



UnB

Universidade de Brasília

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia
Molecular)

Instituto de Biologia

**Estudos dos perfis enzimáticos de *Trichoderma reesei*
RutC30 e 9414 em co-culturas com fungos do gênero
*Aspergillus e Phanerochaete***

Guilherme Bento Sperandio

Orientador: Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Brasília, fevereiro de 2018



UnB

**Estudos dos perfis enzimáticos de *Trichoderma reesei*
RutC30 e 9414 em co-culturas com fungos do gênero
Aspergillus e *Phanerochaete***

Guilherme Bento Sperandio

Orientador: Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação da Universidade de
Brasília como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

Brasília, fevereiro de 2018

**Estudos dos perfis enzimáticos de *Trichoderma reesei*
RutC30 e 9414 em co-culturas com fungos do gênero
Aspergillus e *Phanerochaete***

Guilherme Bento Sperandio

Banca examinadora:

Prof. Dra. Janice Lisboa De Marco – Membro Externo

Prof. Dra. Nádia Skorupa Parachin – Membro Interno

Dr. Helder Andrey Rocha Gomes – Suplente

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho – Orientador

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho por ter me acolhido em seu laboratório desde a época em que eu era aluno de iniciação científica. Obrigado pela confiança, paciência, ensinamentos e correções.

Agradeço ao professor Dr. Roberto do Nascimento Silva da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina (Ribeirão Preto, SP) por gentilmente fornecer as cepas de *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414.

Agradeço a minha família: minha mãe Jacqueline, meu pai Anderson e minha irmã Vitória pelo suporte e paciência. Agradeço a minha tia Shirlei, que sempre me ajudou e aos meus avós Ana e Manoel pelo apoio.

Agradeço a meus amigos e parceiros de laboratório Caio, Babi, Raissa, Andreza, Carol, Leonora, Antonielle, Jéssica e todos os colegas do laboratório de enzimologia pelos ensinamentos e momentos divertidos. Um agradecimento especial ao (agora) Dr. Helder Andrey Rocha Gomes, por ter tido a paciência de me ensinar quando eu era um IC tapado que não sabia fazer um simples ensaio de DNS. Valeu fera.

Agradeço a Dra. Nádia Skorupa Parachin e Dra. Janice Lisboa De Marco por aceitarem fazer parte da banca.

Agradeço a todos que tenham contribuído para a realização deste trabalho de forma direta ou indireta. Obrigado.

Apoio Financeiro

Este projeto foi financiado com auxílio do CNPq, CAPES e FAP-DF.

Sumário

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Abreviações.....	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DA LITERATURA	12
Biorrefinarias	12
A Cana-De-Açúcar Como Biomassa Energética	16
A Parede Celular Vegetal.....	18
Celulose.....	19
Hemicelulose.....	21
Pectinas	23
Lignina	24
A Parede Celular da Cana-de-açúcar	25
Holocelulases	26
Celulases	26
Xilanases	28
Pectinases.....	30
Mananases.....	32
Ligninases	32
Interações microbianas, co-cultivos fúngicos e a interação fungo-fungo.....	32
Fungos saprofiticos utilizados.....	35
JUSTIFICATIVA	36
OBJETIVOS	37

Objetivo Geral.....	37
Objetivos Específicos.....	37
MATERIAIS E MÉTODOS	38
Isolados	38
Fonte de Carbono e Meio de Cultura	38
Ensaio de Compatibilidade em Placa	38
Crescimento em Placa, Contagem De Esporos e Inoculação	39
Curva de Indução Enzimática	39
Ensaio Enzimáticos	40
Gel de Eletroforese	41
Hidrólise Enzimática.....	41
Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
Ensaio de Compatibilidade em Placa	43
Análise das Atividades Enzimáticas	45
Quantidade de Proteínas e Atividades Específicas	57
Perfil de Proteínas nos Extratos Brutos dos Mono e Co-cultivos.....	61
Hidrólise de Bagaço de Cana-de-açúcar	63
Microscopia Eletrônica de Varredura	66
CONCLUSÕES	70
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Composição percentual das hemiceluloses mais comuns em dicotiledôneas, gramíneas e coníferas. Extraído e modificado de SCHELLER e ULVSKOV (2010).22
- Tabela 2** – Atividades enzimáticas, quantidade de proteínas e atividade específica relativa ao sétimo dia dos mono e co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30, *T. reesei* QM 9414 e *A. niger*, incubados a 120 rpm, 28 °C com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.59
- Tabela 3** - Atividades enzimáticas, quantidade de proteínas e atividade específica relativa ao sétimo dia dos mono e co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30, *P. chrysosporium* e *A. tamarii*, incubados a 120 rpm, 28 °C com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.60

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferentes estágios de biorrefinarias e suas respectivas características de acordo com KAMM; KAMM (2004).	13
Figura 2 - Fluxograma simplificado do processo de biorrefino, incluindo a opção de produção local de enzimas lignocelulolíticas por fungos filamentosos que podem ser usadas na etapa de hidrólise. Fonte: autoria própria.....	14
Figura 3 - Organização geral da parede celular vegetal. Extraído e modificado de SIQUEIRA e FILHO (2010).	19
Figura 4 - Estrutura da celulose e sua organização em microfibrilas. Extraído e modificado de SARKAR, BOSNEAGA e AUER (2009).	20
Figura 5 – Representações computacionais das fases cristalina (a), paracristalina (b) e amorfa (c) da celulose. Extraído de KULASINSKI et al. (2014).	20
Figura 6 - Polissacarídeos hemicelulósicos mais comuns. “Fer” representa esterificações com ácido ferúlico. Extraído e adaptado de SCHELLER e ULVSKOV (2010).	22
Figura 7 – Esquematização estrutural dos polímeros de celulose, hemicelulose e pectina, com suas respectivas variações e monossacarídeos constituintes. Extraído e modificado de HÖFTE e VOXEUR (2017).....	23
Figura 8 - Álcoois precursores da lignina e estrutura geral da mesma. Extraído e modificado de WENG e CHAPPLE (2010).	24
Figura 9 – Principais tipos de celulasas e sua forma de atuação na cadeia celulósica. Extraído e modificado de SINGHANIA et al. (2017).	27
Figura 10 – Esquematização de uma porção da cadeia de xilana e de algumas enzimas xilanolíticas que atuam sobre a mesma. Extraído e modificado de POLIZELI et al. (2005). ..	29
Figura 11 – Modo de ação de alguns grupos de enzimas pectinolíticas. Extraído e modificado de SHARMA, RATHORE e SHARMA (2012).	31
Figura 12 – Exemplos de controles de compatibilidade em placa. Fungos oriundos da mesma placa inoculados a 4 cm de distância um do outro em placas de 9 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio malte 2%. Cultivos foram crescidos por sete dias e avaliados..	43
Figura 13 – Ensaio de compatibilidade em placa para co-cultivos. Fungos oriundos de culturas com a mesma idade tiveram discos de 1 cm de diâmetro inoculados a 4 cm de distância um do outro em placas de 9 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio malte 2%. Cultivos foram crescidos por sete dias e analisados.	45

Figura 14 – Perfis das atividades enzimáticas ao longo de sete dias em cultivo submerso usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono..	47
Figura 15 – Perfis das atividades enzimáticas dos co-cultivos de <i>T. reesei</i> RUT-C30 com <i>Aspergillus niger</i> em cultivo submerso, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono por sete dias.....	48
Figura 16 - Perfis das atividades enzimáticas dos co-cultivos de <i>T. reesei</i> QM 9414 com <i>Aspergillus niger</i> em cultivo submerso, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono por sete dias.....	51
Figura 17 - Perfis das atividades enzimáticas dos co-cultivos de <i>T. reesei</i> RUT-C30 com <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em cultivo submerso, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono por sete dias.....	53
Figura 18 - Perfis das atividades enzimáticas dos co-cultivos de <i>T. reesei</i> RUT-C30 com <i>Aspergillus tamarii</i> em cultivo submerso, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono por sete dias.....	55
Figura 19 – Atividades enzimáticas FPAse obtidas no sétimo dia de cultivo submerso utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono..	57
Figura 20 – Quantidade de proteína nos extratos brutos dos mono e co-cultivos obtidos após sete dias de cultivo submerso encubados a 120 rpm, 28 °C, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono..	58
Figura 21 – Géis SDS-PAGE dos extratos brutos após sete dias de cultivo a 28 °C, 120 rpm, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.	62
Figura 22 – Hidrólise realizada pelos extratos brutos de <i>T. reesei</i> RUT-C30, QM 9414, <i>A. niger</i> e seus respectivos co-cultivos sobre bagaço de cana-de-açúcar na concentração 0,75% (m/v), 900 rpm, 50 °C ao longo de 72 horas.....	64
Figura 23 – Degradação do bagaço de cana-de-açúcar por <i>T. reesei</i> RUT-C30, QM 9414, <i>A. niger</i> e seus respectivos co-cultivos após sete dias de cultivo, 120 rpm a 28 °C. Imagens obtidas via microscopia eletrônica de varredura.....	68
Figura 24 – Hifas de <i>T. reesei</i> RUT-C30, QM 9414, <i>A. niger</i> e seus respectivos co-cultivos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar após sete dias de cultivo, 120 rpm a 28 °C. Imagens obtidas via microscopia eletrônica de varredura.....	69

Lista de Abreviações

- COV – Compostos Orgânicos Voláteis
DNS – Ácido dinitrosalicílico
EB – Extrato Bruto
GAX – Glicuronoarabinosilanas
H₂O_d – Água Destilada
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance
LiPs – Lignina Peroxidases
LPMOs – Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MnPs – Manganês Peroxidases
PCV – Parede Celular Vegetal
RPM – Rotações por Minuto
SmF – Fermentação Submersa
SSF – Fermentação em Estado Sólido
XyG – Xiloglicanos

Resumo

A crescente demanda energética global e a necessidade ambiental de se afastar do modelo econômico linear baseado na indústria petroquímica são incentivos para o aprimoramento das biorrefinarias lignocelulósicas. Enzimas hidrolíticas ainda são uma porção considerável dos custos de funcionamento das biorrefinarias. Neste trabalho propõem-se a análise do potencial de co-cultivos fúngicos na produção de enzimas hidrolíticas atuantes em material lignocelulósico. Foram realizadas co-culturas do fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30 com *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii* e *Phanerochaete chrysosporium* em fermentação submersa (SmF) utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Também foi avaliado o co-cultivo de *T. reesei* QM 9414 com *A. niger* nas mesmas condições. Ao serem cultivados com *A. niger*, *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 apresentaram um aumento de 142% e 140% na atividade de β -glicosidase, respectivamente. O perfil enzimático total variou significativamente em cada combinação, com determinadas atividades sendo aumentadas e outras sendo diminuídas pelos co-cultivos. O aumento das atividades enzimáticas individuais como β -glicosidase, por exemplo, não se refletiu em maior atividade de celulases totais (FPase) e nem em maior eficiência na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, sendo o monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 o que liberou mais açúcares redutores em ambos os ensaios.

Abstract

The growing global energy demand and the environmental need to move away from the linear economic model based on the petrochemical industry are incentives for the improvement of lignocellulosic biorefineries. Hydrolytic enzymes are still a considerable portion of the running costs of biorefineries. In this work we propose the analysis of the potential of fungal cocultures in the production of hydrolytic enzymes active on lignocellulosic material. Cocultures of the fungus *Trichoderma reesei* RUT-C30 with *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamaritii* and *Phanerochaete chrysosporium* were carried out in submerged fermentation (SmF) using sugarcane bagasse as carbon source. Co-cultivation of *T. reesei* QM 9414 with *A. niger* under the same conditions was also evaluated. When cultivated with *A. niger*, *T. reesei* RUT-C30 and QM 9414 presented a 142% and 140% increase in β -glucosidase activity, respectively. The total enzymatic profile varied significantly in each combination, with certain activities being increased and others being decreased by the cocultures. The increase in individual enzymatic activities such as β -glycosidase, for example, was not reflected in higher total cellulase activity (FPase) or in higher efficiency in the hydrolysis of sugarcane bagasse, with monocultures of *T. reesei* RUT-C30 releasing more reducing sugars in both assays.

INTRODUÇÃO

As biorrefinarias lignocelulósicas são plantas industriais capazes de produzir uma variedade de bens como biocombustíveis e químicos de base a partir de insumos residuais agrícolas de baixo valor agregado (KAMM; KAMM, 2004). Estas tecnologias são uma das grandes apostas mundiais no esforço para desenvolver uma economia verde mais sustentável (*bio-based economy*) e que se afaste do modelo convencional de combustíveis fósseis.

No entanto, para que essa conversão seja efetuada é necessário que ocorra a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos vegetais, a fim de disponibilizar açúcares fermentescíveis para os processos subsequentes. Atualmente um dos maiores gargalos dessa indústria é o alto custo das enzimas necessárias para realizar a hidrólise supracitada (KUBICEK; KUBICEK, 2016).

A lignocelulose constituinte da parede celular vegetal pode ser dividida em 2 porções principais. Primeiramente na holocelulose tem-se a porção que compreende os seguintes carboidratos: 1) fibras de celulose, um polímero de glicose organizado linearmente 2) hemicelulose, de estrutura mais complexa, que contém diversos polissacarídeos que podem ou não ser ramificados. Dentre estes polissacarídeos destacam-se a xilana e manana e 3) pectina, composta por cadeias lineares de ácido galacturônico (SIQUEIRA; FILHO, 2010). Na porção não polissacarídica temos a lignina, uma rede de compostos fenólicos que recobre as porções sacarídicas e é responsável por parte considerável da resistência à hidrólise enzimática da parede vegetal (HIGUCHI, 2004). Essa composição complexa, mantida por um arranjo variado de ligações e com vários componentes interligados faz da parede celular vegetal um alvo altamente recalcitrante para as enzimas de origens microbianas.

As enzimas hidrolíticas geralmente são oriundas de fontes microbianas sendo os fungos filamentosos os seus principais produtores industriais. O fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30 é provavelmente a cepa industrial mais explorada para tal fim. Porém, nem mesmo esta cepa é capaz de produzir eficientemente todo o espectro de enzimas necessárias para a hidrólise total dos resíduos lignocelulósicos. Notavelmente, a cepa RUT-C30 é conhecida por ser um baixo produtor de β -glicosidases (OKEKE, 2014), quando comparado a sua capacidade de produzir outras celulasas.

Os fungos são um dos grupos de organismos mais diversos e numerosos no planeta. Eles ocupam virtualmente todos os habitats possíveis e sua diversidade é estimada em mais de 5.1 milhões de espécies (O'BRIEN et al., 2005). No entanto, um número muito inferior é atualmente conhecido e menos ainda são aqueles utilizados para fins industriais.

O processo de decomposição da recalcitrante matéria vegetal morta é atingido na natureza por uma diversa comunidade de microrganismos, dos quais os fungos filamentosos são os principais agentes (VAN DER WAL et al., 2013). Ou seja: não existe evidência da existência de um organismo capaz de degradar eficientemente a lignocelulose sozinho. No entanto, em processos industriais para a produção de enzimas lignocelulolíticas, impera o princípio da monocultura (devido a este processo já estar bem estabelecido e ser mais simples de controlar). O resultado é que nenhum coquetel enzimático, não enriquecido, atualmente disponível no mercado é capaz de uma desconstrução total da parede celular vegetal e os produtos mais completos exigem um dispendioso processo *downstream* em sua manufatura, elevando consideravelmente os custos.

Baseando-se nesse cenário, este trabalho propõe o estudo de co-cultivos fúngicos utilizando a cepa *T. reesei* RUT-C30 em conjunto com os seguintes fungos filamentosos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii* (divisão Ascomycota) e *Phanerochaete chrysosporium* (Basidiomycota) a fim de verificar seus perfis enzimáticos e seu potencial na formação de coquetéis enzimáticos mais completos, eficientes e baratos. Também foi realizada a co-cultura do fungo *T. reesei* QM 9414 com a cepa *A. niger* para os mesmos fins.

REVISÃO DA LITERATURA

Biorrefinarias

O formato econômico mundial atual baseia-se em um modelo linear, altamente dependente de combustíveis fósseis e fontes não renováveis de energia (LIGUORI; FARACO, 2016). Este modelo mostra-se insustentável a longo prazo, pois contribui com a emissão de gases estufa que culminam em agravar fenômenos climáticos como o aquecimento global antrópico. Não obstante, resíduos sólidos mostram-se um desafio ambiental urgente, devido ao seu acúmulo no meio ambiente.

Uma alternativa sustentável ao modelo econômico linear é a chamada economia circular. Em um modelo econômico circular, visa-se a aplicação dos 3 Rs: reduzir, reusar e reciclar. Neste contexto, o uso de biorrefinarias alimentadas por resíduos sólidos lignocelulósicos se mostra uma ferramenta promissora para a destinação e agregação de valor aos resíduos agroindustriais, que de outra maneira seriam queimados ou indevidamente descartados, tornando-se assim um fator poluente (LIGUORI; FARACO, 2016).

Inicialmente o Departamento de Energia dos EUA (1997) definiu biorrefinaria como “um conceito geral de uma unidade de processamento onde a biomassa pode ser convertida e extraída em um espectro de produtos de valor, baseando-se na refinaria petroquímica”. Desde então, diferentes definições foram sendo cunhadas à medida que o conhecimento e interesse sobre o tópico cresciam.

Posteriormente tem-se a definição empregada pela EMBRAPA Agroenergia (2011) onde “biorrefinaria é uma instalação que integra processos de conversão de biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, rações e energia. O objetivo de uma biorrefinaria é otimizar o uso de recursos e minimizar os efluentes, maximizando os benefícios e o lucro”.

A IEA Bioenergy (2013) atribui um conceito mais geral, onde um sistema de biorrefinaria pode ser descrito como “o processamento sustentável de biomassa em produtos comercializáveis e energia”. Os mesmos autores ainda subdividem as biorrefinarias em 2 classificações extras baseadas no foco principal da planta, foco este que poder ser direcionado à energia ou direcionado ao produto.

Alguns autores classificam as biorrefinarias em 3 estágios de desenvolvimento de acordo com sua flexibilidade no uso de matérias primas e espectro de produtos fabricados (KAMM; KAMM, 2004). As biorrefinarias de estágio 1 geralmente usam grãos como matéria prima, tem pouca flexibilidade e possuem capacidades de processamento fixas, resultando

sempre nos mesmos produtos finais. As biorrefinarias de estágio 2 possuem mais flexibilidade, e mesmo possuindo matérias primas fixas, sua capacidade de processamento permite a produção de uma maior variedade de produtos finais, que podem ser ajustados de acordo com as necessidades do mercado. As biorrefinarias lignocelulósicas estão enquadradas como biorrefinarias de estágio 3, por sua flexibilidade de matérias primas que podem ser utilizadas neste modelo e maior espectro de produtos finais que idealmente podem ser produzidos (Figura 1).



Figura 1 - Diferentes estágios de biorrefinarias e suas respectivas características. Definições extraídas de KAMM; KAMM (2004), imagem de autoria própria.

Dentre os diferentes modelos de biorrefinarias, aqui será destacada a biorrefinaria de biomassa lignocelulósica. Nestas refinarias, diversas fontes de carbono, na forma de biomassa lignocelulósica, são utilizadas como matéria prima para a produção de moléculas químicas de base (os chamados “*building blocks*”), biocombustíveis e energia. Alguns autores acreditam que este modelo de biorrefinaria é um dos mais promissores devido ao baixíssimo custo de sua matéria prima e a compatibilidade de seus produtos finais com a já estabelecida economia linear baseada em combustíveis fósseis (KAMM; KAMM, 2004).

Além das características supracitadas, as biorrefinarias lignocelulósicas ainda possuem outra conveniência: por serem abastecidas primariamente com resíduos, não se faz necessário o acréscimo de áreas plantadas e nem se estabelece competição no uso da terra para fins alimentícios ou energéticos. Esse traço é um grande facilitador, pois evita desgastes políticos e sociais relacionados ao uso de terras agrícolas.

Diversos materiais lignocelulósicos gerados na agroindústria podem ser utilizados como fonte de carbono para alimentar a biorrefinaria lignocelulósica. FERREIRA *et al.* (2016) descreve uma grande variedade desses resíduos como palha e farelo de trigo, sabugo e palha de milho, cascas de frutas (maçã, banana, laranja), cascas de batata e cebola, restos da indústria cervejeira e por fim bagaço de cana-de-açúcar, que terá seu uso como substrato lignocelulósico discutido detalhadamente em outra seção.

Algumas etapas são necessárias no processo de transformar um resíduo agroindustrial lignocelulósico de baixo valor em etanol celulósico (também chamado etanol 2G ou de segunda geração), químicos de base e outros produtos de maior valor agregado. As etapas necessárias são sumarizadas, de forma simplificada, na Figura 2.

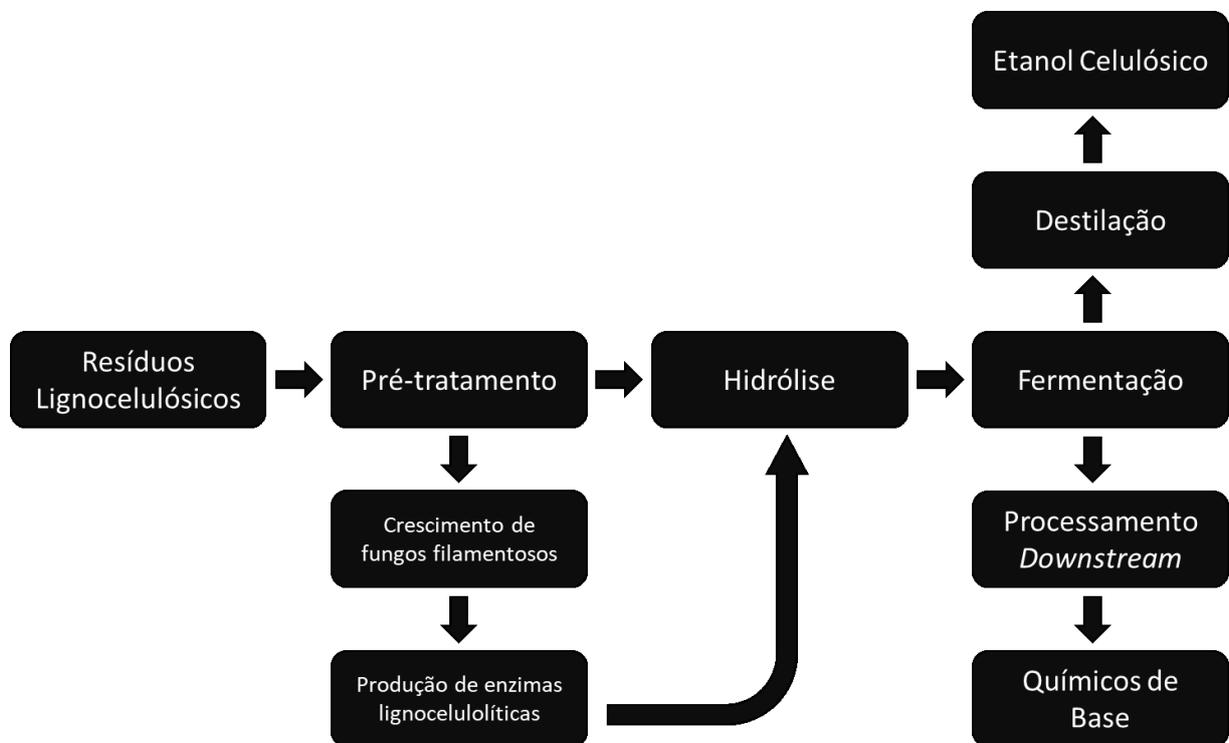


Figura 2 - Fluxograma simplificado do processo de biorrefino, incluindo a opção de produção local de enzimas lignocelulolíticas por fungos filamentosos que podem ser usadas na etapa de hidrólise. Fonte: autoria própria.

