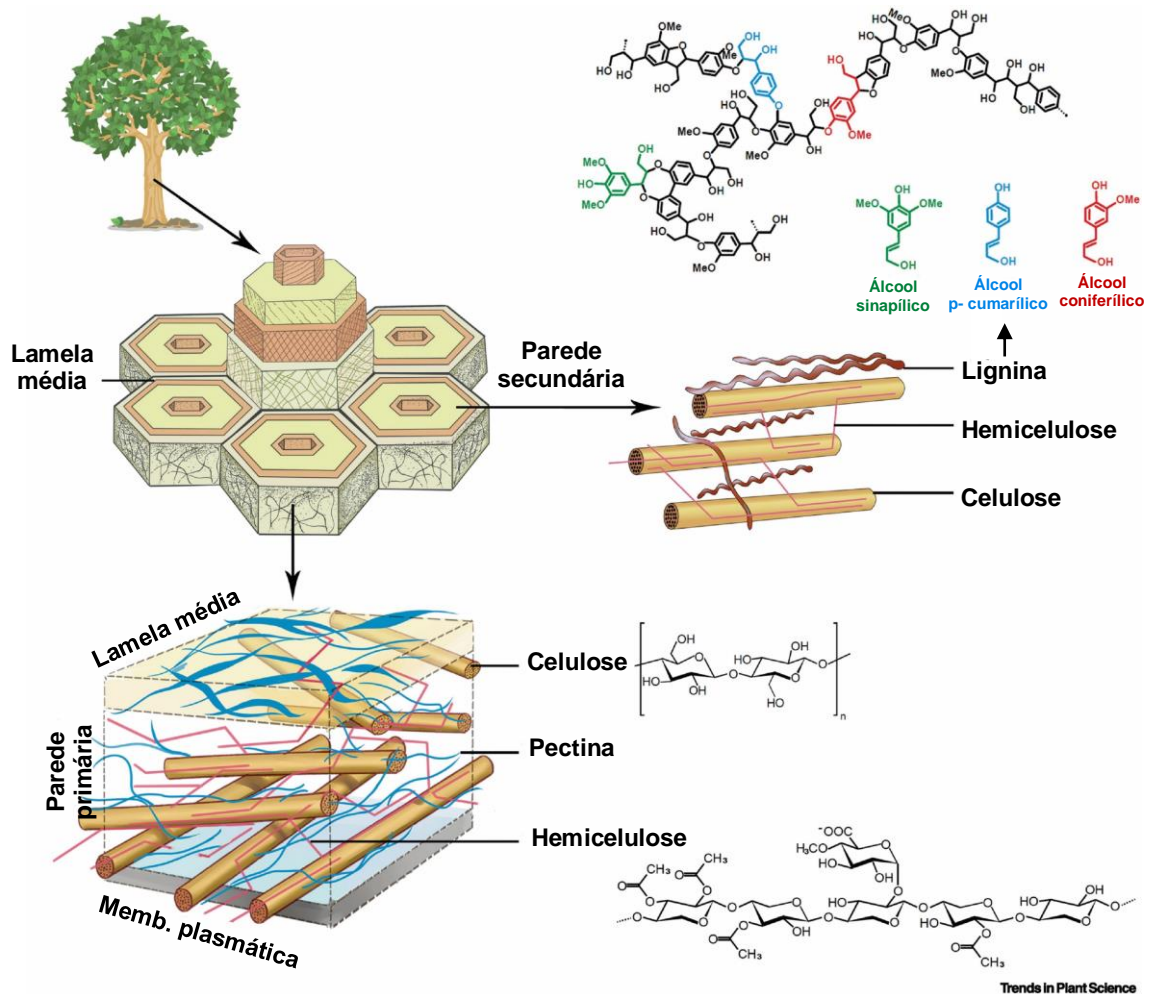
As paredes celulares das plantas possuem papéis biológicos essenciais durante o crescimento e desenvolvimento, incluindo regulação da forma e expansão celular, controle da coesão tecidual, troca iônica e defesa contra microrganismos patógenos. A maior parte do carbono fixado nas plantas é incorporada 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 guaiacil. 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 β -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 lático 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- β -glucanases, pertencentes a família das glicosil hidrolases, responsáveis por clivar ligações internas nas cadeias de celulose; 2) exo-1,4- β -glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis por clivar as extremidades redutoras ou não das cadeias de celulose; 3) β -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- β -1,4 xilanases; 2) α -L-arabinofuranosidases; 3) β -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, aos 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

A		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		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 β -O-4 não fenólicos (LIERS *et al.*, 2010).