Após a coleta e transporte dos insumos lignocelulósicos uma das primeiras etapas necessárias é o pré-tratamento dos mesmos. Os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos e sua finalidade é facilitar as etapas subsequentes no processo de biorrefino. Essa facilitação pode ocorrer por diversos fatores como (1) a diminuição do tamanho do material (aumentando superfície de contato), (2) uma maior exposição dos componentes da parede celular vegetal que facilita o contato e subsequente hidrólise pelas

enzimas, (3) afrouxamento das porções cristalinas (mais recalcitrantes) de celulose e (4) redução das ligações entre a hemicelulose e a lignina (ADITIYA et al., 2016; MOOD et al., 2013). Também já foi verificado que quando fungos filamentosos são crescidos em fontes de carbono pré-tratadas ocorre uma maior produção de enzimas hemicelulolíticas, o que oferece mais uma opção para as biorrefinarias: produzirem as enzimas necessárias para a etapa de hidrólise na própria planta industrial (SILVA; FILHO, 2017).

Na etapa de hidrólise enzimática são empregadas diversas enzimas lignocelulolíticas e enzimas acessório que atuam sobre os resíduos, desconstruindo a parede celular vegetal e liberando açúcares fermentescíveis para as próximas etapas do processo. Quais enzimas são utilizadas, sua classificação, modo de ação e importância serão discutidas em uma seção futura deste trabalho.

Diferentes abordagens quanto à forma de utilização dos açúcares fermentescíveis liberados durante o processo de hidrólise são possíveis, sendo a fermentação à etanol e a fermentação para produção de ácidos orgânicos e outros produtos de valor as principais. Em ambos os casos, fungos da divisão Ascomycota são amplamente utilizados, seja no uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol ou de ascomicetos filamentosos como *A. niger* e *A. terreus* empregados na produção de ácido cítrico e itacônico respectivamente (FERREIRA et al., 2016).

Ressaltando a produção de etanol celulósico, já existem algumas biorrefinarias capazes de produzir o mesmo comercialmente. Um compilado das plantas existentes foi publicado por SILVA, VAZ e FILHO (2017) e destaca que a biorrefinaria *Beta Renewables* em Crescentino, Itália, é atualmente a maior produtora mundial de etanol celulósico, produzindo 75 milhões de litros por ano. O Brasil possui duas instalações que realizam a produção de etanol celulósico, sendo elas as biorrefinarias da GranBio e Raizen/Iogen, localizadas em Alagoas e São Paulo, respectivamente. A planta da GranBio, lançada em 2014, foi a primeira biorrefinaria do tipo no Brasil. Ambas as plantas utilizam bagaço e palha da cana-de-açúcar como matéria prima para a produção do etanol 2G (SILVA; VAZ; FILHO, 2017).

A Cana-De-Açúcar Como Biomassa Energética

A cana-de-açúcar é uma importante planta comercial cultivada em diversos países por seus caules ricos em sacarose, que pode ser extraída e utilizada para a produção de açúcar ou destinada à fermentação para fins energéticos ou para produção de bebidas (e.g., produção de cachaça). Cerca de 70% da produção açucareira tem sua base no cultivo de cana (LAKSHMANAN et al., 2005). Sua existência foi conhecida no ocidente pela primeira vez a mais de 2 milênios atrás, com a passagem dos exércitos de Alexandre o Grande pela Ásia (GRIVET et al., 2004).

O termo “cana-de-açúcar” é utilizado para se referir a espécies selvagens e domesticadas pertencentes ao gênero *Saccharum* (Poacea). Dados moleculares apontam a Nova Guiné como centro de origem de diversificação da planta, onde surgiu o dito “cultivar nobre”, *S. officinarum* L., que ao ser hibridizado e extensivamente selecionado com *S. spontaneum* gerou muitos dos híbridos hoje utilizados na agricultura (GRIVET et al., 2004; LAKSHMANAN et al., 2005). A Ásia, especialmente a China e Índia, também possuem alguns dos cultivares base que contribuíram para a hibridização das plantas atuais. Além disso a região asiática foi provavelmente a primeira a utilizar as plantas para iniciar uma indústria do açúcar (GRIVET et al., 2004).

O Brasil tem uma longa tradição no uso de tecnologias sucroalcooleiras derivadas do cultivo e processamento da cana-de-açúcar. Desde 1975 com o lançamento do programa Proálcool, como uma iniciativa visando a diminuição da dependência de combustíveis fósseis externos, o Brasil vem desenvolvendo diversas tecnologias de cultivo de cana e da utilização de seus produtos como o melaço para produção de açúcar ou álcool etílico para fins energéticos (SILVA et al., 2016).

A produção brasileira de etanol de primeira geração (1G), obtido através da fermentação do melaço da cana-de-açúcar atingiu aproximadamente 25 bilhões de litros em 2014 e o número de usinas sucro-alcooleiras no mesmo ano era de cerca de 390 espalhadas pelo território nacional (BARROS, 2014). O etanol de primeira geração produzido a partir da cana-de-açúcar é altamente competitivo, principalmente quando comparado ao modelo de etanol 1G dos Estados Unidos, baseado no milho. Enquanto o custo de mercado por quilo de carbono para a cana é de US\$ 0,17/kg C, o custo do mesmo quilo de carbono no sistema estadunidense baseado no milho é de US\$ 0.69/kg C e, para fins de comparação, o preço dos combustíveis fósseis é estimado em US\$ 0,57/kg C (CORRÊA DO LAGO et al., 2012).

Cerca de 768 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram colhidas no Brasil em 2016, o que torna o país o maior produtor mundial de cana-de-açúcar do mundo, produzindo mais que o dobro que a Índia, o segundo maior produtor (FAO, 2016). De acordo com CORRÊA DO LAGO e colaboradores (2012), 14% da produção de cana-de-açúcar torna-se bagaço. Outros autores estimam que esse valor seja na verdade de até 28% (HOFSETZ; SILVA, 2012). Logo, a cana-de-açúcar e os produtos residuais de sua cadeia produtiva como o citado bagaço e a palha da cana, são matérias primas abundantes e que tem enorme potencial para serem exploradas no Brasil como insumos de biorrefinarias lignocelulósicas para produção de etanol de segunda geração e de químicos de base (*building blocks*).

O cenário mais aceito para a inserção de biorrefinarias lignocelulósicas em território nacional é que elas sejam acopladas às refinarias sucro-alcooleiras já existentes e não criadas isoladamente. Muita da estrutura dessas usinas pode ser reaproveitada e as novas instalações podem ser apenas anexadas à planta original. DIAS et al. (2012) conceberam uma simulação que demonstrou a superioridade econômica da implantação da infraestrutura para produzir etanol 2G nas já existentes plantas 1G em comparação a criar novas instalações 2G isoladas. Outros trabalhos já consideraram a viabilidade dessa incrementação de tecnologia, onde parte do bagaço gerado pela usina seja direcionado para a produção de etanol 2G e de químicos de base na biorrefinaria anexa da planta original (CORRÊA DO LAGO et al., 2012).

Atualmente, o bagaço de cana-de-açúcar produzido nas usinas é queimado para a produção de vapor e energia elétrica (denominada “bioeletricidade”). Outro grande incentivo para a queima do bagaço para geração de energia elétrica reside no fato que este processo atinge seu pico durante a colheita da cana, época que coincide com os períodos de seca e baixa produtividade hidroelétrica. A energia elétrica gerada é utilizada pela própria refinaria. Pouco mais da metade das usinas sucro-alcooleiras (175 de um total de 370) registradas no Brasil vendem o excedente de bioeletricidade para a rede elétrica local (UNICA, 2016). O baixo e instável preço pago pela energia é o principal fator que desestimula o investimento na produção de bioeletricidade para fornecimento externo por parte do setor sucro-alcooleiro (CARPIO; DE SOUZA, 2017; HOFSETZ; SILVA, 2012).

Logo, temos um cenário conflitante onde existe uma potencial competição para o uso do bagaço de cana para a produção de bioeletricidade ou etanol celulósico (2G). Para que este bagaço tenha uma destinação mais sustentável (produção de etanol 2G) são necessários dois fatores (1) o baixo preço de revenda da eletricidade gerada pela queima do bagaço e/ou (2) a diminuição dos custos de produção de etanol 2G, elevando sua competitividade (HOFSETZ; SILVA, 2012).

O modelo desenhado por CORRÊA DO LAGO et al. (2012) comporta o uso de parte do bagaço na produção de energia elétrica (diminuindo o custo final dos produtos gerados na biorrefinaria lignocelulósica) e parte para a produção de etanol 2G e químicos de base em uma proporção que permitiria considerável eficiência e lucro para a planta. CARPIO e de SOUZA (2017) também calcularam um modelo otimizado de produção mista entre bioeletricidade e produção de etanol 2G que estima 84% de alocação de bagaço para produção do último. Os motivos ressaltados pelos autores para um maior investimento na produção de etanol celulósico consistem nas projeções de grande demanda pelo combustível devido à disseminação cada vez maior de veículos *flex-fuel* no país e a atual mistura brasileira de 27% de etanol na gasolina.

A Parede Celular Vegetal (PCV)

A parede celular constitui 50% do peso da biomassa vegetal e é provavelmente um dos componentes mais característicos do reino *Plantae*, sendo uma estrutura chave para a classificação botânica, biologia, evolução e inclusive para as aplicações biotecnológicas da matéria vegetal (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010). As indústrias têxtil, madeireira, do papel e mais recentemente a indústria de biorrefinarias lignocelulósicas dependem fortemente da composição e características das paredes celulares das plantas utilizadas em seus processos (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010). Diversos detalhes sobre a arquitetura, síntese e composição da parede celular ainda estão sendo elucidados, mas nesta seção serão apresentados algumas das mais recentes conclusões no campo da bioquímica/biofísica da parede celular vegetal (PCV).

Uma característica de destaque na parede vegetal é sua composição rica em carboidratos e compostos fenólicos, contendo mais de 90% dos mesmos, e pobre em proteínas que ocupam os 10% restantes (HÖFTE; VOXEUR, 2017). Essa característica está evolutivamente de acordo com a abundante disponibilidade de carbono vivida pelas plantas (por serem organismos fotossintéticos) e pela relativa baixa presença de nitrogênio e enxofre (ambos necessários para a síntese de proteínas) adquiridos no solo em relação ao carbono (HÖFTE; VOXEUR, 2017; SARKAR; BOSNEAGA; AUER, 2009).

Duas composições distintas podem ser encontradas na parede celular a depender do estágio de desenvolvimento e do tipo de células observadas: a parede primária e a parede secundária. A parede primária é encontrada em tecidos que ainda estão em crescimento e possui uma constituição que garante a flexibilidade necessária para permitir a expansão do

protoplasma interno enquanto sustenta a pressão exercida por essa expansão e por choques mecânicos externos (JOHNSON et al., 2017). Essa flexibilidade da parede primária permite que diferentes tecidos vegetais possuam células com formas e tamanhos variados. Já a parede celular secundária é mais grossa, com camadas depositadas internamente à parede primária e com um maior teor de lignina, o que as torna células mais inflexíveis e impermeáveis (JOHNSON et al., 2017).

Independente de considerarmos a parede primária ou secundária, parte da arquitetura central da PCV segue a mesma estrutura básica, que pode ser visualizada na Figura 3. Essa estrutura é composta por microfibrilas de celulose orientadas, imersas em um gel dissipativo (chamado hemicelulose) composto por uma matriz de carboidratos não celulósicos (HÖFTE; VOXEUR, 2017). Essa combinação provê as características estruturais da PCV e os detalhes de sua composição serão elaborados a seguir.

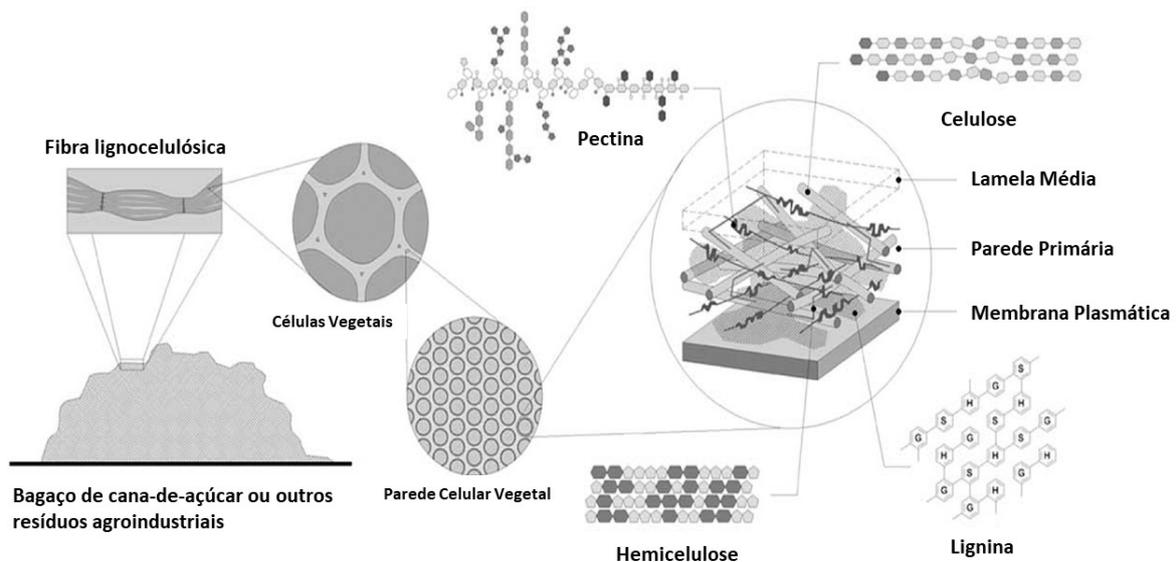


Figura 3 - Organização geral da parede celular vegetal. Extraído e modificado de SIQUEIRA e FILHO (2010).

Celulose

A celulose é um polímero linear constituído de moléculas de glicose unidas entre si por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4). Essas cadeias lineares são sintetizadas em paralelo por um complexo enzimático denominado celulose sintase que está imerso na membrana plasmática da célula vegetal (COSGROVE, 2014). As cadeias de glicanos produzidas são organizadas em microfibrilas (Figura 4) cujo comprimento é altamente variado e ainda incerto (COSGROVE, 2014).

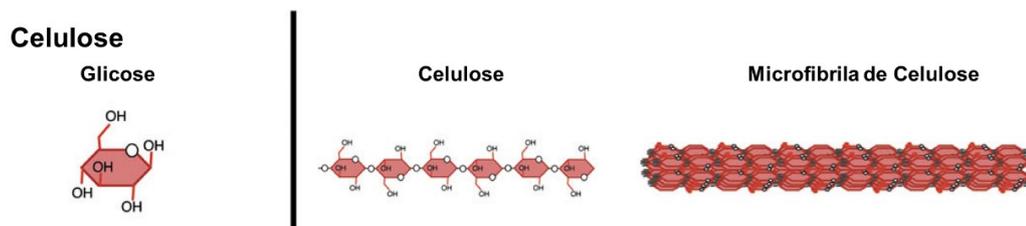


Figura 4 - Estrutura da celulose e sua organização em microfibrilas. Extraído e modificado de SARKAR, BOSNEAGA e AUER (2009).

Diferentes modelos já foram propostos para estimar quantas cadeias de celulose compunham uma microfibrila, no entanto o mais aceito atualmente considera 18 cadeias, organizadas em formato hexagonal, como sendo a estimativa mais exata (COSGROVE, 2014; HÖFTE; VOXEUR, 2017). Esta microfibrila de 18 cadeias em formato hexagonal é denominada de microfibrila fundamental e sua espessura é calculada na ordem de aproximadamente 3 nm (HÖFTE; VOXEUR, 2017). Os resíduos de glicose envolvidos na polimerização das fibras estão arranjados de forma a proporcionar duas superfícies distintas: uma polar nas partes superior e inferior do hexágono (para onde apontam as hidroxilas) e uma apolar nas laterais (onde encontram-se o esqueleto hidrofóbico dos carboidratos), tal configuração anfílica parece ter relações importantes com a arquitetura da PCV (HÖFTE; VOXEUR, 2017).

As microfibrilas possuem duas fases organizacionais: uma fase cristalina, altamente organizada, alinhada e compacta, que contribui significativamente para a recalcitrância da PCV e uma fase amorfa, menos direcional e organizada e que também possui menor recalcitrância (KULASINSKI et al., 2014). Uma representação computacional das duas fases e de sua fase de transição, a celulose paracristalina, estão presentes na Figura 5.

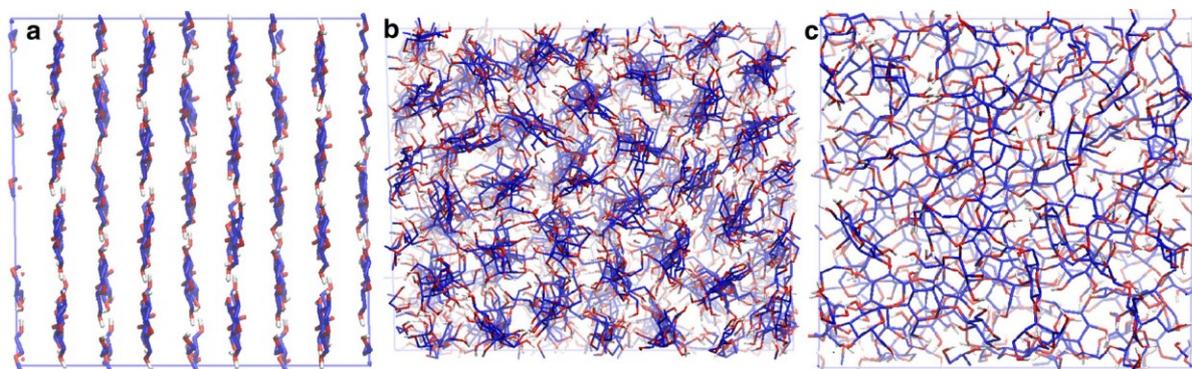


Figura 5 – Representações computacionais das fases cristalina (a), paracristalina (b) e amorfa (c) da celulose. Extraído de KULASINSKI et al. (2014).

Hemicelulose

As hemiceluloses, em conjunto, são o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (sendo a celulose o primeiro) e estão presentes na PCV em proporções que variam de 20-35% (SAHA, 2003). A hemicelulose é composta por uma variedade de polímeros não-celulósicos que atuam formando uma matriz com características gelatinosas que interage diretamente com as microfibrilas de celulose, sendo as xilanas os polissacarídeos mais prevalentes entre os diversos componentes hemicelulósicos (SAHA, 2003).

As xilanas são polissacarídeos compostos por uma cadeia principal de D-xilose unida por ligações β -(1 \rightarrow 4). Essa cadeia principal pode ser ramificada com resíduos de ácido D-glicurônico (formando a glicuronoxilana), com resíduos de L-arabinose (formando a arabinoxilana) ou com ambos (formando a glicuronoarabinoxilana).

Outra hemicelulose importante é a manana, constituída de resíduos de D-manose também unidos por ligação β -(1 \rightarrow 4). Assim como ocorre na xilana, a manana também pode ser adornada com resíduos de outros carboidratos como a D-galactose (formando as galactomananas). Outro polissacarídeo relacionado às mananas são as galactoglicomananas que são compostas por uma cadeia linear alternando resíduos de manose e glicose que podem ser ramificadas com resíduos de galactose.

Diferente da celulose, que possui composição e estrutura compartilhadas de forma muito semelhante para virtualmente quase todos os vegetais, a hemicelulose possui uma composição heterogênea e complexa que pode variar ainda mais dependendo do grupo botânico em questão. A composição da PCV primária é subdividida classicamente por alguns autores em Tipo I e Tipo II, sendo os tipos de hemicelulose presentes o fator determinante para esta classificação. Paredes do Tipo I são encontradas em gimnospermas, dicotiledôneas e monocotiledôneas não comelinídeas, sua principal característica é a abundância de xiloglicanos (XyG) e pectinas compondo sua porção hemicelulósica. As paredes Tipo II, que são encontradas nas monocotiledôneas comelinídeas (onde se encontra a ordem Poales, na qual estão inseridas as gramíneas), tem sua hemicelulose composta majoritariamente por glicuronoarabinoxilanas (GAXs) e (1,3;1,4)- β -D-glucanos, além de serem pobres em pectinas e XyG (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). A Tabela 1 e Figura 6 abaixo mostram respectivamente a quantidade de componentes hemicelulósicos encontrados em diferentes plantas e representações esquemáticas dos mesmos.

Tabela 1 - Composição percentual das hemiceluloses mais comuns em dicotiledôneas, gramíneas e coníferas. Extraído e modificado de SCHELLER e ULVSKOV (2010).

Polissacarídeo	Dicotiledôneas		Gramíneas		Coníferas	
	Primária	Secundária	Primária	Secundária	Primária	Secundária
Xiloglicanos	20-25	Mínimo	2-5	Mínimo	10	- ^b
Glicuronoxilana	-	20-30	-	-	-	-
Glicuroarabinoxilana	5	-	20-40	40-50	2	5-15
(Glico)manana	3-5	2-5	2	0-5	-	-
Galactoglicomanana	-	0-3	-	-	+ ^b	10-30
β-(1,3),(1,4)-glucanos	Ausente	Ausente	2-15	Mínimo	Ausente	Ausente

Valores são médias calculadas pelos autores a partir de diversas fontes. -^b, ausente ou insignificante; +^b, presente porem sem dados quantitativos. Quantidade de polissacarídeos na parede (% m/m).

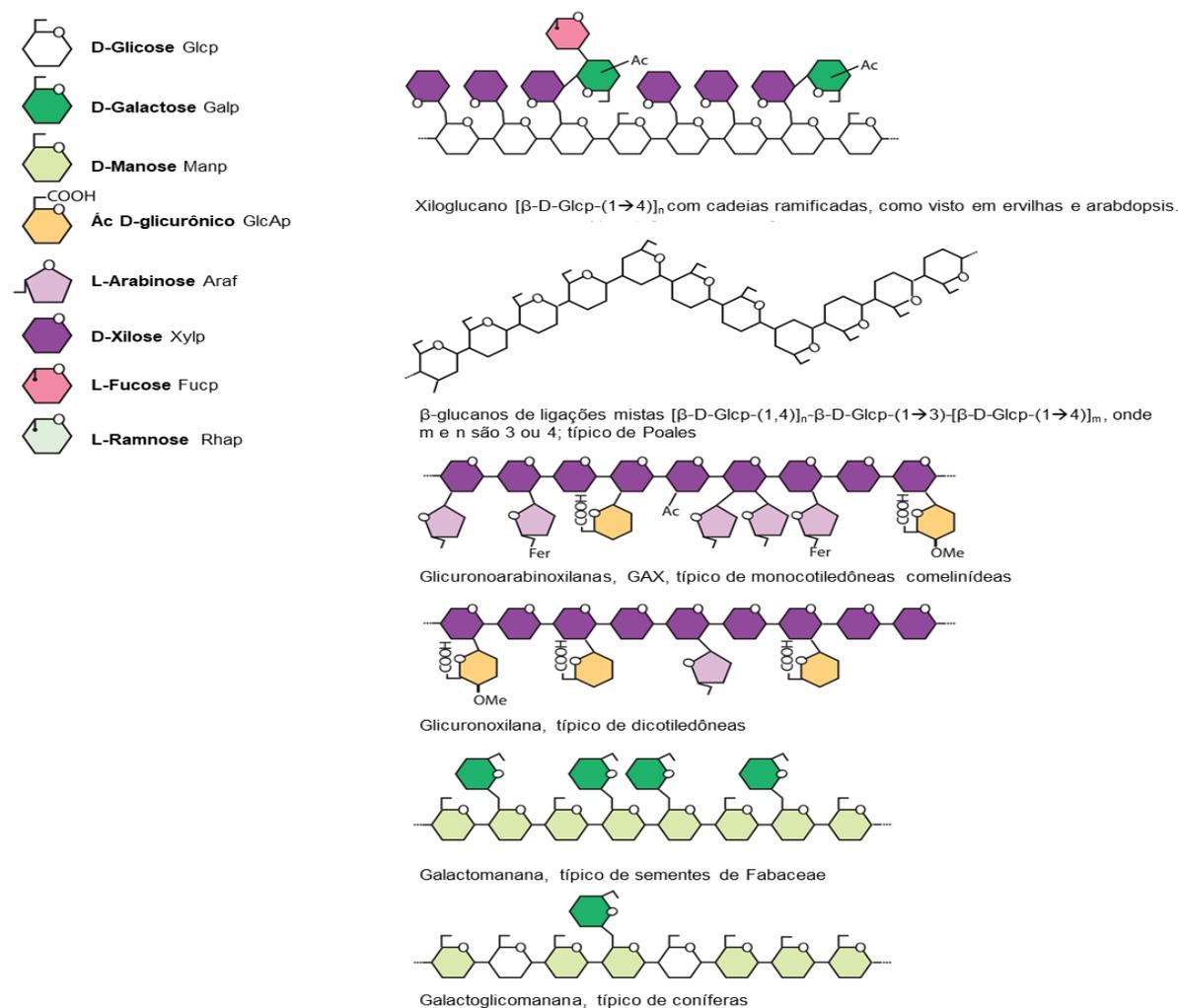


Figura 6 - Polissacarídeos hemicelulósicos mais comuns. “Fer” representa esterificações com ácido ferúlico. Extraído e adaptado de SCHELLER e ULVSKOV (2010).

Pectinas

Pectinas são polissacarídeos ricos em ácido D-galacturônico unidos na cadeia principal por ligações α -(1,4) e compõe um porção importante da PCV primária, chegando por vezes a 35% da mesma dependendo do grupo botânico considerado (HOCQ; PELLOUX; LEFEBVRE, 2017). Outra função importante das pectinas é como um dos componentes majoritários da lamela média, uma camada gelatinosa que se encontra entre as paredes primárias de duas células vegetais adjacentes, evitando a fricção e contato direto entre células vizinhas (ZAMIL; GEITMANN, 2017). Dentre os polissacarídeos pécnicos pode-se destacar as homogalacturonanas, as ramnogalacturonanas I e as ramnogalacturonanas II cujas estruturas estão ilustradas na Figura 7 (bem como esquematizações estruturais da celulose, hemicelulose e diversos monômeros constituintes da PCV). As pectinas, especialmente as homogalacturonanas cumprem papel fundamental na adesão entre as células vegetais e, portanto, tem influências na indústria dos biocombustíveis 2G por afetar a hidrólise da biomassa (LATARULLO et al., 2016). Além disso, indicativos que associações entre pectinas e a lignina podem contribuir para aumento da recalcitrância durante a hidrólise da PCV de *Miscanthus sinensis* já foram encontrados (DE SOUZA et al., 2015).

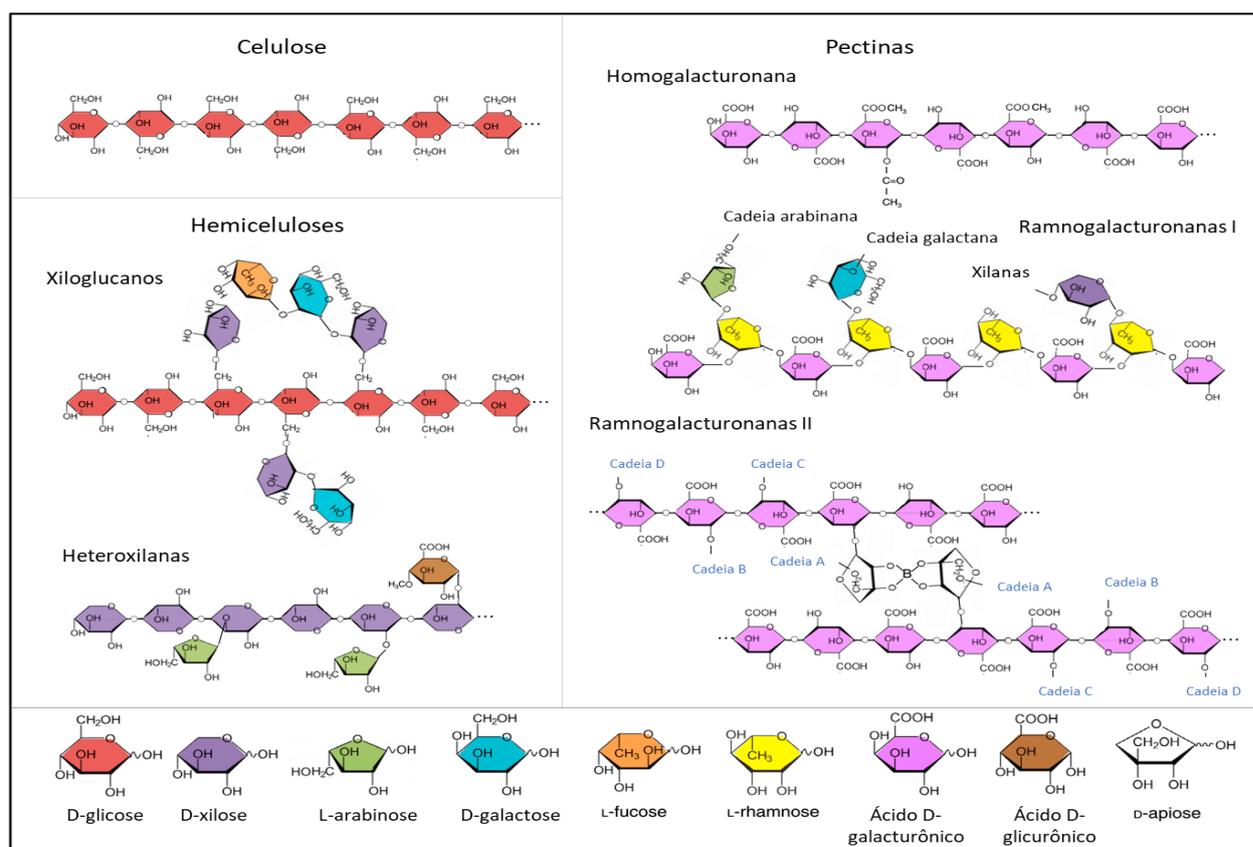


Figura 7 – Esquematização estrutural dos polímeros de celulose, hemicelulose e pectina, com suas respectivas variações e monossacarídeos constituintes. Extraído e modificado de HÖFTE e VOXEUR (2017).

Lignina

A lignina é o segundo biomolécula mais abundante na natureza (não confundir com a hemicelulose, que é o segundo *polissacarídeo* mais abundante), perdendo apenas para a celulose e representando cerca de 30% de todo o carbono na biosfera (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). A lignina é provavelmente o composto mais importante na história evolutiva da colonização da terra pelas plantas, e seu aparecimento influenciou enormemente não só as plantas como os organismos que com elas interagem e até mesmo a composição da atmosfera terrestre (ROBINSON, 1990; WENG et al., 2010).

A origem molecular da lignina reside em hidroxicinamoil álcoois (também chamados monolignóis ou fenilpropanóides) aromáticos derivados do aminoácido fenilalanina. Os principais monolignóis envolvidos na formação da lignina são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 8), que quando incorporados via combinação oxidativa formam os resíduos *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (VANHOLME et al., 2010).

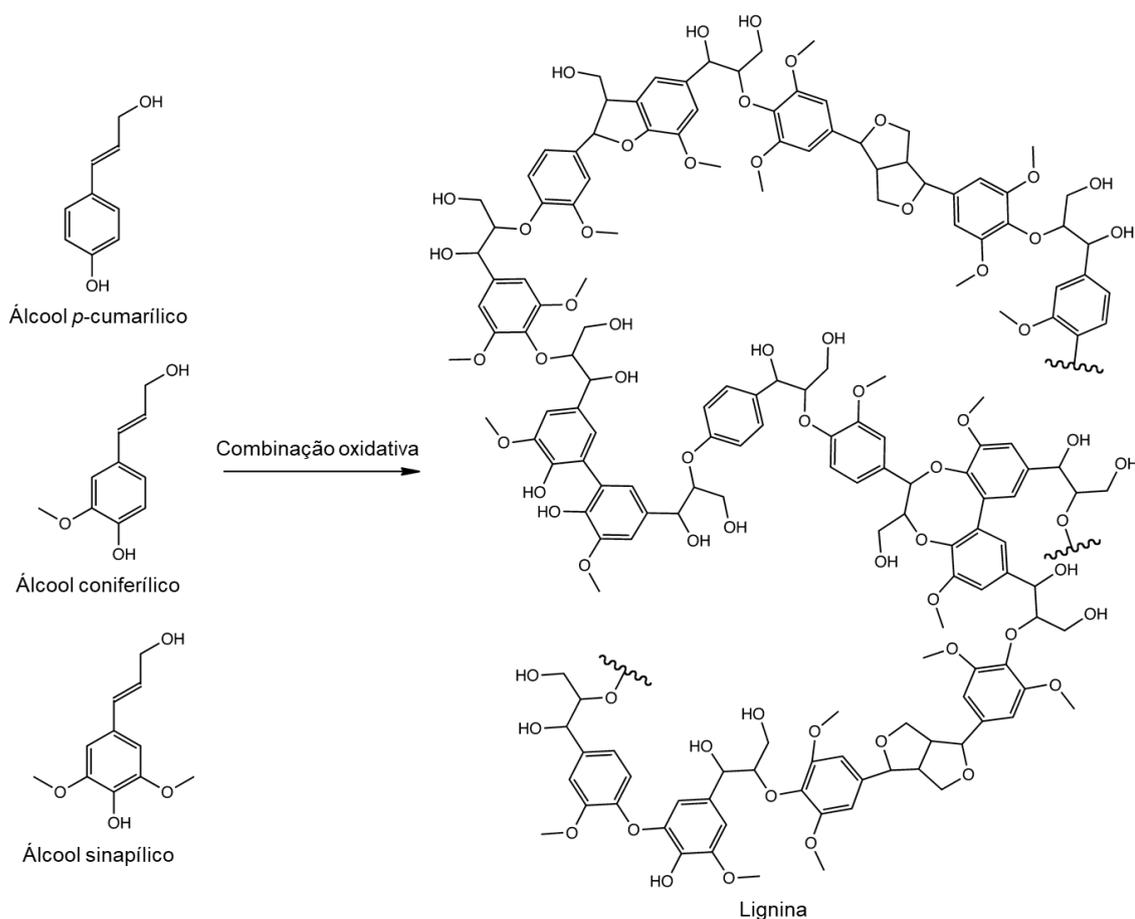


Figura 8 - Álcoois precursores da lignina e estrutura geral da mesma. Extraído e modificado de WENG e CHAPPLE (2010).

Um dos principais contribuintes para a recalcitrância da PCV é a presença de lignina e de complexos lignina-carboidratos. Pelo menos 5 razões principais fazem da lignina (e seus complexos) uma substância resistente à degradação microbiana: (1) a lignina é insolúvel, (2) grande demais para atravessar a parede celular dos microrganismos, (3) é heterogênea demais para ser degradada de forma específica por enzimas, (4) seus produtos de degradação são tóxicos e também recalcitrantes, (5) a taxa C:N na lignina é tão alta que pouquíssimos organismos conseguem subsistir na mesma (KIRK, 1987; ROBINSON, 1990).

A Parede Celular da Cana-de-açúcar

Dentre as monocotiledôneas comelinídeas tem-se a ordem Poales, que engloba a família Poaceae (comumente conhecidas como gramíneas) da qual o gênero *Saccharum*, que inclui todas as 6 variedades de cana-de-açúcar, faz parte. Sendo assim podemos agrupar a parede celular da cana-de-açúcar como sendo do Tipo II, como já mencionado anteriormente.

BUCKERIDGE et al. (2015) propõe um modelo para a porção celulósica da PCV da cana-de-açúcar onde as microfibrilas de celulose se unem formando uma microfibrila. Esta microfibrila seria formada por cerca de 7 microfibrilas, de aproximadamente 3 nm cada, e seu diâmetro seria de 12 nm. Essas microfibrilas não estariam em contato direto umas com as outras, mas sim intercaladas e firmemente associadas com arabinoxilanas e xiloglicanos, ambos componentes da hemicelulose. Mais externamente, toda essa estrutura estaria sendo recoberta por outra porção hemicelulósica mais frouxamente aderida, composta de arabinoxilanas ramificadas e β -glucanos de cadeias mistas. Por fim, toda essa estrutura de microfibrilas e seus polissacarídeos adjacentes estariam inseridos em uma matriz gelatinosa composta de pectinas e β -glucanos de cadeias mistas. É importante ressaltar que apesar deste modelo ser bem embasado por dados experimentais de DE SOUZA et al. (2013) e DING e HIMMEL (2006) e ser provavelmente um dos mais completos até o momento, mais experimentos devem ser realizados para sua confirmação total em amostras de cana-de-açúcar.

Quanto à composição química específica da hemicelulose, a PCV da cana-de-açúcar apresenta 60% de arabinoxilana, 10% de xiloglicanos, 10% de β -glucanos de cadeias mistas e apenas traços de mananas (DE SOUZA et al., 2013). Também é ressaltado por BUCKERIDGE et al. (2015) que interações polímero-polímero, ramificações com resíduos de acetil ésteres e ácido ferúlico e ligações cruzadas da hemicelulose com a lignina (que

acontecem mais nas células vasculares como xilema e fibras do que nos outros tecidos) provavelmente contribuem com a recalcitrância da PCV.

As pectinas, apesar de pouco prevalentes como em todas as gramíneas, são encontradas na lamela média (homogalacturonana) e inseridas nas paredes celulares de virtualmente todos os órgãos da planta (ramnogalacturonanas I, arabinanas e galactanas) (LEITE, 2013). Também foi verificado que os vértices entre as células adjacentes são as regiões mais ricas em compostos pécticos, principalmente homogalacturonana (LEITE, 2013). Uma das principais contribuições das pectinas para a recalcitrância da parede vegetal é que as mesmas controlam a porosidade da célula, limitando assim o contato das enzimas com as estruturas mais internas da PCV (BUCKERIDGE et al., 2015).

Já foi encontrada evidência de uma concentração elevada de compostos fenólicos associados a polissacarídeos na PCV da cana-de-açúcar que não necessariamente estão na forma de lignina (DA SILVA, 2005). Estudos com microscopia confocal e eletrônica realizados por SANT'ANNA et al. (2013) evidenciaram a presença de ligninas em basicamente todas as células da PCV da cana, especialmente nas células do xilema (como esperado). No mesmo trabalho também foi notada a presença de ligninas (ou compostos semelhantes) na lamela média entre as células.

Holocelulases

Celulases

As celulases são uma classe de enzimas glicosídeo hidrolases capazes de hidrolisar as ligações β -(1,4) presentes no polímero de celulose. São enzimas de extrema importância industrial e devido a isso são provavelmente um dos grupos enzimáticos mais estudados. Informações sobre as famílias de glicosídeo hidrolases e de outras enzimas ativas em carboidratos podem ser encontradas no banco de dados CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>).

Três grupos de celulases merecem destaque por suas formas distintas de atuação sobre o polímero celulósico, são elas as endoglicanases (EC 3.2.1.4); exoglicanases, também conhecidas como celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21). Uma esquematização de suas atividades é apresentada na Figura 9.

Endoglicanases hidrolisam aleatoriamente o interior do polímero celulósico, gerando assim extremidades redutoras e não-redutoras nas quais as exoglicanases podem atuar. As exoglicanases atuam nas extremidades da cadeia celulósica sendo que alguns tipos dessas

enzimas atuam sobre as extremidades redutoras (CBH I) e outras sobre as extremidades não-redutoras (CBH II), ambas no entanto liberam celobiose (dímero de glicose unido por ligação β -(1,4)) ao fim de sua hidrólise (ANNAMALAI; RAJESWARI; SIVAKUMAR, 2016). Com dímeros de celobiose disponíveis, as β -glicosidases finalizam a degradação, hidrolisando a ligação β -(1,4) e liberando os monômeros de glicose, o que a torna uma enzima limitante para a eficiência geral da hidrólise (SINGHANIA et al., 2013).

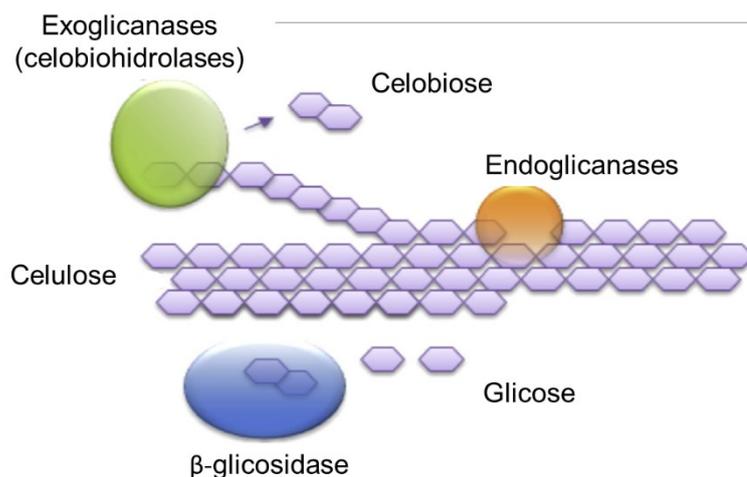


Figura 9 – Principais tipos de celulases e sua forma de atuação na cadeia celulósica. Extraído e modificado de SINGHANIA et al. (2017).

Percebe-se facilmente que tais enzimas devem atuar de forma conjunta e sinérgica para uma eficiente degradação da celulose já que os substratos de uma dependem do produto das outras. Entende-se por sinergismo o fenômeno onde grupos de enzimas atuando em conjunto possuem uma maior atividade/eficiência do que a soma de suas partes atuando isoladamente. Um gargalo recorrente na produção de coquetéis enzimáticos eficientes é a deficiência de β -glicosidases nas cepas de *T. reesei* empregadas na produção industrial de celulases. A ausência de atividade de β -glicosidase no coquetel provoca um acúmulo de celobiose que muitas vezes é um inibidor das atividades exoglicanases, prejudicando assim todo a cadeia hidrolítica (SINGHANIA et al., 2013).

Celulases fúngicas podem ser tanto enzimas unimodulares (que possuem apenas seu módulo catalítico) ou podem ser multimodulares. Quando outro módulo está presente é comum que o mesmo seja um módulo de ligação a carboidratos (CBMs), unidades não catalíticas que possuem a função de fixar a enzima em seu substrato insolúvel (celulose). Sabe-se que no caso de *T. reesei*, por exemplo, a maioria das endo e exoglicanases são

bimodulares e possuem CBMs (KARLSSON et al., 2002). No entanto, apesar de parecer uma grande vantagem, a presença de CBMs já foi constatada como um fator que aumenta as ligações não produtivas das celulasas com a lignina (RAHIKAINEN et al., 2013), possivelmente diminuindo a eficiência hidrolítica final. Logo, a presença de CBMs não é uma garantia de melhores resultados finais e se possível deve ser avaliada separadamente para cada aplicação.

Atualmente sabe-se que não são apenas as tradicionais celulasas as responsáveis pela degradação da celulose. Outros grupos de enzimas como as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), anteriormente classificadas na família GH61 e agora reclassificadas na família de enzimas acessórios AA9, também contribuem para a quebra da celulose. No caso das LPMOs fúngicas a principal contribuição dessas enzimas parece estar relacionada com degradação das porções cristalinas da celulose. Apesar de sua importância, tais enzimas não são o foco deste trabalho e não serão mais detalhadas. Excelentes revisões sobre a história, bioquímica e modo de ação destas enzimas podem ser encontrados na literatura nos trabalhos de MORGENSTERN, POWLOWSKI e TSANG (2014) e MONCLARO e FILHO (2017). Além disso para certos autores, xilanases podem ser consideradas como enzimas acessórios na degradação de celulose (HU et al., 2013) e esse grupo de enzimas será discutido a seguir.

Xilanases

Apesar do termo “xilanase” ser empregado para basicamente qualquer enzima que atue sobre a cadeia de xilana e suas ramificações, o termo é mais amplamente utilizado para descrever a enzima Endo-1,4- β -xilanase (E.C 3.2.1.8). Tais enzimas são glicosídeo hidrolases capazes de catalisar a quebra da ligação β -(1,4) que une as xiloses na cadeia principal de xilana, liberando inicialmente xilooligômeros de tamanhos variados mas em estágios mais avançados de hidrólise eventualmente liberando tri, di e mono xilosacarídeos (POLIZELI et al., 2005). Xilanases podem ser encontradas em diversas famílias como as famílias GH 5, 7, 8, 10, 11 e 43 (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Diferente das celulasas, não foi encontrada ainda uma enzima específica com uma atividade “exoxilosidase” que atue de forma análoga às exoglicanases.