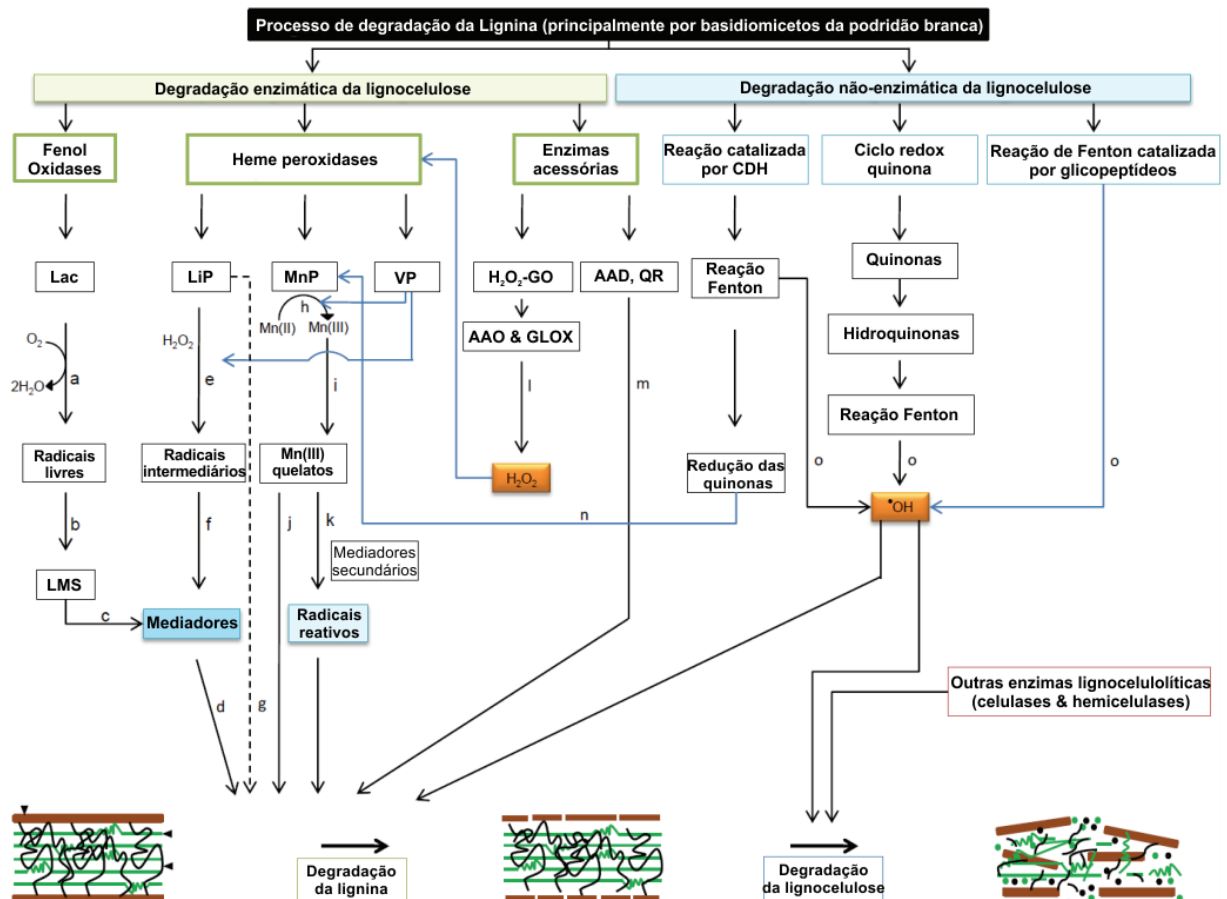
1.3 Uso das enzimas lignolíticas

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 CO₂ e H₂O (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).