Outra enzima xilanolítica de extrema importância é a β -xilosidase (E.C. 3.2.1.37), responsável por catalisar a hidrólise da ligação β -(1,4) de moléculas de xilobiose (ou xilotriose), liberando assim os monossacarídeos de xilose. Na prática, as β -xilosidases são

capazes de liberar monossacarídeos de xilose a partir de xilooligômeros ligeiramente maiores, com sua afinidade pelo substrato decrescendo à medida que o grau de polimerização da cadeia aumenta (POLIZELI et al., 2005).

Como ressaltado na seção sobre a composição da parede celular vegetal, a xilana é um substrato bastante diverso e heterogêneo, podendo conter diversas ramificações. Dentre essas ramificações/decorações, uma das mais comuns principalmente nas paredes de gramíneas são os resíduos de L-arabinose, muito presentes na arabinoxilana. A remoção destas decorações é feita pela enzima *exo- α -L-arabinofuranosidase* (E.C. 3.2.1.55) (LAGAERT et al., 2014). Uma esquematização das atividades supracitadas é fornecida na Figura 10 abaixo.

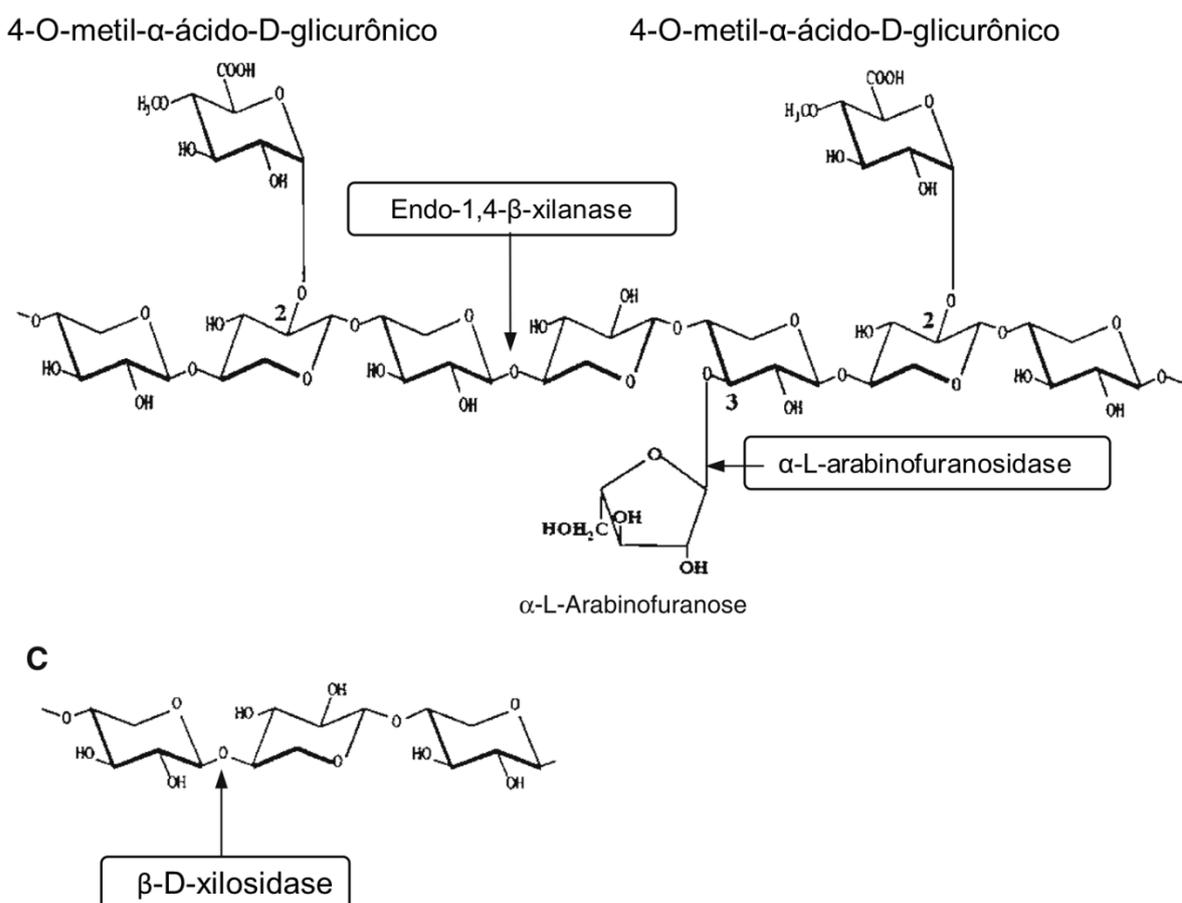


Figura 10 – Esquematização de uma porção da cadeia de xilana e de algumas enzimas xilanolíticas que atuam sobre a mesma. Extraído e modificado de POLIZELI et al. (2005).

Outras enzimas como *α-glicuronidasas* (EC 3.2.1.139), *acetilxilana esterases* (EC 3.1.1.6), *feruloil esterases* (EC 3.1.1.73) e *ácido *p*-cumárico esterases* (EC 3.1.1.-) atuam de forma sinérgica com outras xilanases sobre a cadeia principal de xilana removendo as diversas ramificações presentes (MOREIRA e FILHO, 2016). Como tais atividades não

fazem parte do projeto principal de investigação deste trabalho elas não serão mais detalhadas, mas revisões muito informativas sobre suas atividades e sobre as xilanases anteriormente descritas podem ser encontradas nos trabalhos de (ADESIOYE et al., 2016; COLLINS, GERDAY e FELLER, 2005; POLIZELI et al., 2005).

Pectinases

As pectinases, em geral, catalisam a quebra das ligações α -(1,4) da cadeia de pectina de duas formas distintas: hidrólise e/ou trans-eliminação. Devido à complexa heterogeneidade das diversas cadeias de compostos pécticos, não é uma surpresa que a pectina possua um dos maiores arranjos de diferentes enzimas e atividades necessárias para sua total desconstrução e pelo menos 3 grupos merecem ser brevemente elaborados.

As pectinaesterases são responsáveis pela remoção dos grupos metil-ésteres muito presentes na composição da pectina. A ação das mesmas sobre a cadeia de pectina forma o ácido péctico (ou pectato), substrato importante para as poligalacturonases.

As poligalacturonases atuam preferencialmente sobre o substrato ácido péctico e podem ser classificadas quanto à sua atividade como endo (E.C 3.2.1.15) e exo (E.C 3.2.1.67) poligalacturonases, que atuam quebrando as ligações α -(1,4) dos resíduos de ácido galacturônico na porção interna e na extremidade não-redutora, respectivamente.

No caso da pectina não desesterificada (que não foi tratada pelas pectinaesterases), as enzimas atuantes são as polimetilgalacturonases, que funcionam de maneira endo e exo assim como as poligalacturonases supracitadas, sendo a única diferença a especificidade que cada grupo tem por pectina não-esterificada ou esterificada. Todas as enzimas supracitadas compartilham o mecanismo de quebra da cadeia péctica via hidrólise, quando a desconstrução é feita por vias de trans-eliminação, as enzimas responsáveis são as chamadas liases.

As liases também catalisam a quebra das ligações glicosídicas α -(1,4) entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia de pectina, no entanto, sua forma de ação por trans-eliminação produz galacturonato (que possui uma insaturação entre os carbonos C4 e C5) além de ácido galacturônico (TAPRE; JAIN, 2014). O mesmo padrão de nomenclatura se mantém, com as polimetilgalacturonato liases possuindo maior atuação sobre a pectina (esterificada), e as poligalacturonato liases tendo preferência pelo ácido péctico (não-esterificado). Ambas as classes de enzimas possuem representantes que atuam de forma endo (internamente na cadeia de pectina/ácido péctico) ou exo (nas extremidades). Para facilitar o

entendimento dessas variadas atividades a Figura 11 propõe uma esquematização da atuação de cada um dos grupos enzimáticos comentados.

Outras enzimas ainda estão presentes na degradação da pectina, como por exemplo pectina-acetil esterases, ramnogalacturonases e ramnogalacturonana liases, que atuam sobre os resíduos acetil-éster e sobre a ramnogalacturonana, respectivamente (SHARMA; RATHORE; SHARMA, 2012).

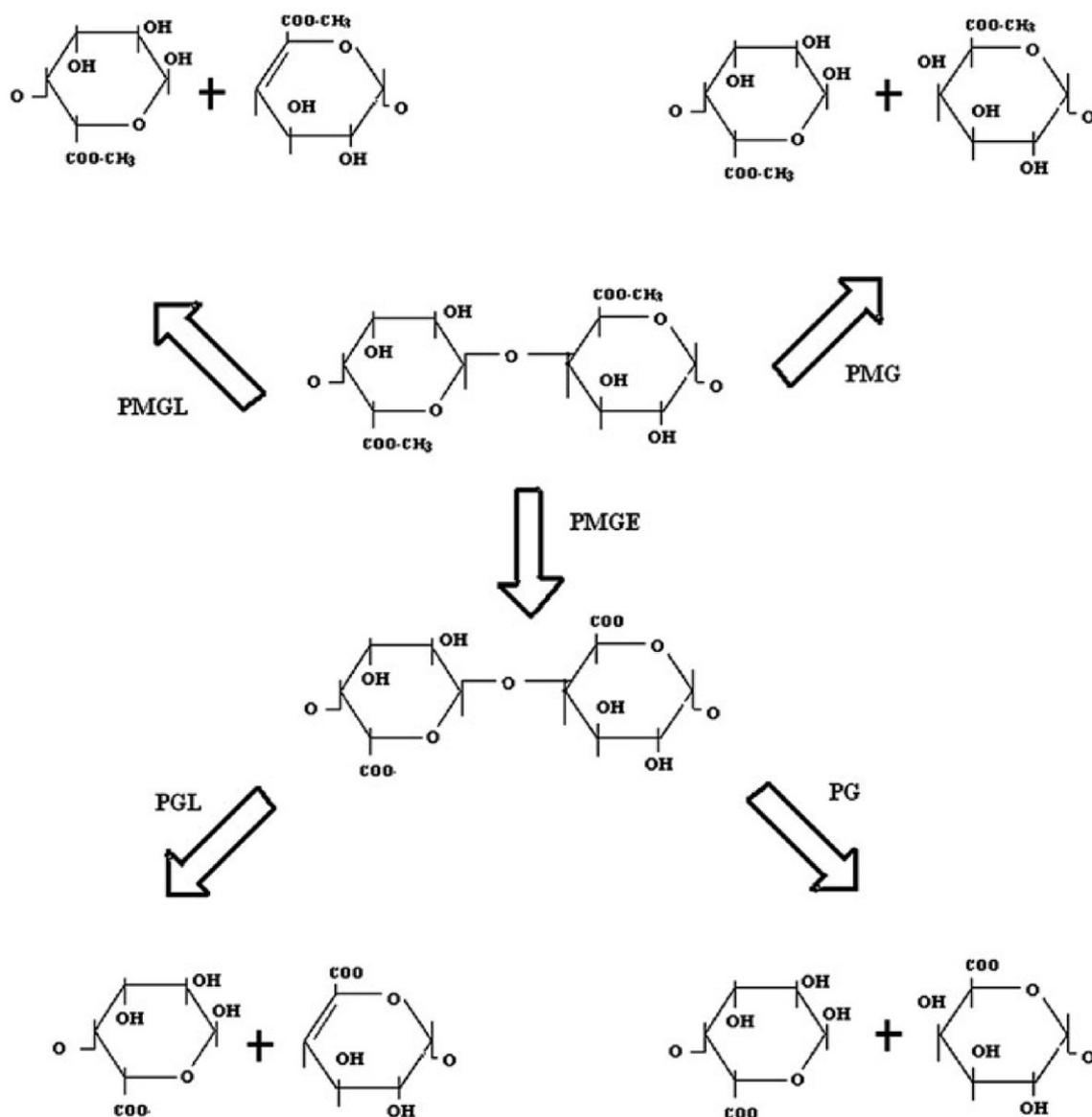


Figura 11 – Modo de ação de alguns grupos de enzimas pectinolíticas. PMGL – polimetilgalacturonato liases (pectina liase), PMG – polimetilgalacturonases (hidrolase), PMGE – polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase), PGL – poligalacturonases (hidrolase). Extraído e modificado de SHARMA, RATHORE e SHARMA (2012).

Mananases

A catálise da despolimerização da manana é realizada por um arranjo variado de enzimas e devido a existência da glicomanana em algumas paredes vegetais, enzimas características da hidrólise da celulose como as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) também atuam sobre o polímero. Os principais atuantes na desconstrução da manana são as enzimas endo- β -mananases (EC 3.2.1.78) que hidrolisam as ligações β -(1,4) internas da cadeia e exo- β -mananases (EC 3.2.1.25), também chamadas de β -manosidases, que catalisam a mesma reação, porém atuando nas extremidades não-redutoras do polímero. Enzimas como acetilmananaesterases (EC 3.1.1.6) e α -galactosidases (EC 3.2.22) também contribuem no processo, removendo substituintes laterais (SHARMA; DHILLON; GOYAL, 2018).

Ligninases

Lignina peroxidases (LiPs) (EC 1.11.1.14) são enzimas capazes de catalisar a despolimerização oxidativa da lignina em uma reação ativada por H_2O_2 . Tais enzimas são conhecidas por não terem grande especificidade por um substrato único, ou seja, elas atuam em outros compostos fenólicos e não fenólicos não relacionados à lignina, como por exemplo o álcool veratrílico (muito utilizado nos ensaios de detecção dessas enzimas) (KHINDARIA; YAMAZAKI; AUST, 1995).

As enzimas manganês peroxidase (MnPs) (EC 1.11.1.13) também são enzimas atuantes na despolimerização da lignina. No entanto tais enzimas possuem um mecanismo curioso onde, na presença de H_2O_2 e Mn^{2+} , o manganês é oxidado pela enzima a Mn^{3+} e esta forma oxidada do mesmo atua oxidando outros compostos orgânicos para reaver seus elétrons perdidos na reação anterior (WONG, 2008).

Ambas as enzimas supracitadas foram primeiramente descobertas e caracterizadas a partir do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN; KIRK, 1988) e o trabalho de WONG (2008) detalha muito bem sua história, modo de ação e características bioquímicas/biofísicas.

Interações microbianas, co-cultivos fúngicos e a interação fungo-fungo

Em ambientes naturais, imaginar uma situação onde apenas um tipo de microrganismo, uma cultura pura, colonize uma determinada área ou substrato é praticamente impensável. No entanto, diversas aplicações microbiológicas industriais dependem da presença exclusiva de apenas um microrganismo chave para o processo, e essa afirmação é ainda mais assertiva quando referida a fungos filamentosos. Isso ocorre devido às facilidades

de se trabalhar com menos variáveis permitindo um controle mais fino e, principalmente, mais reprodutível de processos já estabelecidos.

As interações microbiológicas podem ser enquadradas nas relações ecológicas padrão encontradas em livros-texto, relações estas que podem ser classificadas em harmônicas ou desarmônicas (GHOSH; CHOWDHURY; BHATTACHARYA, 2016). Uma simbologia muito usada para a classificação de interações biológicas são os caracteres +, - e 0, usados para representar benefícios, perdas e neutralidade nas interações, respectivamente (RICKLEFS, 2006). Nas interações harmônicas no mínimo uma das partes envolvidas deve ser beneficiada pela relação e nenhum dos envolvidos deve ser prejudicado de forma alguma. Exemplos de interações harmônicas aqui relevantes são mutualismos (+/+) e comensalismos (+/0) (RICKLEFS, 2006; ZAPALSKI, 2011). Interações desarmônicas caracterizam situações onde uma das partes é prejudicada (seja por morte, depleção de recursos, perda de território ou parasitismo) e as outras partes podem também ser prejudicadas, beneficiadas ou se manterem neutras na interação. Exemplos dessa forma de interação são competição (-,-), amensalismo (-,0), predação (+,-) e parasitismo (+,-) (RICKLEFS, 2006).

Entender quais tipos de interação estão ocorrendo em uma comunidade microbiana diversa, no entanto, é um desafio. Comumente mais de uma das relações supracitadas estará invariavelmente ocorrendo em uma mistura de microrganismos e conseguir traçar cada ponto dessas interações é uma tarefa árdua e com diversas limitações.

Em vias biotecnológicas, alguns setores já empregam historicamente o uso de culturas mistas de microrganismos em seus bioprocessos, como é o caso por exemplo das indústrias de laticínios (GRATTEPANCHE et al., 2008; SMID; LACROIX, 2013) e de tratamento de esgotos (SHCHEGOLKOVA et al., 2016). Mesmo setores industriais que empregam fungos filamentosos em seus processos como a indústria de queijos (HYMERY et al., 2014) e de saquê (BOKULICH et al., 2014) fornecem pouca informação sobre interações fungo filamentosos-fungo filamentosos, pois nestas indústrias os fungos geralmente interagem com bactérias ou leveduras e mesmo quando interagem entre si, pouca ou nenhuma informação é coletada. Logo, o cenário resultante é que enquanto os estudos das interações entre microrganismos procarióticos ou fungos leveduriformes já se encontram mais avançados, os estudos sobre as relações entre fungos filamentosos, principalmente em aplicações industriais, são escassos.

Fungos estão envolvidos em uma grande variedade de relações ecológicas com outros microrganismos, animais e plantas, algo esperado para um reino com sua diversidade estimada em 5.1 milhões de espécies (BLACKWELL, 2011). Uma porção considerável dos

estudos sobre comunidades fúngicas e suas interações é referente sobre a forma e dinâmica como essas comunidades atuam no processo de decomposição da matéria orgânica (ABREGO; SALCEDO, 2011; BODDY, 2000; O'BRIEN et al., 2005).

Uma das interações mais comuns entre fungos filamentosos é a competição, que ocorre simultaneamente por território e nutrientes já que, devido ao modo de crescimento e alimentação dessa classe de microrganismos, dominar mais território é diretamente proporcional à disponibilidade de substrato (BODDY, 2000). Durante estas interações competitivas o uso de antibióticos, fungistáticos (SHEARER, 1995) e compostos orgânicos voláteis (COVs) inibitórios podem ser empregados (WERNER; POLLE; BRINKMANN, 2016) para inibir a germinação de esporos ou a propagação de hifas competidoras. Quando hifas se tocam pode ocorrer a chamada interferência hifal, onde um fungo libera toxinas não-enzimáticas que desencadeiam uma cascata de destruição citosólica do outro fungo (BODDY, 2000). Por fim quando grandes quantidades de micélio se encontram temos a interação definida por BODDY (2000) como “contato micelial bruto” onde interações como a interferência hifal e parasitismo podem ocorrer. Outra interação resultante principalmente tratando-se de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota é a formação de uma “barreira”, densa em massa micelial, na área de interação com outros fungos (BODDY, 2000; EYRE, 2007).

Apesar das interações negativas como a competição e o parasitismo serem mais estudadas por diversos motivos, também existem relações mais harmoniosas dentro do reino *Fungi*. A título de exemplo, recentemente descobriu-se que os líquens, organismos modelos no estudo de mutualismo, não são uma associação entre um organismo fotossintetizante e um fungo, mas sim dois fungos: um ascomiceto filamentoso e um basidiomiceto leveduriforme (SPRIBILLE et al., 2016). Essa recente descoberta certamente levará a novos estudos que ajudem a esclarecer a interação fungo-fungo nesses organismos.

Outras interações menos óbvias e mais difíceis de serem estudadas e identificadas também podem ocorrer entre fungos. AZIZA e AMRANE (2006) encontraram uma relação de comensalismo entre *Geotrichum candidum* e *Penicillium camembertii* crescidos em glutamato e lactato, onde em co-cultura *P. camembertii* teve seu crescimento estimulado devido a ação de enzimas provenientes de *G. candidum* que facilitaram a assimilação de peptídeos e aminoácidos como fonte de carbono para o primeiro fungo sendo o crescimento de *G. candidum* inalterado pela co-cultura. Em ambientes naturais é provável que tais interações, onde a ação de enzimas ou a liberação de metabolitos de um determinado organismo no meio, viabilizem a sobrevivência de outros organismos próximos seja

relativamente comum. Esse fenômeno é denominado *sintrofia* e é aplicável quando ocorre qualquer tipo de complementariedade metabólica ou alimentação cruzada (*cross-feeding*) entre microrganismos, sendo muito estudado em comunidades anaeróbicas (MCINERNEY; SIEBER; GUNSALUS, 2010).

TIUNOV e SCHEU (2005) demonstraram que o aumento da diversidade fúngica em amostras de celulose aumentou a taxa de respiração (um indicativo de maior decomposição do material). Os autores inferiram que o aumento na taxa metabólica total foi uma consequência direta da interação e facilitação de conquista do substrato pelos fungos envolvidos.

Tratando-se mais especificamente da análise do impacto das co-culturas nas atividades enzimáticas dos fungos, sabe-se que certos indivíduos respondem à presença de outros induzindo uma maior atividade enzimática de lacases e peroxidases como forma de melhor dominar o substrato e de proteção (SCORE; PALFREYMAN; WHITE, 1997). Co-cultivos de *T. reesei* e *P. chrysosporium* crescidos em resíduos de abóbora tiveram atividades celulolíticas (endoglicanase, celobiohidrolase e β -glicosidase) e ligninolíticas (lignina peroxidase e manganês peroxidase) aumentadas (YANG et al., 2013). SHUKLA et al. (2016) reportou uma maior degradação de palha de arroz em baixas temperaturas empregando misturas de *A. awamori*, *A. nidulans*, *T. viride* e *P. chrysosporium*. Concluiu-se que a maior degradação foi resultado das maiores atividades de celulases e xilanases apresentadas pelo consorcio microbiano em relação a seus monocultivos.

Ao visualizar estes e outros trabalhos (que serão mencionados posteriormente na discussão) percebe-se que em certas condições o uso de co-cultivos fúngicos pode ser usado para aumentar determinadas atividades enzimáticas e atingir uma degradação mais completa dos substratos estudados. Tal área de estudo, no entanto, não é algo trivial e muitas das informações são obtidas através de diversos cultivos em diferentes condições em um sistema de “tentativa e erro” consideravelmente laborioso, condição gerada pela falta de informações das vias específicas de interação entre fungos filamentosos.

Fungos saprofiticos utilizados

O fungo *T. reesei* (Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales) é a forma anamorfa de *Hypocrea jecorina*. *T. reesei* é um dos ascomicetos mais estudados (talvez o mais estudado) por possuir interessantes propriedades celulolíticas de grande valor industrial. Desde seu isolamento, a cerca de 70 anos atrás, nas Ilhas Salomão, onde o mesmo era uma praga que

apodrecia tendas e uniformes militares dos E.U.A, diversos mutantes foram até o momento desenvolvidos visando aumentar a produção de enzimas de interesse industrial (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016). O genoma do isolado original (QM6a) foi sequenciado, possuindo 34 Mbps em 7 cromossomos (MARTINEZ et al., 2008). O genoma do mutante RUT-C30 (JOURDIER et al., 2017) e de outros mutantes também já foram sequenciados (LICHIOUS et al., 2015; VITIKAINEN et al., 2010). As cepas RUT-C30 e QM 9414 são duas linhagens distintas obtidas a partir de diversas etapas de mutação e seleção da cepa original, sendo RUT-C30 a linhagem mais estudada entre elas.

P. chrysosporium (ATCC 24725, Filo Basidiomycota, Ordem Corticiales) é o fungo modelo para o estudo da podridão-branca e foi o primeiro basidiomiceto a ter seu genoma sequenciado (MARTINEZ et al., 2004). Seu genoma de aproximadamente 30 Mbp possui um arsenal de enzimas que degradam lignina, celulose e hemicelulose. Os estudos de isolamento e caracterização de peroxidases atuantes sobre a lignina foram efetuados primeiramente com enzimas de *P. chrysosporium* (KIRK, 1987; TIEN; KIRK, 1988).

A. niger (Filo Ascomycota, Ordem Eurotiales) é um fungo extremamente comum e um dos mais abundantes *Aspergillus*. É empregado globalmente em diversos processos industriais como a produção de ácido cítrico (PAPAGIANNI, 2007) e de enzimas ativas em lignocelulose (MACIEL et al., 2008; MRUDULA; MURUGAMMAL, 2011; ROCHA, 2010). O genoma de uma de suas cepas basais, da qual diversos mutantes foram originados, já foi sequenciado (PEL et al., 2007).

A. tamarii (Filo Ascomycota, Ordem Eurotiales) ao contrário dos outros fungos já citados é uma espécie bem menos estudada. Seu genoma ainda não está disponível e os estudos sobre o mesmo estão relacionados apenas a suas atividades enzimáticas como a produção de xilanases (DE SOUZA; DE SOUZA; PERALTA, 2001; FERREIRA; BOER; PERALTA, 1999) e tanases (COSTA et al., 2008).

JUSTIFICATIVA

Para o presente trabalho estão listadas abaixo justificativas para realização do mesmo:

- O estudo e melhoramento da hidrólise de biomassa vegetal lignocelulósica é um componente vital para viabilizar uma economia verde baseada em biorrefinarias, onde químicos de base e biocombustíveis possam ser obtidos de forma mais sustentável. O preço e dificuldade de obtenção de coquetéis enzimáticos efetivos são gargalos recorrentes neste processo. Estudos sobre formas não convencionais de se obter novos

coquetéis enzimáticos que possam vir a ser mais baratos e eficientes, devem ser uma preocupação básica rumo ao real desenvolvimento desta nova era econômica.

- A utilização de resíduos agroindustriais, especificamente os resíduos oriundos da cana-de-açúcar por sua marcante abundância no Brasil, para produção de enzimas por fungos filamentosos é uma destinação vantajosa econômica e ecologicamente a um resíduo de baixo valor agregado.
- A literatura sobre as interações fungo filamentosos-fungo filamentosos é escassa no que tange aos resultados de suas interações nas atividades enzimáticas de interesse industrial, sendo a maioria dos trabalhos focados apenas em aspectos ecológicos. Sendo assim, o estudo de co-cultivos fúngicos é uma área pouco estudada e conseqüentemente pouco compreendida em diversas instâncias e novos trabalhos que agreguem conhecimento ao tema devem ser estimulados.
- O conhecimento da interação de cepas de *T. reesei* em co-cultivo com outros fungos do gênero *Aspergillus* que não sejam *A. niger*, em relação às suas propriedades enzimáticas é escasso na literatura, justificando a investigação com *A. tamarii*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é verificar a compatibilidade em placa de Petri e em cultivo submerso da interação entre *T. reesei* RUT-C30 com os fungos *A. niger*, *A. tamarii* e *P. chrysosporium* e do fungo *T. reesei* QM 9414 em conjunto com *A. niger*, por vias da análise de suas atividades enzimáticas quando crescidos em bagaço de cana-de-açúcar.

Objetivos Específicos

- Analisar o crescimento e interação fúngica entre as espécies citadas quando cultivadas (em pares) em placa de Petri usando-se meio malte 2%.
- Realizar cultivos em estado líquido usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono na forma de mono e co-cultivos e analisar as atividades enzimáticas de CMCase, FPAse, β -glicosidase, xilanase, pectinase e mananase em ambos os casos.
- Verificar se ocorre mudança no perfil enzimático/proteico dos co-cultivos em relação aos monocultivos através do uso de géis de eletroforese.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados

Os isolados de *T. reesei* RUT-C30 e *T. reesei* QM 9414 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roberto do Nascimento Silva da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina (Ribeirão Preto, SP). O isolado de *P. chrysosporium* foi adquirido via Fundação André Tosello (Campinas, SP). Os demais isolados, sendo eles: *A. niger* e *A. tamarii* pertencem à coleção micológica do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.

Fonte de Carbono e Meio de Cultura

Neste trabalho foi utilizado como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar moído. Nenhum tipo de pré-tratamento foi aplicado ao bagaço, sendo este utilizado para produção de enzimas em meio líquido em sua forma convencional. O meio líquido suplementar para produção de enzimas utilizado consiste de (em g/L): KH_2PO_4 – 7,0; K_2HPO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; Extrato de Levedura – 0,6), acrescido da fonte de carbono (bagaço de cana-de-açúcar moído) na concentração final de 1% (m/v).

Em Erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 100 mL do meio suplementar descrito acima. Os frascos foram então autoclavados a 121 °C por 20 minutos com a intenção de esterilizar completamente o meio interno.

Ensaio de Compatibilidade em Placa

Para analisar a interação básica entre os fungos estudados foram realizados ensaios de compatibilidade em placas de Petri. Foram usadas placas de Petri descartáveis, de 9 cm de diâmetro para estes ensaios. Foi utilizado o meio malte 2% (extrato de malte 2% m/v, ágar 15% m/v), sendo que 15 mL do mesmo foram adicionados a cada placa para garantir um volume uniforme. Os fungos a serem testados foram cultivados por sete dias em placas com meio malte 2%, o inóculo para estas placas veio diretamente das matrizes armazenadas em freezer -80 °C para garantir a integridade genética dos microrganismos. Discos de 1 cm de diâmetro contendo os fungos destas culturas foram coletados e passados para as placas preparadas como descrito acima, mantendo uma distância de 4 cm entre os discos. Foram feitos controles utilizando-se 2 discos do mesmo fungo (para testar se os fungos não estão rejeitando qualquer micélio vizinho, incluindo o seu próprio) e os ensaios propriamente ditos consistiam de fungos diferentes inoculados a 4 cm de distância um do outro. Devido a diferenças no crescimento detectadas nas primeiras tentativas deste protocolo, estipulou-se

que ambas as cepas de *T. reesei* seriam plaqueadas 2 dias antes de seus parceiros, pois das cepas utilizadas os *T. reesei* apresentaram um crescimento mais lento e eram rapidamente subjugados pelos outros fungos caso esta medida não fosse adotada. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e as fotos selecionadas para apresentação foram aquelas que melhor representaram a interação. Tal metodologia e as possíveis formas de análise de interação que serão usadas como resultado foram previamente descritas por MOLLA et al. (2001).

Crescimento em Placa, Contagem De Esporos e Inoculação

Todos os fungos supracitados foram crescidos em placas de Petri contendo meio malte (malte 2% m/v, agar 15% m/v) até sua esporulação, que variou de 7 a 12 dias de acordo com o fungo em questão. Os esporos foram raspados da placa com auxílio de uma lâmina de microscopia de vidro. Os mesmos foram então mergulhados em 50 mL de solução salina (NaCl 0.9%) à qual foi adicionado 1 mL de Tween 80 a 1% para evitar aglomeração de esporos. Uma alíquota desta solução foi então transferida para câmara de Neubauer para que fosse realizada a contagem de esporos no microscópio óptico. Todos os instrumentos citados nesta seção (incluindo as ponteiras usadas nas transferências de volumes), com exceção da câmara de Neubauer (que não entra em contato com as amostras) foram previamente autoclavados a 121 °C, por 20 minutos.

Após a contagem de esporos uma determinada quantidade da solução foi inoculada em 100 mL do meio suplementar previamente esterilizado. O volume transferido foi sempre calculado de forma que a concentração de esporos no meio suplementar seja de 10^5 esporos/mL. No caso dos monocultivos os esporos pertencem a uma única estirpe, enquanto nos co-cultivos foram realizados os cálculos para que metade dessa concentração fosse preenchida por cada fungo participante do mesmo (no caso 5×10^4 para cada fungo), mantendo invariavelmente a concentração final de esporos no meio nas duas condições testadas.

Curva de Indução Enzimática

Os frascos já inoculados com os esporos foram então incubados em shaker com agitação a 120 rpm, 28 °C, por sete dias. Os cultivos foram realizados em triplicata (3 frascos distintos). A cada 24h foi coletado 1 mL de amostra de cada frasco para construção da curva de indução enzimática, essas alíquotas foram congeladas a -20 °C até a posterior análise. Após o período de incubação de sete dias, os cultivos foram filtrados usando-se tecido de seda (para evitar a perda de celulas por adesão que filtros de algodão ou papel poderiam ocasionar) e o

sobrenadante que contém as atividades enzimáticas foi coletado. Essa fração, agora denominada Extrato Bruto (EB), foi congelada a -20 °C até seu uso para análise posterior.

Ensaio Enzimáticos

Os extratos brutos coletados foram analisados quanto à suas atividades enzimáticas. As atividades estudadas foram celulasas (carboximetilcelulase – CMCase, FPAse e β -glicosidase), hemicelulasas (xilanases e mananases) e pectinases. Os substratos utilizados para os ensaios de xilanase, mananase, pectinase e CMCase foram, respectivamente, xilana de aveia 1% em tampão acetato de sódio pH 5, manana 1% (galactomanana de alfarroba), pectina de frutas cítricas 1% e carboximetilcelulose 4% (CMC 4%). A mistura reacional foi composta por 10 μ L de substrato e 5 μ L de extrato bruto. Foram feitos brancos para descontar os valores do extrato bruto e do substrato. Todos os ensaios foram feitos em quadruplicatas e montados em placas de PCR de 96 poços.

As placas foram incubadas a 50 °C por 30 minutos em termocicladores (T100™, *Bio-Rad Laboratories Inc.*). Após essa incubação foram adicionados 30 μ L de ácido dinitrosalicílico (DNS), e as placas foram re-incubadas a 97 °C por 10 minutos, para a detecção dos açúcares redutores liberados pela ação enzimática, segundo metodologia descrita por MILLER (1959). Após a segunda incubação, foram adicionados 150 μ L de H₂O_d às amostras, que foram homogeneizadas e transferidas para placas de leitura. As placas foram lidas em espectrofotômetro *SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices; San José, CA, EUA)* no comprimento de onda de 540 nm.

As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades Internacionais por mililitro de amostra (U.I/mL), sendo que um U.I corresponde a quantidade de enzima responsável pela liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por minuto.

Para realização dos ensaios de β -glicosidase foi utilizado o substrato sintético 4-Nitrophenyl β -D-glicopiranosídio (pNPG) como descrito por WOOD & BHAT (1988). Os volumes utilizados foram: 5 μ L de extrato bruto, 25 μ L de pNPG a 5 mM em tampão acetato de sódio pH 4,8 e 45 μ L de tampão acetato de sódio pH 4,8 a 100 mM, incubados por 30 min a 50 °C. Após esta incubação foram adicionados 100 μ L de carbonato de cálcio 1M às amostras, que foram homogeneizadas e tiveram 150 μ L de seu volume transferidos para placas de leitura. As leituras foram realizadas a 430 nm em espectrofotômetro e também representadas em U.I/mL.

Para os ensaios de FPase (celulases totais) foram cortadas tiras de papel *Whatman* nº1 nas dimensões de 0,5x3cm. As tiras de papel foram utilizadas como substrato, acopladas em tubos de ensaio juntamente com 75 µL de extrato bruto e incubadas em banho-maria a 50 °C por 1 hora. Após esse período foram adicionados 150 µL de DNS e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 97 °C para detecção de açúcares redutores liberados. Brancos de substrato (incubados com 75 µL de água destilada) e brancos de EB (75 µL de EB sem adição de substrato) foram utilizados como controles.

A concentração de proteínas foi determinada como descrito no kit (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA), seguindo-se a metodologia descrita por BRADFORD (1976). As amostras analisadas pelo ensaio de Bradford foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro. As atividades específicas, que consistem na atividade enzimática dividida pela concentração de proteínas da amostra, foram calculadas e expressas em U.I./mg de proteína total.

Gel de Eletroforese

O perfil enzimático dos extratos brutos dos mono e co-cultivos foram avaliados via eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com metodologia utilizada por (LAEMMLI, 1970). A quantidade de 15 µg de proteína para cada amostra foi precipitada usando-se Ácido Tricloroacético (TCA) 100%. Foram utilizados como marcadores de massa molecular: β-galactosidase (116 kDa), soroalbumina bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp981 (25 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa), presentes no Kit *Pierce™ Unstained Protein MW Marker* (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Após a corrida do gel, as proteínas foram reveladas usando coloração com nitrato de prata de acordo com o protocolo de BLUM, BEIER & GROSS (1987).

Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada com a carga de 1,5 mg de proteína por grama de substrato. O substrato utilizado foi o bagaço de cana-de-açúcar natural (sem realização de pré-tratamentos prévios) na concentração de 0.75% (m/v). A partir dos resultados obtidos na quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), foram calculados os volumes necessários de cada extrato bruto para realizar a hidrólise. O volume final foi completado utilizando-se tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5. As amostras foram incubadas em agitador “*Vortemp 56*” (*Labnet International, Inc.* Woodbridge, NJ) a 50 °C,

900 rpm por 4 dias, com alíquotas sendo coletadas para ensaios de quantificação de açúcares redutores totais nos tempos de 4h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h de incubação. Os rendimentos da hidrólise total da holocelulose foram calculados baseando-se na composição do bagaço determinado por Caio de Oliveira Gorgulho Silva, aluno de doutorado do laboratório de enzimologia (dados não publicados).

Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura dos cultivos submersos dos monocultivos de *A. niger*, *T. reesei* RUT-C30 e *T. reesei* QM 9414 e dos co-cultivos *A. niger* + *T. reesei* RUT-C30 e *A. niger* + *T. reesei* QM 9414.

As amostras foram cultivadas exatamente como descritas acima (meio mínimo com 1% de bagaço de cana-de-açúcar, incubação por sete dias a 120 rpm e 28 °C). Uma pequena quantidade (suficiente para preencher um tubo de 1.5 mL até 1/3 de seu volume) de bagaço de cana-de-açúcar de cada cultivo foi coletada após sete dias de cultivo e mantida em solução fixadora (m/v: 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato 0.1 M) até sua análise. A solução fixadora foi então removida através de duas lavagens com tampão cacodilato 0.1 M e cada amostra foi tratada com 100 µL de OsO₄. O OsO₄ foi lavado duas vezes com água destilada e então iniciou-se o processo de desidratação. A desidratação ocorreu imergindo as amostras em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 2 vezes em concentração 100%) por 10 minutos em cada. As amostras desidratadas foram tratadas no equipamento de ponto crítico CPD 030 *Critical Point Dryer* para serem secas. Após a secagem as amostras foram alocadas em pequenas bases metálicas com o auxílio de fita dupla face metalizada. Utilizou-se o metalizador LEICA EM SCD-500 para cobrir as amostras com uma camada de platina e após este processo as mesmas foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol-JSM 7000F.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram estudadas as interações do fungo *T. reesei* RUT-C30, com *A. niger*, *P. chrysosporium* e *A. tamarii*. Também foram avaliadas as interações entre *T. reesei* QM 9414 e *A. niger*. Para todas as combinações fúngicas foram realizados ensaios de interação em placas de Petri. As mudanças dos perfis enzimáticos dos mono e co-cultivos foram avaliadas em SmF durante sete dias. As atividades enzimáticas de xilanases, CMCases (endoglicanases), pectinases, mananases, β -glicosidases e FPase foram testadas. Foi realizado o gel SDS-PAGE do extrato bruto do sétimo dia dos mono e co-cultivos para comparar o perfil enzimático geral. Os extratos brutos dos co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 com *A. niger* foram comparados com seus monocultivos quanto à sua capacidade de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 com *A. niger* foram realizadas para verificar as formas de colonização e interação entre as espécies. Os resultados obtidos e a discussão dos mesmos se encontram nos tópicos abaixo.

Ensaio de Compatibilidade em Placa

Como pode ser observado na Figura 12, nenhum dos fungos (incluindo *P. chrysosporium* cuja imagem não está disponível) inibiu seu próprio micélio nos experimentos controle, o que exclui a possibilidade de inibição inespecífica nas interações fúngicas futuras.

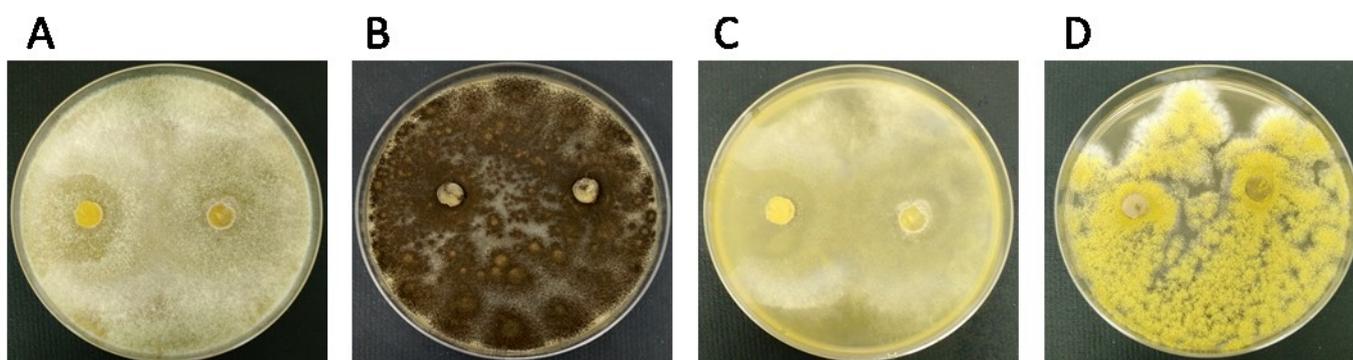


Figura 12 – Exemplos de controles de compatibilidade em placa. Fungos oriundos da mesma placa inoculados a 4 cm de distância um do outro em placas de 9 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio malte 2%. Cultivos foram crescidos por sete dias e avaliados. A) *T. reesei* RUT-C30, B) *A. niger*, C) *T. reesei* QM 9414, D) *A. tamarii*.

Para todas as interações em placa, *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 foram inoculados dois dias antes do parceiro de interação. Quando esse crescimento prévio das cepas de *T.*

reesei não foi efetuado, os outros fungos inoculados rapidamente dominavam a placa, impedindo a visualização de qualquer interação. Todas as análises foram feitas após sete dias da inoculação do segundo fungo. O fungo *T. reesei* RUT-C30 não apresentou sinais de inibição com nenhum dos fungos com ele cultivados. *P. chrysosporium* produziu a característica “barreira” micelial na face que interage com RUT-C30 (Figura 13, A). Apesar deste comportamento, que é um padrão de fungos basidiomicetos decompositores de madeira (BODDY, 2000), *P. chrysosporium* não demonstrou inibição direta com *T. reesei* RUT-C30.

A interação de RUT-C30 com os fungos *A. tamarii* (Figura 13, B) e *A. niger* (Figura 13, C e D) também não apresentou inibição e pode ser considerada, como descrito por STAHL e CHRISTENSEN (1992), um *entrelaçamento neutro*, devido ao fato dos fungos crescerem levemente para dentro do micélio de seu parceiro sem nenhum prejuízo aparente.

Na interação entre *T. reesei* QM 9414 e *A. niger* (Figura 13, E-H), diferentes graus de exclusão à distância ocorreram. Este resultado foi inesperado, pois *T. reesei* QM 9414 é um mutante da mesma cepa que originou *T. reesei* RUT-C30 e esperava-se um comportamento mais similar na interação com *A. niger*, fato que não ocorreu. Inclusive, placas controle de *T. reesei* QM 9414 contaminadas com esporos de *A. niger* apresentaram os mesmos halos inibitórios (Figura 13, G e H), mostrando que a inibição não é uma falha metodológica do ensaio de compatibilidade em placa.

É importante ressaltar que as interações fúngicas são dinâmicas e podem ocorrer mudanças no padrão de interação com períodos de exposição mais longos. Estudos populacionais mostram que trocas na abundância de certos microrganismos colonizadores de um dado substrato são comuns e a abundância e riqueza dos microrganismos colonizadores é algo variável com o tempo e com o substrato em questão (FRANKLAND, 1998). Logo, as interações vistas em sete dias não necessariamente serão muito mais duradouras do que o período avaliado, mas servem como base para a forma de interação que ocorrerá nos cultivos submersos que também duraram apenas sete dias.

Foram feitas tentativas de se cultivar os fungos em placas com meio contendo bagaço de cana-de-açúcar substituindo o malte como fonte de carbono, mas nenhum dos fungos apresentou crescimento significativo neste meio. O pouco crescimento visível era formado por hifas muito transparentes e quase nenhuma esporulação, impossibilitando análises de crescimento e interação. Novas formulações de meios sólidos onde os fungos possam crescer em ágar com bagaço de cana-de-açúcar são estudos futuros importantes para mimetizar de forma mais adequada o meio encontrado no cultivo submerso.