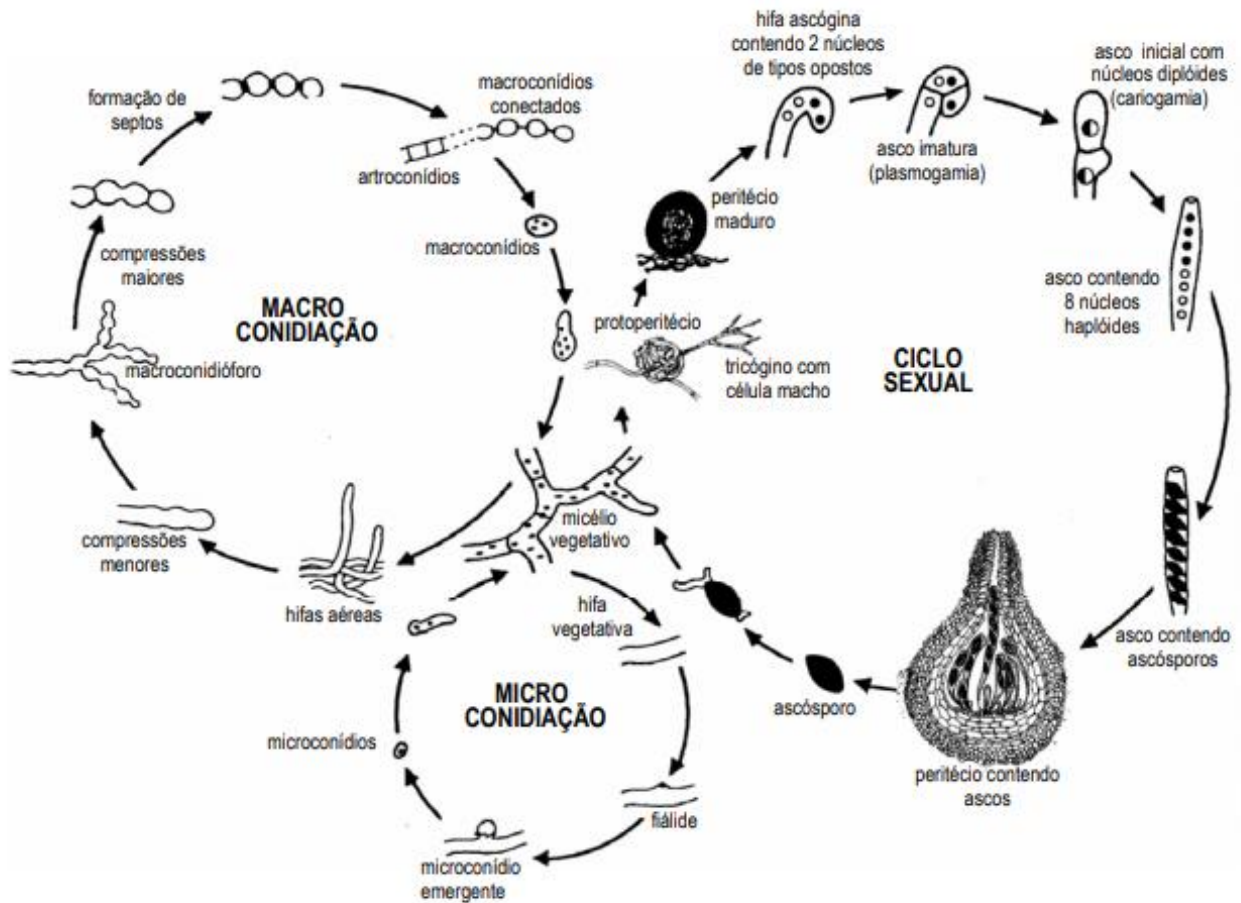
1.5 *Neurospora crassa*

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 filamentosos 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.

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 as 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 a 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 as 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 oxidoreductases 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. Brunow B. 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 subvermispora*. **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.