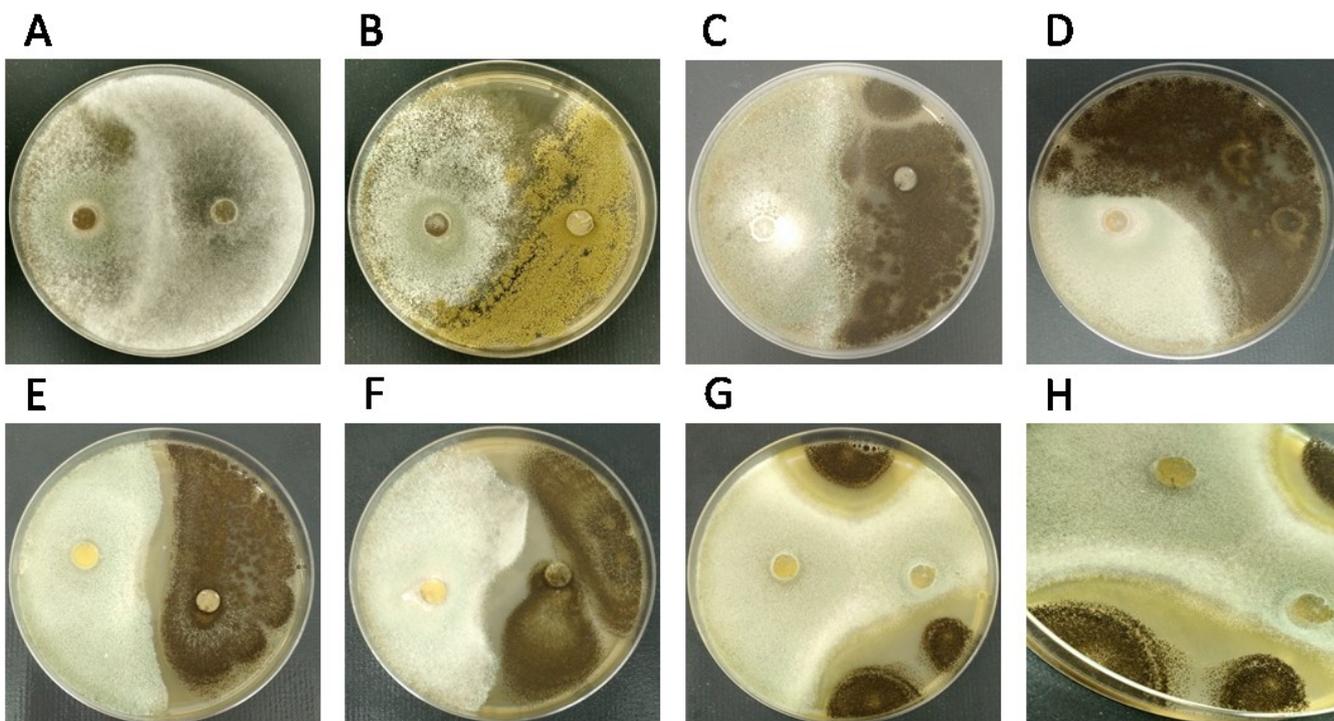


Figura 13 – Ensaio de compatibilidade em placa para co-cultivos. Fungos oriundos de culturas com a mesma idade tiveram discos de 1 cm de diâmetro inoculados a 4 cm de distância um do outro em placas de 9 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio malte 2%. Cultivos foram crescidos por sete dias e analisados. A ordem dos fungos é sempre referente primeiramente ao da esquerda e depois da direita. A) *T. reesei* RUT-C30 + *P. chrysosporium*, B) *T. reesei* RUT-C30 + *A. tamarii*, C e D) *T. reesei* RUT-C30 + *A. niger* (diferentes exemplares da triplicata), E e F) *T. reesei* QM 9414 + *A. niger* (diferentes exemplares da triplicata), G) Placa controle de *T. reesei* QM 9414 que foi contaminada com *A. niger* para demonstrar a exclusão recorrente, H) amplificação da parte inferior da placa mostrada em G.

Análise das Atividades Enzimáticas

Antes de iniciar a análise das atividades enzimáticas em regimes de mono e/ou co-cultivo, é importante ressaltar alguns termos que serão empregados para classificar estes resultados. Quando (considerados os desvios-padrão) determinados cultivos atinjam atividades enzimáticas semelhantes será dito que *não houve efeito* do tratamento em relação à monocultura (e.g., $X=2$, $Y=2$, $X+Y= 2$). Será considerado *efeito negativo* aquele que os co-cultivos obtenham uma menor atividade enzimática em relação ao monocultivo de comparação, que geralmente é o possuidor de maior atividade (e.g., $X=2$, $Y=3$, $X+Y= 2$ ou 1). Caso o efeito negativo resulte em uma atividade intermediária às duas monoculturas será caracterizado um *efeito negativo intermediário*. Serão classificadas como *efeito complementar* as situações onde o co-cultivo forneça para a cepa de menor atividade um valor equivalente ao da cepa de maior atividade (e.g, $X=2$, $Y=5$, $X+Y= 5$). Será dito *efeito aditivo* aquele que os co-cultivos obtenham uma maior atividade enzimática em relação aos monocultivos de comparação, que geralmente é o possuidor de maior atividade, até o limite máximo da soma das duas atividades (e.g, $X=2$, $Y=4$, $X+Y= 5$ ou 6). Sinergismo pode ser

definido como o fenômeno onde a interação entre dois fatores produz um resultado maior do que a soma dos resultados dos mesmos fatores isolados (BLOT; DAY, 1979; SLINKER, 1998). No campo dos co-cultivos fúngicos, o sinergismo ocorreria caso a atividade do co-cultivo fosse maior que a soma de seus respectivos monocultivos (e.g., $X=2$, $Y=2$, $X+Y= 5$).

Um relevante problema com o termo sinergismo dentro de diversos trabalhos no ramo da enzimologia e, principalmente no que concerne a co-cultivos, é que os autores podem vir a usar o termo incorretamente, empregando-o para descrever o que neste trabalho é considerado apenas como *efeito aditivo*.

Analisando as atividades enzimáticas (Figura 14), pode-se averiguar que todos os fungos apresentam atividade holocelulolítica, com as atividades mais proeminentes variando significativamente entre as espécies estudadas. Para todos os fungos estudados, a atividade de xilanase atingiu os valores mais altos em comparação com as outras atividades avaliadas. *A. tamarii* (Figura 14, E) praticamente não apresentou fase *lag* de atividade xilanolítica, apresentando pouca variação na atividade ao longo dos sete dias de cultivo. Como esperado, as cepas de *T. reesei* RUT-C30 (Figura 14, A) e *T. reesei* QM 9414 (Figura 14, C) foram os representantes que apresentaram maiores valores de atividade CMCase (endoglicanases), enquanto *A. niger* (Figura 14, B) apresentou a menor atividade de CMCase. Em todos os cultivos, as atividades de pectinase e mananase apresentaram os menores valores dentre todas as atividades estudadas (Figura 14, A-E). *P. chrysosporium* apresentou a maior atividade de pectinase dentre os cultivos analisados (Figura, 14, D). Este resultado era esperado considerando que as pectinas e mananas compõe uma porção pequena da PCV do bagaço de cana-de-açúcar (DE SOUZA et al., 2013).

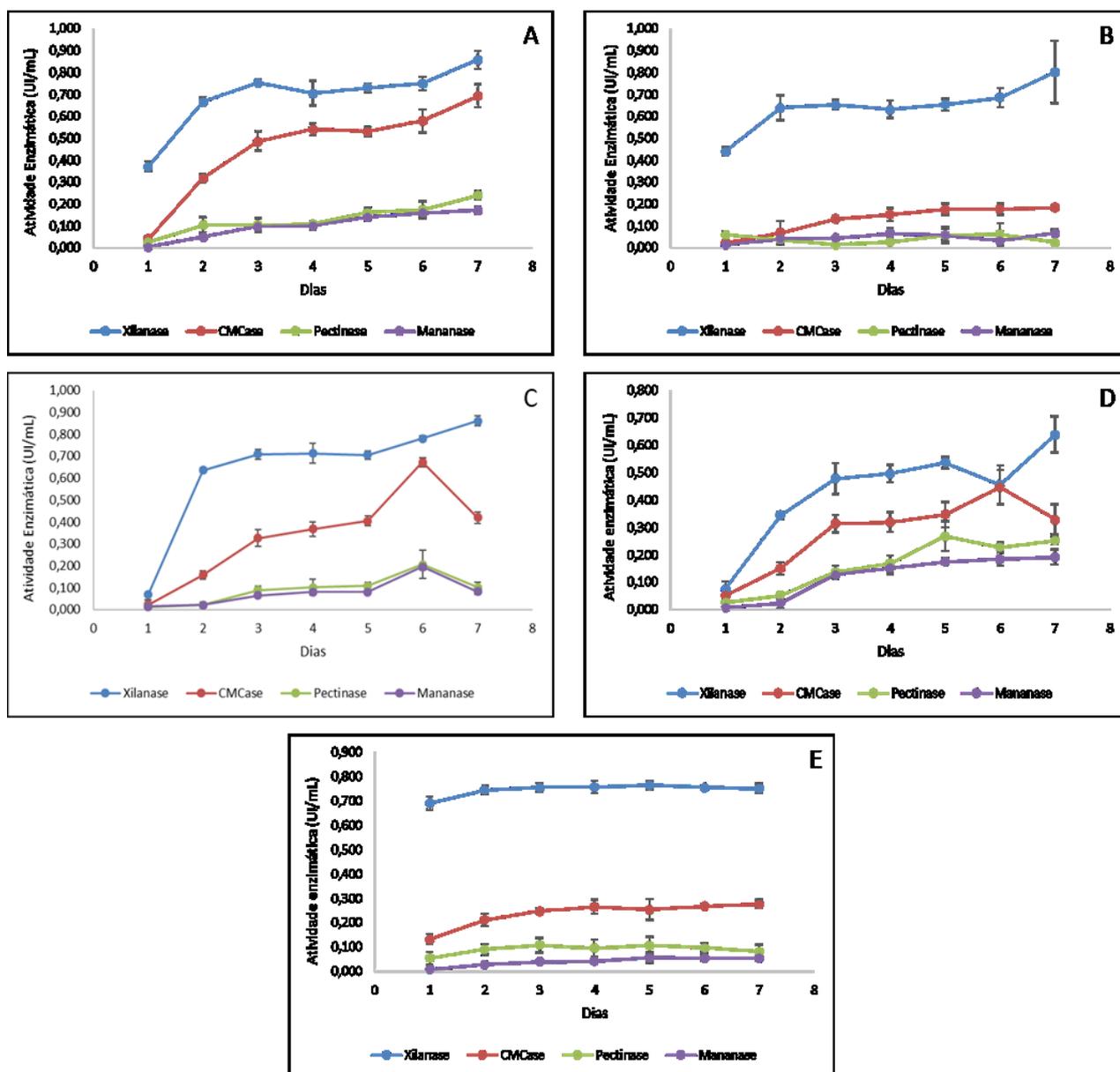


Figura 14 – Perfis das atividades enzimáticas ao longo de sete dias em cultivo submerso usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. As barras de erro representam o desvio-padrão entre as replicatas (n=4). A) *T. reesei* RUT-C30, B) *A. niger*, C) *T. reesei* QM 9414, D) *P. chrysosporium* e E) *A. tamarii*. Cada gráfico possui uma legenda na parte inferior para facilitar a interpretação-

Para análise do perfil das atividades enzimáticas referentes aos co-cultivos, os resultados foram separados em gráficos de acordo com a atividade enzimática, para facilitar a comparação das mesmas.

As atividades de xilanase, CMCase, pectinase, mananase e β -glicosidase do co-cultivo entre *T. reesei* RUT-C30 e *A. niger* se encontram na Figura 15. Considerando os desvios-padrões, observa-se que no sétimo dia a atividade de xilanase dos mono e co-cultivos atingiram valores próximos com variações inferiores a 0,1 UI/mL (Figura 15, A).

A pouca variação das atividades de xilanase em co-cultivos foi observada no trabalho de GUTIERREZ-CORREA e TENDERDY (1998), onde os autores averiguaram que co-cultivos de *T. reesei* LM-UC4E1 e *A. niger* ATCC 10864 em bagaço de cana-de-açúcar utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio resultavam em atividades de xilanase muito semelhantes aos co-cultivos. No mesmo trabalho verificou-se que diferentes fontes de nitrogênio podem influenciar o perfil xilanolítico dos co-cultivos.

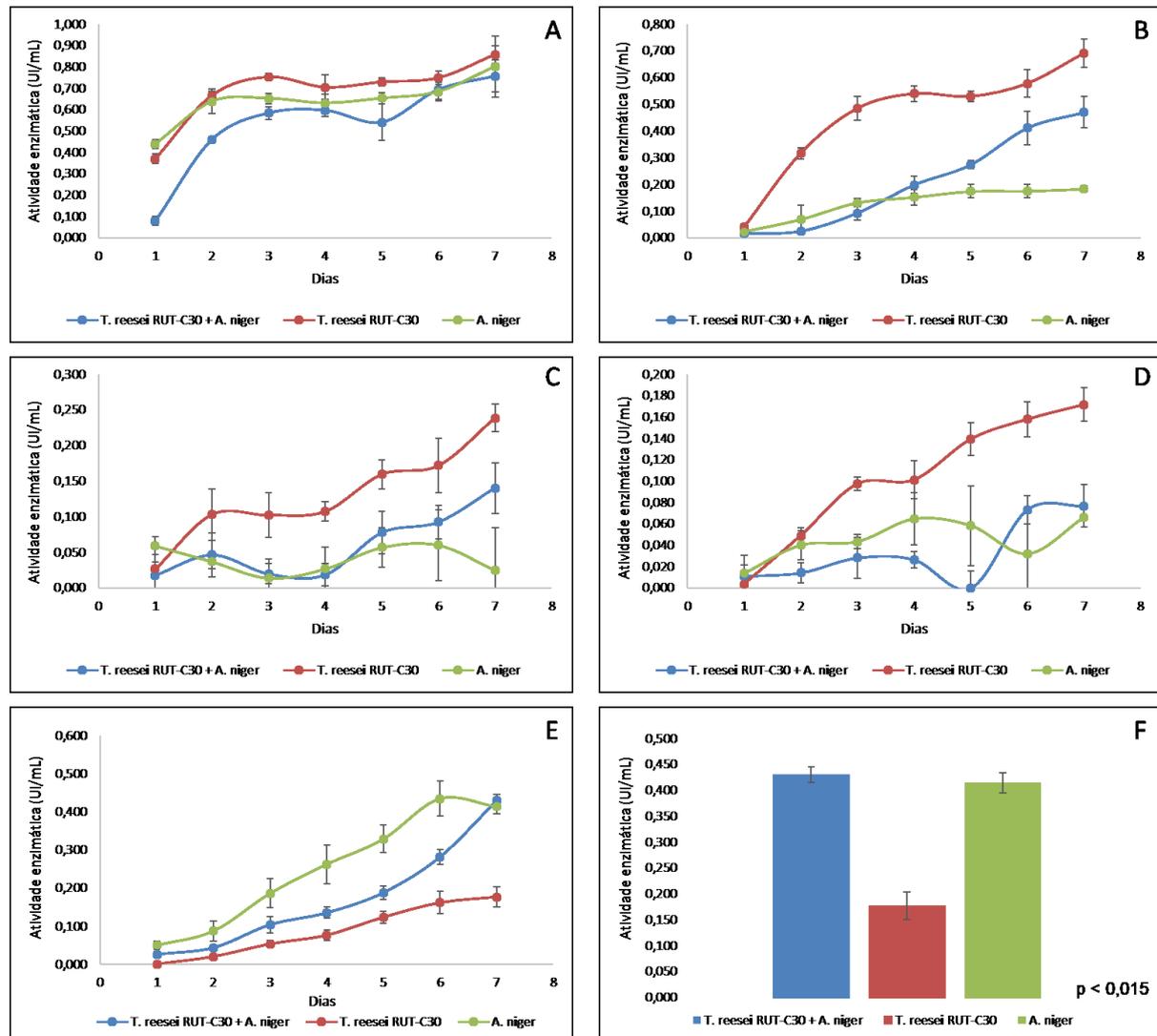


Figura 15 – Perfis das atividades enzimáticas dos co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 com *A. niger* em cultivo submerso, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono por sete dias. Atividades A) xilanase, B) CMCCase, C) pectinase, D) mananase, E) β -glicosidase, F) atividade de β -glicosidase no sétimo dia. O valor de p é resultante de análise de variância (ANOVA). As barras de erro representam o desvio-padrão entre as replicatas ($n=4$). Cada gráfico possui uma legenda na parte inferior para facilitar a interpretação.

A atividade de CMCCase do co-cultivo apresentou valor intermediário entre os monocultivos (*T. reesei* RUT-C30 0,69 UI/mL, *A. niger* 0,18 UI/mL e co-cultivo 0,47

UI/mL) no sétimo dia, como pode ser visto na Figura 15 (B). A atividade de pectinase do co-cultivo, ao final do sétimo dia, também atingiu um valor intermediário em relação aos monocultivos (*T. reesei* RUT-C30 0,23 UI/mL, *A. niger* 0,02 UI/mL e co-cultivo 0,14 UI/mL) como evidenciado na Figura 15 (C). A atividade de mananase do co-cultivo apresentou valores semelhantes àqueles obtidos pelo monocultivo de *A. niger* no sétimo dia (*A. niger* 0,06 UI/mL e co-cultivo 0,07 UI/mL; Figura 15, D). Logo, conclui-se que o co-cultivo de *T. reesei* RUT-C30 e *A. niger* não apresentou sinergismo ou efeito aditivo em relação às atividades supracitadas.

No co-cultivo, a atividade de β -glicosidase aumentou 142% em relação ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30. É importante ressaltar que os níveis de β -glicosidase apenas atingiram um valor próximo daquele apresentado por *A. niger* (Figura 15, E e F), o que não caracteriza efeito sinérgico nem aditivo, sendo este padrão mais semelhante a uma complementariedade. Interações de *T. reesei* com *A. niger* foram previamente estudadas, principalmente em condições de fermentação em estado sólido e com foco em celulases, e por diversas vezes as co-culturas apresentaram atividades enzimáticas superiores (DHILLON et al., 2011; GUTIERREZ-CORREA et al., 1999). FANG et al. (2013) cultivou *T. reesei* RUT-C30 e *A. niger* NL02 em cultivo submerso utilizando palha de milho pré-tratada com explosão a vapor e obteve atividades de FPAse e β -glicosidase maiores nos co-cultivos do que em seus respectivos monocultivos quando inoculando *A. niger* 48h depois de *T. reesei* e em proporção 1:5. Nesse caso, não foi detectado efeito sinérgico. Outras formulações de atraso no tempo de inóculo e de proporção de fungos adicionados não mostraram melhoras significativas. No entanto, JUHÁSZ et al. (2003) evidenciou que a melhor proporção de *A. niger* BKMF 1305 e *T. reesei* RUT-C30 cultivados em papel seria de 1:1, com ambos os fungos inoculados ao mesmo tempo.

Os resultados destes trabalhos evidenciam que cada formulação de co-cultivo deve ser analisada separadamente, sendo difícil fazer previsões acuradas sobre o resultado das interações. Fatores como disponibilidade e tipo da fonte de carbono, intervalo entre inóculos dos fungos, proporção de inóculo dos participantes, modo de fermentação e cepas utilizadas afetam significativamente o resultado final da co-cultura. Um único ponto em comum de muitos destes trabalhos é o tempo de cultivo que geralmente varia entre cinco e sete dias (RABELLO et al., 2014, FANG et al., 2013; JAGAVATI et al., 2012; JUHÁSZ et al., 2003; GUTIERREZ-CORREA; TENDERDY, 1997).

Após o aumento da atividade β -glicosidase em *T. reesei* RUT-C30 em co-cultivo com *A. niger*, foi testada a interação de *A. niger* com *T. reesei* QM 9414. A atividade xilanase do

co-cultivo de *T. reesei* QM 9414 e *A. niger*, no sétimo dia, atingiu atividade próxima dos monocultivos (*T. reesei* QM 9414 0,86 UI/mL, *A. niger* 0,80 UI/mL e co-cultivo 0,79 UI/mL, Figura 16, A).

A atividade de CMCase do co-cultivo novamente assumiu um valor intermediário entre os dois monocultivos (*T. reesei* QM 9414 0,42 UI/mL, *A. niger* 0,18 UI/mL e co-cultivo 0,32 UI/mL, Figura 16, B). A atividade pectinase do co-cultivo atingiu valores próximos aos apresentados por *T. reesei* QM 9414 em monocultura (*T. reesei* QM 9414 0,1, co-cultivo 0,1, valores em UI/mL; Figura 16, C) ao final do sétimo dia de cultivo. O co-cultivo entre *T. reesei* QM 9414 e *A. niger* não apresentou atividade mananase.

Para a atividade de β -glicosidase, o co-cultivo obteve aumento de 140% em relação à monocultura de *T. reesei* QM 9414. Este resultado é similar ao que ocorreu no co-cultivo anterior (*T. reesei* RUT-C30 + *A. niger*), fato esperado já que ambas as cepas em questão são mutantes celulolíticos industriais oriundos da mesma cepa original e provavelmente não diferem muito quanto ao aparato de produção de β -glicosidases.

Trabalhos que utilizam *T. reesei* QM 9414 em experimentos de co-cultivo são mais raros que aqueles utilizando a cepa RUT-C30 (presumivelmente pelo maior destaque industrial desta última) e estes trabalhos tendem a priorizar cultivos em estado sólido. Logo, o material de comparação para este cultivo é escasso (fator que aumenta ainda mais a importância de trabalhos como este para aumentar o corpo de conhecimento sobre a área). MADAMWAR e PATEL (1992) cultivaram *T. reesei* QM 9414 e *A. niger* em diversos substratos lignocelulósicos, entre eles o bagaço de cana-de-açúcar, em fermentação semi-sólida. O co-cultivo nesse trabalho demonstrou atividades de exoglicanase, endoglicanases e β -glicosidase maiores que as respectivas monoculturas (efeito aditivo), mas novamente sem atingir valores que poderiam ser considerados como sinergismo.

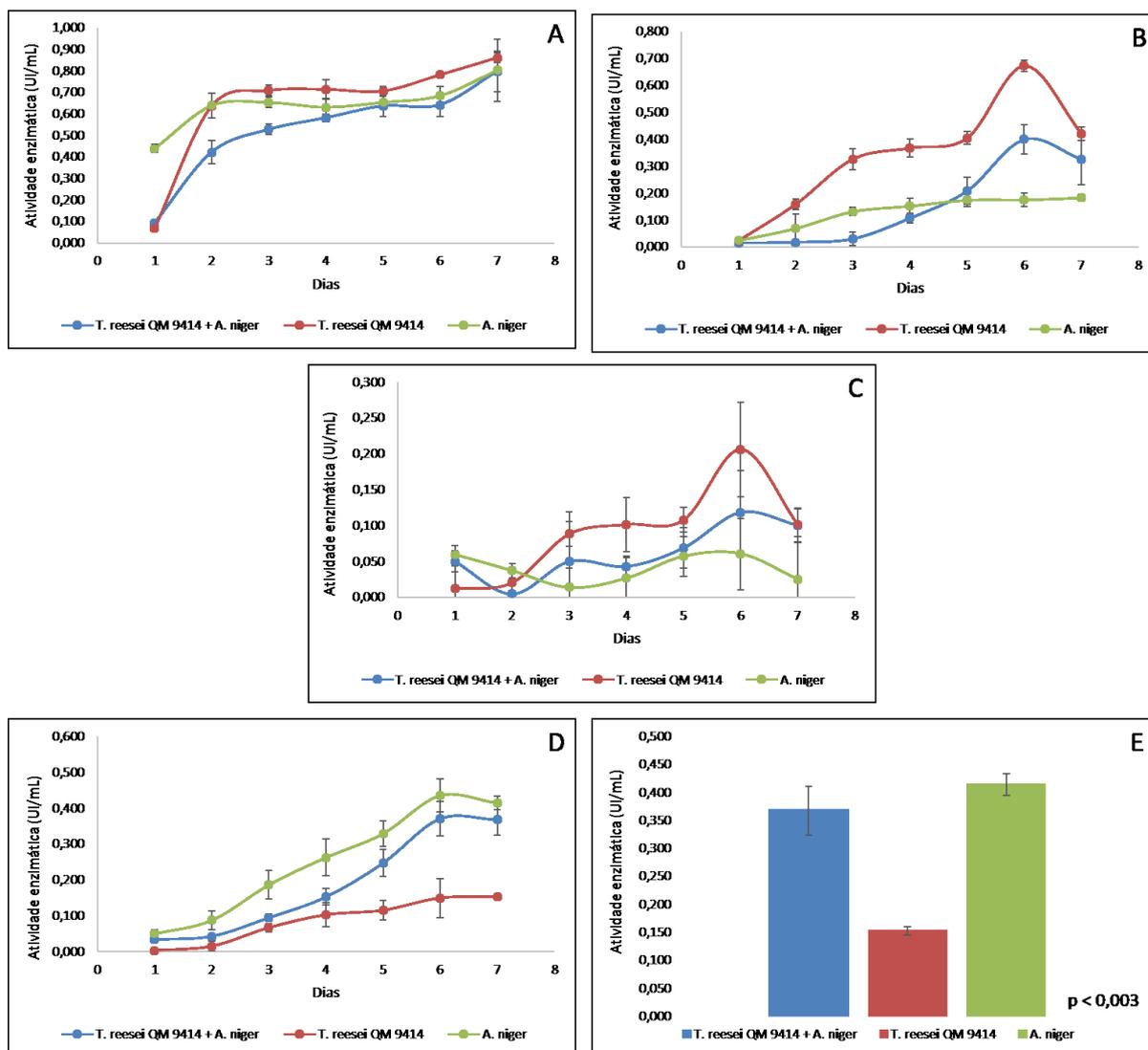


Figura 16 - Perfis das atividades enzimáticas dos co-cultivos de *T. reesei* QM 9414 com *A. niger* em cultivo submerso, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono por sete dias. Atividades A) xilanase, B) CMCCase, C) pectinase, D) β -glicosidase, E) atividade β -glicosidase no sétimo dia. O valor de p é resultante de análise de variância (ANOVA). As barras de erro representam o desvio-padrão entre as replicatas ($n=4$). Cada gráfico possui uma legenda na parte inferior para facilitar a interpretação.

No co-cultivo entre *T. reesei* RUT-C30 e *P. chrysosporium*, a atividade de xilanase sofreu efeito negativo e ficou abaixo daquela detectada para o monocultivo de *P. chrysosporium* (Figura 17, A). A atividade de CMCCase repetiu o padrão encontrado nos co-cultivos já discutidos acima, atingindo um valor intermediário entre os monocultivos participantes (*T. reesei* RUT-C30 0,74, *P. chrysosporium* 0,32, co-cultivo 0,56, valores em UI/mL; Figura 17, B). Para a atividade de pectinase, o co-cultivo obteve um aumento de 36% em relação à monocultura de *T. reesei* RUT-C30, mas levando-se em conta os desvios-padrão, é provável que este aumento seja menor (Figura 17, C). A atividade de mananase

apresentou valores semelhantes entre os mono e co-cultivos (*T. reesei* RUT-C30 0,20, *P. chrysosporium* 0,19, co-cultivo 0,17, valores em UI/mL; Figura 17, D).

A atividade de β -glicosidase apresentou um aumento de aproximadamente 20%, considerando-se os desvios-padrão, em relação à monocultura de *T. reesei* RUT-C30 (Figura 17, E). *P. chrysosporium* apresentou a menor atividade β -glicosidase entre todos os fungos deste trabalho (atividade máxima de 0,031 UI/mL no quarto dia de cultivo). A presença de *P. chrysosporium* no meio de cultivo pode ter induzido uma resposta competitiva sobre *T. reesei* RUT-C30, ou vice-versa, o que acarretou em um dos fungos secretando mais β -glicosidases devido a competição por fontes de carbono. No entanto, mais experimentos precisam ser realizados para melhor explicar este resultado. A curva de desenvolvimento da atividade β -glicosidase ao longo do tempo assumiu um crescimento mais linear e constante do que suas monoculturas.

O uso de *P. chrysosporium* em co-cultivo com *T. reesei* RUT-C30 foi analisado principalmente por dois motivos. Primeiramente, existem relatos de tal interação na literatura, mas com fonte de carbono (resíduos de abóbora) e design experimental diferentes, onde este co-cultivo apresentou maiores atividades de celulasas e ligninasas (YANG et al., 2013). Em segundo lugar, foi feita a hipótese que devido ao potencial de secreção de LiPs e MnPs por *P. chrysosporium*, a remoção da lignina exporia uma maior porção da holocelulose ao *T. reesei*, estimulando uma maior produção de holocelulasas. Tal hipótese não se confirmou como pode ser visto na Figura 17. Uma explicação para este fato seria que, apesar de possuir em seu genoma diversas LiPs e MnPs (MARTINEZ et al., 2004), esta cepa de *P. chrysosporium* nas condições específicas deste estudo, não produziu tais enzimas.

Foram efetuados cultivos de *P. chrysosporium* usando-se meios de cultivo e condições idênticas ou muito semelhantes aos trabalhos de TIEN e KIRK (1988) e FUJIAN, HONGZHANG e ZUOHU (2001). O intuito destes cultivos era mimetizar, com a maior fidelidade possível, trabalhos que obtiveram sucesso na produção de LiPs e MnPs por *P. chrysosporium*. As tentativas de detecção da atividade LiP foram realizadas utilizando-se o protocolo padrão para detecção desta atividade (TIEN e KIRK, 1988), mas não foram detectadas atividades em nenhum dos cultivos. A detecção de MnPs foi feita de acordo com o protocolo de KUWAHARA et al. (1984), mas nenhuma atividade foi detectada.

AL-ANI e SMITH (1988) relataram uma diminuição de 59% no teor de lignina de amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando *P. chrysosporium* em cultivo semi-sólido. FERRARA, BON e NETO (2002) utilizaram licores derivados do pré-

tratamento com explosão a vapor de bagaço de cana-de-açúcar como indutores da produção de LiPs por *P. chrysosporium*. Baseando-se nestes trabalhos é possível inferir que o bagaço de cana-de-açúcar deveria ser capaz de agir como indutor da produção de LiPs e MnPs nas condições citadas. Não foram encontrados trabalhos com design experimental semelhante ao aqui utilizado, impossibilitando uma comparação mais direta.

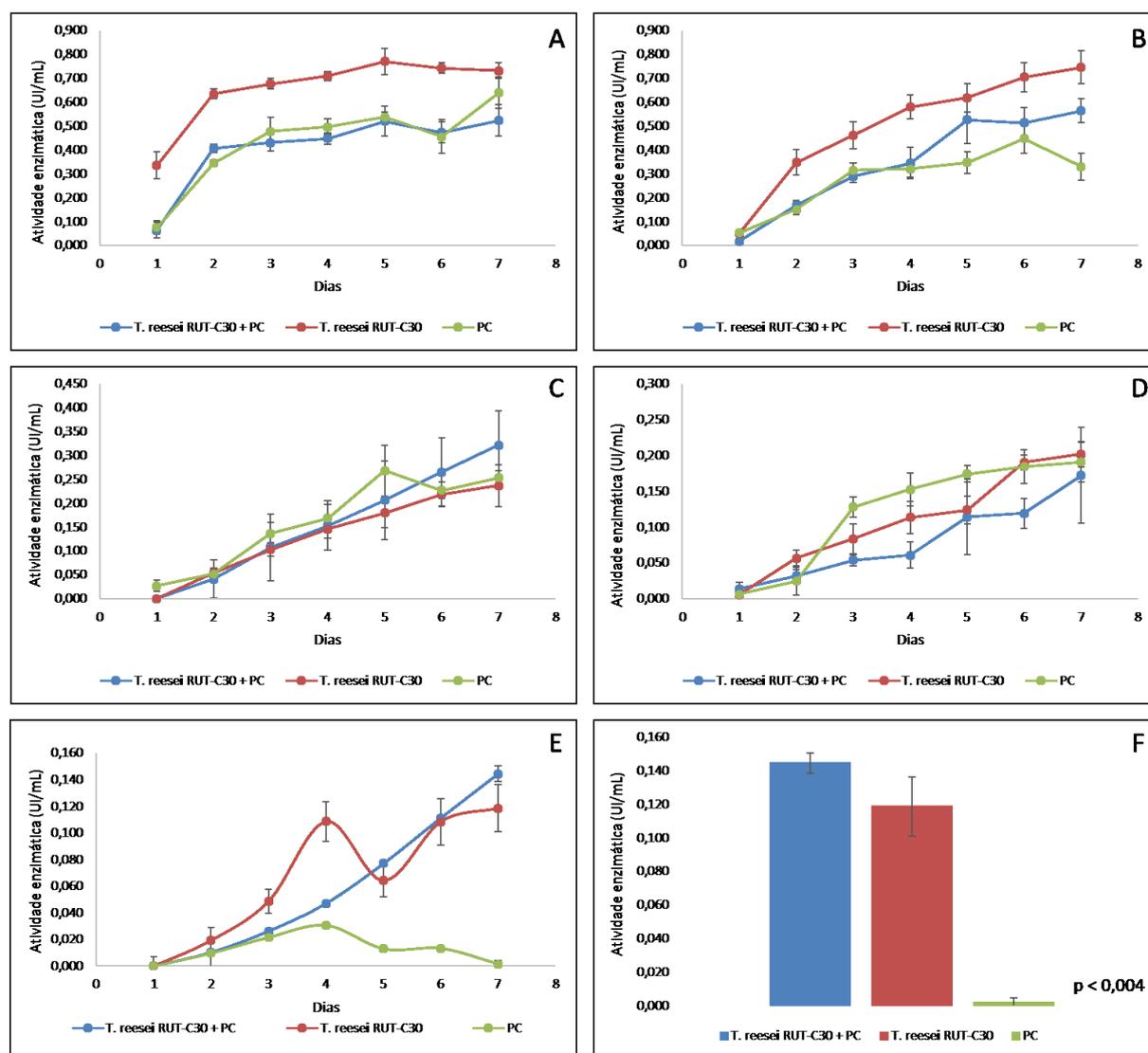


Figura 17 - Perfis das atividades enzimáticas dos co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 com *Phanerochaete chrysosporium* em cultivo submerso, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono por sete dias. Atividades A) xilanase, B) CMCCase, C) pectinase, D) mananase, E) β -glicosidase, F) atividade β -glicosidase no sétimo dia. O valor de p é resultante de análise de variância (ANOVA). As barras de erro representam o desvio-padrão entre as replicatas (n=4). Abreviação: PC = *Phanerochaete chrysosporium*. Cada gráfico possui uma legenda na parte inferior para facilitar a interpretação.

Outra possibilidade que foi considerada como fonte de erro na detecção de LiPs/MnPs foi a adição de azida sódica, adicionada aos extratos brutos finais para evitar contaminações com organismos aeróbicos. A azida sódica é uma inibidora de LiPs (TATARKO; BUMPUS,

1997) e MnPs (HARRIS et al., 1991) nos extratos brutos de *P. chrysosporium*. No entanto após o conhecimento deste fato, os cultivos foram refeitos, sem adição de azida sódica, mas as atividades ainda assim não foram detectadas, eliminando esta possibilidade.

Como último recurso para verificar se a falha na detecção não era resultante de erro experimental ou dos equipamentos e reagentes utilizados em nosso laboratório, as amostras foram enviadas ao laboratório do Dr. Félix Gonçalves de Siqueira (Embrapa Agroenergia; Brasília, DF) para que fossem novamente analisadas. O resultado foi negativo para LiPs, MnPs, lacases e até para peroxidases totais. A partir deste ponto, por questões de tempo e viabilidade, assumiu-se que as amostras não possuíam tais atividades e que não se tratava de uma falha metodológica.

Por fim, existe a possibilidade da cepa que obtivemos ter perdido, via mutações, parte de suas capacidades ligninolíticas após anos e anos sendo cultivada em meios ricos em nutrientes como meio batata-dextrose-ágar e meio malte-ágar. Casos de *P. chrysosporium* que perderam totalmente sua capacidade de produzir LiPs já foram descritos na literatura (BOOMINATHAN *et al.*, 1990), mas a perda total de todas as atividades degradadoras de lignina é uma possibilidade improvável. Mais estudos necessitam ser feitos para entender o que realmente está ocorrendo na situação explicitada como, por exemplo, testar outras cepas de *P. chrysosporium* e de outros fungos com atividades LiP e MnP sob as mesmas condições. Esta análise será adiada para perspectivas de trabalhos futuros.

Quanto ao co-cultivo entre *T. reesei* RUT-C30 e *Aspergillus tamarii*, a atividade de xilanase novamente seguiu o padrão apresentado nos cultivos anteriores, variando cerca de 0,1 UI/mL entre os mono e co-cultivos (Figura 18, A). A atividade de CMCase apresentou um padrão onde, ao longo dos primeiros cinco dias, a atividade se assemelhava totalmente àquela apresentada pelo monocultivo de *A. tamarii* e apenas no sexto e sétimo dia a atividade aumentou, atingindo o padrão observado anteriormente em um valor intermediário entre as monoculturas (*T. reesei* RUT-C30 0,74 UI/mL, *A. tamarii* 0,27 UI/mL, co-cultivo 0,51 UI/mL, Figura 18, B). Pode-se considerar, dados os desvios-padrão, que as atividades de pectinase (*T. reesei* RUT-C30 0,23 UI/mL, co-cultivo 0,19 UI/mL) e mananase (*T. reesei* RUT-C30 0,20 UI/mL, co-cultivo 0,17 UI/mL) foram similares às apresentadas pela monocultura de *T. reesei* RUT-C30 (Figura 18, C e D).

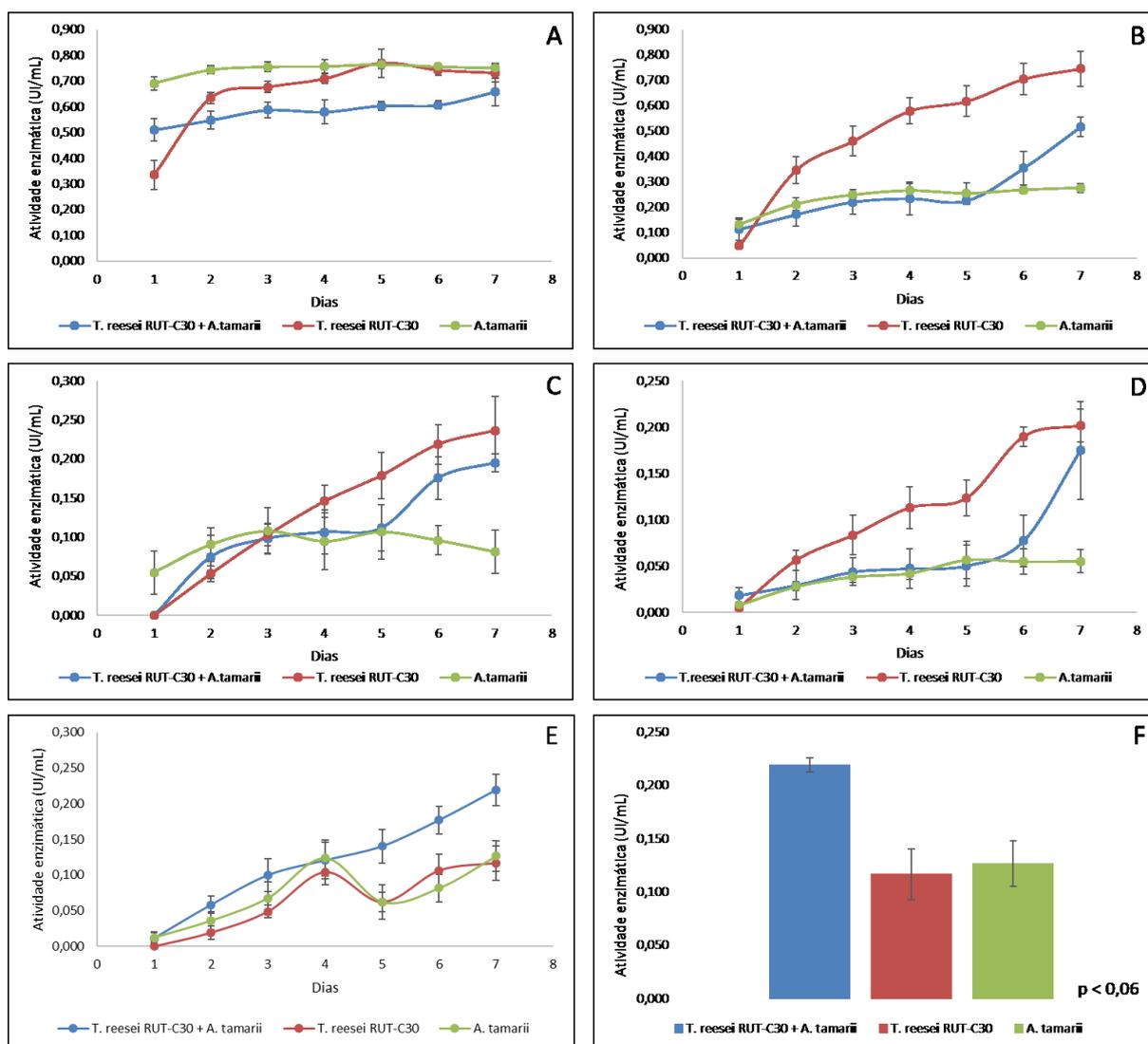


Figura 18 - Perfis das atividades enzimáticas dos co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 com *A. tamaritii* em cultivo submerso, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono por sete dias. Atividades A) xilanase, B) CMCase, C) pectinase, D) mananase, E) β -glicosidase, F) atividade β -glicosidase no sétimo dia. O valor de p é resultante de análise de variância (ANOVA). As barras de erro representam o desvio-padrão entre as replicatas ($n=4$). Cada gráfico possui uma legenda na parte inferior para facilitar a interpretação.

A atividade de β -glicosidase do co-cultivo apresentou um padrão de interação aditiva (Figura 18, E e F). No entanto, após a realização de análise de variância entre o co-cultivo e seus respectivos monocultivos, o p encontrado foi maior que 0,05 ($p = 0,059$), o padrão estabelecido. Um valor de p ligeiramente maior do que 0,05 não invalida o resultado, significando apenas que existe uma chance maior do mesmo ser fruto de uma flutuação experimental e não refletir a realidade da interação entre os fungos. A atividade de β -glicosidase deste co-cultivo, apesar do efeito aditivo, foi inferior à encontrada nos co-cultivos das cepas *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 com *A. niger* (Figura 15, E e F; Figura 16, E e F; Figura 18, E e F).

É difícil estabelecer comparações sobre o cultivo de *T. reesei* RUT-C30 com *A. tamaraii* devido ao fato que, no melhor do nosso conhecimento, não existem trabalhos publicados sobre essa formulação de co-cultivo na literatura até o momento e quaisquer comparações teriam que ser repetidamente feitas remetendo-se aos cultivos com *A. niger* já citados.

A atividade de FPase é uma mensuração importante, pois descreve a atividade de celulase total da amostra analisada (DASHTBAN et al., 2010). Este dado é importante para determinar se as mudanças no perfil enzimático de um co-cultivo foram ou não vantajosos na atividade celulolítica final em relação aos monocultivos. Como esperado, as maiores atividades de FPase foram atingidas por ambas as cepas de *T. reesei*, sendo a cepa RUT-C30 a de maior atividade entre elas (Figura 19, A). O co-cultivo de RUT-C30 com *A. niger* atingiu níveis elevados de FPase comparados ao monocultivo de *A. niger*. No entanto, a complementariedade de β -glicosidase fornecida por *A. niger* (Figura 15, E) não compensou totalmente a diminuição na atividade de CMCase do co-cultivo (Figura 15, B), resultando em uma atividade FPase inferior àquelas apresentadas pelo monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 (Figura 19, A).

O efeito negativo foi ainda mais proeminente para o co-cultivo entre a cepa QM 9414 e *A. niger*. A atividade de FPase foi comparável àquela apresentada pelo monocultivo de *A. niger*, mesmo com a presença do aparato celulolítico de *T. reesei* QM 9414. No entanto, há indícios de que a interação entre *T. reesei* QM 9414 e *A. niger* possua algum grau de inibição entre esses fungos. A Figura 13 (E-H) mostra que houve inibição à distância por parte das duas cepas, algo que pode ter interferido com o crescimento de ambos os participantes e prejudicado a atividade de celulase total. Outro fator, que não foi mensurado neste trabalho, foi a atividade de exoglicanase, que pode ter sido especialmente prejudicada nos co-cultivos, diminuindo a atividade de celulases totais em relação aos monocultivos. Mais experimentos, como a detecção de exoglicanase e variações no tempo de inóculo dos fungos como feito por FANG et al. (2013), devem ser realizados para confirmar ou descartar tais hipóteses e serão considerados como perspectivas futuras a este trabalho.

Considerando os co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 com *P. chrysosporium* e *A. tamaraii* (Figura 19, B), nenhum deles obteve maior atividade de FPase do que o monocultivo de RUT-C30. No entanto, eles atingiram níveis maiores do que os monocultivos de *P. chrysosporium* (*P. chrysosporium* 0,035 UI/mL, co-cultivo 0,064 UI/mL) e *A. tamaraii* (*A. tamaraii* 0,043 UI/mL, co-cultivo 0,077 UI/mL).

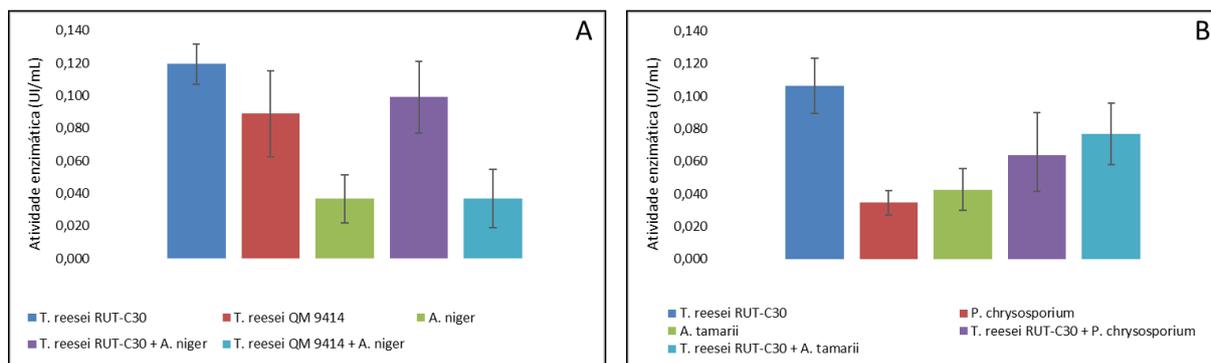


Figura 19 – Atividades enzimáticas FPase obtidas no sétimo dia de cultivo submerso utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. A) Atividades referentes a *T. reesei* RUT-C30, QM 9414 e seus respectivos co-cultivos com *A. niger*. B) Atividades referentes a *T. reesei* RUT-C30 e seus co-cultivos com *P. chrysosporium* e *A. tamarii*. As barras de erro representam o desvio-padrão entre as replicatas (n=4). Cada imagem possui sua própria legenda na porção inferior para facilitar a visualização.

Outros autores encontraram aumento na atividade de FPase para cultivos de *T. reesei* RUT-C30 com *A. niger* (FANG *et al.*, 2013) e *T. reesei* QM 9414 com *A. niger* (MADAMWAR; PATEL, 1992), mas com fontes de carbono e designs experimentais diferentes dos aqui empregados. Embora muitas atividades enzimáticas em co-cultivo de RUT-C30 e *P. chrysosporium* tenham sido avaliadas por YANG *et al.* (2013), a atividade de FPase não foi uma delas e outros trabalhos que averiguassem esta atividade com experimentos similares não foram encontrados.

Quantidade de Proteínas e Atividades Específicas

O método de Bradford foi utilizado para mensurar a quantidade de proteínas nos extratos brutos dos mono e co-cultivos após sete dias usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Houve grande variação entre as replicatas biológicas (n=3), representada pela medida do desvio-padrão entre elas (Figura 20). Entende-se aqui como replicata biológica os frascos de 250 mL inoculados independentemente com os mono ou co-cultivos nas condições descritas na metodologia. As replicatas técnicas (n=4), são referentes aos repetidos ensaios pelo método de Bradford que cada replicata biológica foi submetida. Os desvios-padrão entre as mesmas foram todos baixos (menores que 10% do valor total da do ensaio). Portanto, os altos desvios-padrão apresentados neste ensaio são resultantes das variações reais das replicatas biológicas e não um erro experimental.

Apesar das quantidades de proteína variarem muito entre as replicatas biológicas (Figura 20, A e B), os ensaios enzimáticos mostraram que as atividades holocelulolíticas mantiveram-se semelhantes, com baixos desvios-padrões em geral (Figuras 14-19). Logo, infere-se que outras proteínas, não relacionadas ao ataque do material lignocelulósico, são os principais fatores causadores dessa variação na quantidade de proteínas. Os monocultivos não apresentaram desvios-padrão menores (Figura 20, A e B), o que descarta a possibilidade desta variação ser uma característica exclusiva do perfil de secreção dos co-cultivos.

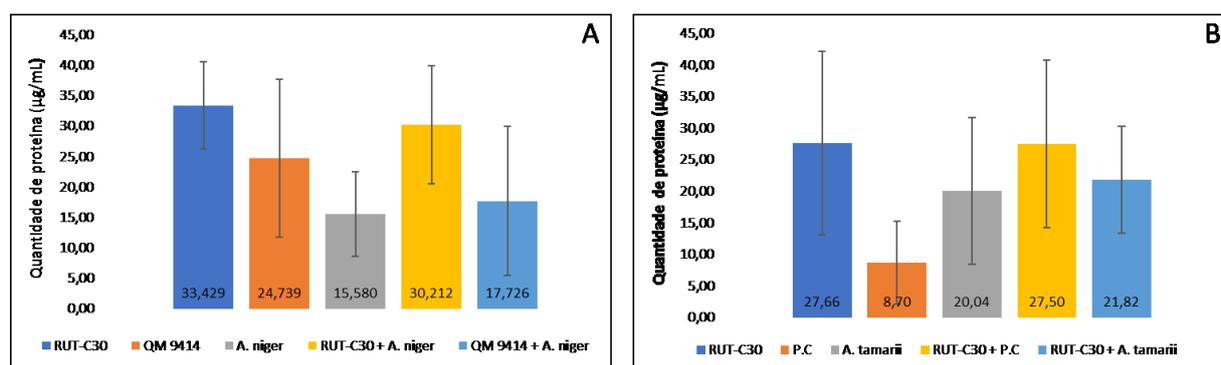


Figura 20 – Quantidade de proteína nos extratos brutos dos mono e co-cultivos obtidos após sete dias de cultivo submerso incubados a 120 rpm, 28 °C, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. A) Quantidade de proteínas nos cultivos de *T. reesei* RUT-C30, QM 9414, *A. niger* e seus respectivos co-cultivos, B) Quantidade de proteínas nos cultivos de *T. reesei* RUT-C30, *P. chrysosporium*, *A. tamaritii* e seus respectivos co-cultivos. Os números no centro inferior dos retângulos representam o valor exato daquela serie de dados. As barras de erro representam os desvios-padrão entre as replicatas ($n=3$). Abreviações: RUT-C30 = *T. reesei* RUT-C30, QM 9414 = *T. reesei* QM 9414, P.C = *P. chrysosporium*.

As Tabelas 2 e 3 contém a relação das atividades específicas e as comparações entre as atividades dos mono e co-cultivos. A quantidade de proteína mais baixa dos co-cultivos em relação às cepas de *T. reesei* resultou em atividades específicas maiores para diversas atividades nos co-cultivos. Por exemplo, os co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 com *A. niger* obtiveram maiores atividades específicas em todas as atividades, com exceção de FPAse, em comparação com o monocultivo de RUT-C30 (Tabela 2). O mesmo padrão também se aplica aos co-cultivos de *T. reesei* QM 9414 com *A. niger* em comparação com o monocultivo de *T. reesei* QM 9414 (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividades enzimáticas, quantidade de proteínas e atividade específica relativa ao sétimo dia dos mono e co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30, *T. reesei* QM 9414 e *A. niger*, incubados a 120 rpm, 28 °C com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Mono/ co-cultivos	Atividades Enzimáticas (UI/mL)	QP (mg/mL)	Atividades Específicas (UI/mg)	
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Xilanase	0,858	0,033	25,730
	CMCase	0,691	0,033	20,730
	Pectinase	0,239	0,033	7,159
	Mananase	0,172	0,033	5,147
	FPase	0,12	0,033	3,598
	β-glicosidase	0,177	0,033	5,307
<i>T. reesei</i> QM 9414	Xilanase	0,860	0,025	34,685
	CMCase	0,420	0,025	16,922
	Pectinase	0,101	0,025	4,066
	Mananase	-	-	-
	FPase	0,089	0,025	3,588
	β -glicosidase	0,153	0,025	6,168
<i>A. niger</i>	Xilanase	0,802	0,015	52,752
	CMCase	0,183	0,015	12,037
	Pectinase	0,025	0,015	1,644
	Mananase	0,066	0,015	4,341
	FPase	0,037	0,015	2,434
	β -glicosidase	0,414	0,015	27,231
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>A. niger</i>	Xilanase	0,858	0,030	28,478 ¹
	CMCase	0,691	0,030	22,935 ^{1,2}
	Pectinase	0,238	0,030	7,900 ^{1,2}
	Mananase	0,171	0,030	5,676 ^{1,2}
	FPase	0,099	0,030	3,286 ²
	β -glicosidase	0,43	0,030	14,272 ¹
<i>T. reesei</i> QM 9414 + <i>A. niger</i>	Xilanase	0,797	0,018	43,929 ³
	CMCase	0,325	0,018	17,913 ^{3,2}
	Pectinase	0,100	0,018	5,512 ^{3,2}
	Mananase	-	0,018	-
	FPase	0,037	0,018	2,039
	β -glicosidase	0,368	0,018	20,283 ³

QP = Quantidade de Proteína (mg/mL), - = não foram detectadas atividades. ¹Maior que em *T. reesei* RUT-C30,

²Maior que em *A. niger*, ³Maior que em *T. reesei* QM 9414.

Nos cultivos entre *T. reesei* RUT-C30 com *P. chrysosporium* e *A. tamaritii* apenas algumas atividades específicas superaram àquelas apresentadas por *T. reesei* RUT-C30 em monocultivo (Tabela 3). No co-cultivo de *T. reesei* RUT-C30 e *P. chrysosporium* apenas as atividades de pectinase, mananase e β-glicosidase apresentaram atividades específicas

maiores que o monocultivo de RUT-C30 (Tabela 3). Para o co-cultivo com *A. tamaritii* as atividades específicas de xilanase, mananase e β -glicosidase foram maiores que as do monocultivo de RUT-C30 (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividades enzimáticas, quantidade de proteínas e atividade específica relativa ao sétimo dia dos mono e co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30, *P. chrysosporium* e *A. tamaritii*, incubados a 120 rpm, 28 °C com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Mono/ co-cultivos	Atividades Enzimáticas (UI/mL)	QP (mg/mL)	Atividades Específicas (UI/mg)	
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Xilanase	0,731	0,028	26,107
	CMCase	0,746	0,028	26,643
	Pectinase	0,236	0,028	8,429
	Mananase	0,119	0,028	4,250
	FPase	0,106	0,028	3,786
	β -glicosidase	0,119	0,028	4,250
<i>P. chrysosporium</i>	Xilanase	0,639	0,009	71,000
	CMCase	0,329	0,009	36,556
	Pectinase	0,253	0,009	28,111
	Mananase	0,191	0,009	21,222
	FPase	0,035	0,009	3,889
	β -glicosidase	-	0,009	-
<i>A. tamaritii</i>	Xilanase	0,751	0,020	37,550
	CMCase	0,276	0,020	13,800
	Pectinase	0,081	0,020	4,050
	Mananase	0,055	0,020	2,750
	FPase	0,043	0,020	2,150
	β -glicosidase	0,126	0,020	6,300
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>P. chrysosporium</i>	Xilanase	0,523	0,027	19,370
	CMCase	0,563	0,027	20,852
	Pectinase	0,321	0,027	11,889 ¹
	Mananase	0,172	0,027	6,370 ¹
	FPase	0,064	0,027	2,370
	β -glicosidase	0,144	0,027	5,333 ¹
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>A. tamaritii</i>	Xilanase	0,658	0,022	29,909 ¹
	CMCase	0,517	0,022	23,500 ³
	Pectinase	0,195	0,022	8,864 ³
	Mananase	0,175	0,022	7,955 ^{1,3}
	FPase	0,077	0,022	3,500 ³
	β -glicosidase	0,219	0,022	9,955 ^{1,3}

QP = Quantidade de Proteína (mg/mL), - = não foram detectadas atividades. ¹Maior que em *T. reesei* RUT-C30,

²Maior que em *P. chrysosporium*, ³Maior que em *A. tamaritii*.

HU et al. (2011) mediu a quantidade de proteína de cultivos de *A. niger* e *P. chrysosporium* e encontrou valores superiores aos aqui apresentados, utilizando 1% de farelo de trigo como fonte de carbono. É um resultado esperado que fontes de carbono diferentes produzam quantidades de proteína diferentes durante o cultivo. Não foram encontrados trabalhos que avaliassem a alteração do nível de proteínas e as atividades específicas dos co-cultivos. Um dos motivos para a não disponibilidade destes dados pode depender do fato que muitos trabalhos de co-cultivo fúngico são realizados em regime de fermentação em estado sólido (SSF), onde o dado predominante é a atividade por grama de substrato e não necessariamente por proteína secretada.

Perfil de Proteínas nos Extratos Brutos dos Mono e Co-cultivos

Os extratos brutos dos mono e co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 com *A. niger* e de *T. reesei* RUT-C30 com *P. chrysosporium* e *A. tamarii*, foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Após a corrida dos géis, as proteínas foram reveladas com nitrato de prata exatamente como descrito na seção metodológica.

É importante ressaltar que os extratos brutos fúngicos possuem uma grande variedade de proteínas secretadas (nem todas elas relacionadas à degradação de biomassa lignocelulósica) e que géis de SDS-PAGE de tais amostras apresentam arraste e sobreposição de bandas, algo esperado devido à natureza das amostras analisadas. Logo, este experimento não tem a capacidade, nem a finalidade, de identificar com alta precisão bandas específicas que se apresentem de forma igual ou diferencial entre os mono e co-cultivos. O objetivo é avaliar o perfil *geral* de proteínas secretadas pelas condições em teste e traçar um paralelo sobre quais dos fungos participantes no co-cultivo contribuíram mais para o perfil proteico final, após os sete dias de cultivo, em relação aos seus monocultivos.

No cultivo da cepa *T. reesei* QM 9414 com *A. niger*, o perfil proteico predominante se assemelha mais com o do monocultivo de QM 9414, mas algumas bandas aparentemente foram intensificadas no co-cultivo (Figura 21, A, setas azuis). O co-cultivo de *T. reesei* RUT-C30 com *A. niger* apresentou perfil pouco nítido e inconclusivo. Este resultado foi inesperado e, pelo menos, três tentativas de refazer a precipitação desta amostra e correr os géis novamente foram realizadas. Em todas as tentativas este perfil pouco nítido se repetiu. Uma futura solução seria aumentar a carga de proteínas aplicadas ao gel, no entanto, como cargas

de proteína iguais devem ser aplicadas para permitir uma comparação, isso poderia prejudicar a visualização das outras amostras.

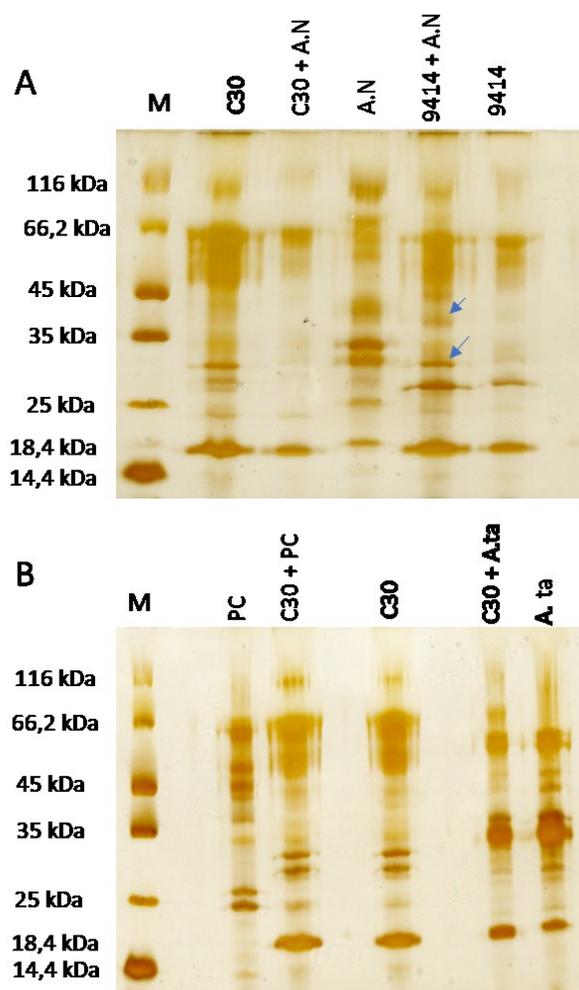


Figura 21 – Géis SDS-PAGE dos extratos brutos após sete dias de cultivo a 28 °C, 120 rpm, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. A) Perfil de proteínas presentes nos extratos brutos de *T. reesei* RUT-C30, QM 9414, *A. niger* e seus respectivos co-cultivos. B) Perfil de proteínas presentes nos extratos brutos de *T. reesei* RUT-C30, *P. chrysosporium*, *A. tamarii* e seus respectivos co-cultivos. Setas azuis indicam bandas mais proeminentes no co-cultivo. Abreviações: M = marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker, C30 = *T. reesei* RUT-C30, C30 + A.N = *T. reesei* RUT-C30 + *A. niger*, A.N = *A. niger*, 9414 = *T. reesei* QM 9414, 9414 + A.N = *T. reesei* QM 9414 + *Aspergillus niger*, PC = *P. chrysosporium*, C30 + PC = *T. reesei* RUT-C30 + *P. chrysosporium*, C30 + A. ta = *T. reesei* RUT-C30 + *A. tamarii*, A. ta = *A. tamarii*.

No co-cultivo de *T. reesei* RUT-C30 com *P. chrysosporium*, o perfil de proteínas do co-cultivo foi altamente semelhante ao apresentado pelo monocultivo de RUT-C30 (Figura 21, B). Já no co-cultivo de *T. reesei* RUT-C30 com *A. tamarii* o resultado oposto foi obtido, com o perfil do co-cultivo sendo basicamente idêntico ao monocultivo de *A. tamarii* (Figura 21, B). Este comportamento, onde o perfil proteico assume uma forma semelhante ao

monocultivo de um dos participantes do co-cultivo, já foi descrito em trabalhos anteriores para culturas de *Magnaporthe grisea* com *A. niger* e *Aspergillus oryzae* (HU et al., 2011). Neste estudo, os co-cultivos produziram perfis muito semelhantes aos apresentados pelos monocultivos dos *Aspergillus* participantes.

Como já ressaltado, uma análise visual do perfil proteico dos extratos brutos raramente fornecerá informações mais específicas sobre as proteínas presentes. São necessárias etapas de purificação ou a identificação via espectrometria de massas para obter-se mais detalhes sobre bandas específicas do gel, sendo este último método já cotado para experimentos futuros. No entanto, o uso de géis SDS-PAGE cumpre seu papel em fornecer o perfil geral dos mono e co-cultivos e permite analisar se existe prevalência de um dos pares da cultura na composição final do perfil (como ficou comprovado pelos resultados da Figura 21, B).

Hidrólise de Bagaço de Cana-de-açúcar

Foram realizados experimentos para verificar a eficiência dos mono e co-cultivos em hidrolisar material lignocelulósico complexo, no caso o bagaço de cana-de-açúcar. A concentração de material lignocelulósico foi de 0,75% (m/v) e a carga de proteína utilizada foi de 1,5 mg de proteína/g de substrato. Alíquotas foram coletadas periodicamente para analisar o desenvolvimento da liberação de açúcares redutores. O experimento de hidrólise foi realizado apenas para os mono e co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 com *A. niger*. Estes cultivos foram selecionados por apresentarem a maior complementariedade de atividades enzimáticas, principalmente em se tratando de β -glicosidases, enzimas geralmente deficientes em coquetéis de *T. reesei*.

O extrato bruto capaz de liberar a maior concentração de açúcares ao longo das 72 horas foi o monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 (Figura 22, A). No entanto, com exceção do monocultivo de *A. niger*, que apresentou o menor desempenho hidrolítico, todos os mono e co-cultivos apresentaram resultados semelhantes na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, principalmente considerando-se os altos desvios-padrão. Uma possibilidade para os altos desvios-padrão apresentados é a heterogeneidade do substrato lignocelulósico, que possui diferentes graus de recalcitrância e, portanto, responde de forma diferente ao ataque das enzimas presentes nos extratos brutos. Este fenômeno pode causar a variação nos açúcares liberados ao final do experimento, refletida nos desvios-padrão. Como o extrato bruto de *A.*

niger obteve a menor liberação de açúcares redutores, o *pool* de açúcares no meio foi provavelmente menos diverso (considerando que o substrato foi pouco degradado), resultando em concentrações de açúcares redutores com pouca variação entre as replicatas e consequentemente menores desvios-padrão.

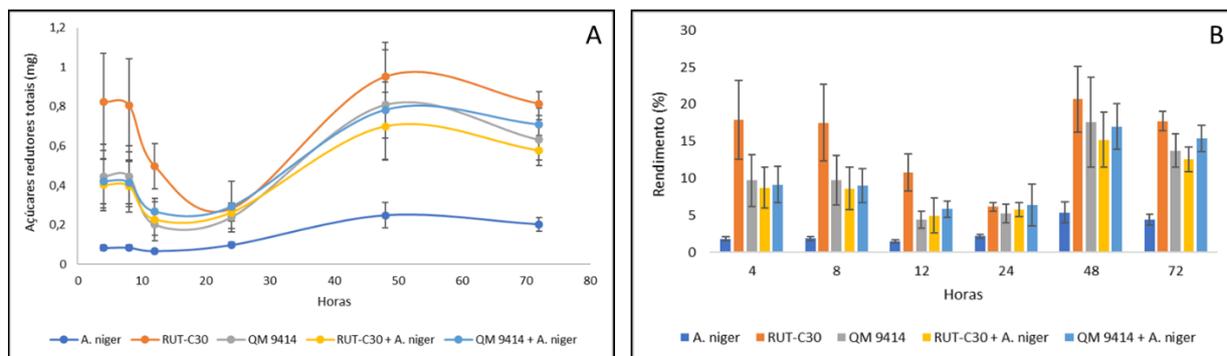


Figura 22 – Hidrólise realizada pelos extratos brutos de *T. reesei* RUT-C30, QM 9414, *A. niger* e seus respectivos co-cultivos sobre bagaço de cana-de-açúcar na concentração 0,75% (m/v), 900 rpm, 50 °C ao longo de 72 horas. A) Concentração de açúcares redutores totais liberados ao longo do tempo pelos extratos brutos de *T. reesei* RUT-C30, QM 9414, *A. niger* e seus respectivos co-cultivos. B) Rendimento (porcentagem de açúcares liberados em relação ao total de açúcares que compõe a biomassa lignocelulósica) alcançado pelos extratos brutos de *T. reesei* RUT-C30, QM 9414, *A. niger*. As barras de erro representam os desvios-padrão entre as replicatas ($n=3$). Abreviações: RUT-C30 = *T. reesei* RUT-C30, RUT-C30 + *A. niger* = *T. reesei* RUT-C30 + *A. niger*, QM 9414 = *T. reesei* QM 9414, QM 9414 + *A. niger* = *T. reesei* QM 9414 + *A. niger*.

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar é útil para avaliar a eficiência dos co-cultivos fúngicos em relação a seus monocultivos, na tarefa de hidrolisar a recalcitrante biomassa lignocelulósica. Neste tipo de experimento todo o conjunto de enzimas que atuam sobre a biomassa vegetal, inclusive enzimas não analisadas neste trabalho, tem o potencial de influenciar no resultado final.

Apesar do aumento de aproximadamente 140% na atividade de β -glicosidase nos co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 com *A. niger* (Figuras 15 e 16, E e D, respectivamente) não houve aumento na liberação de açúcares redutores utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato (Figura 22, A). Este resultado demonstra que o aumento de uma única atividade enzimática sobre um substrato sintético, mais homogêneo, em condições ideais, não necessariamente se reflete em maior liberação de açúcares redutores na hidrólise de material lignocelulósico.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste estudo é composto de 2.55% arabinana, 0.68%, galactosana, 22.43% xilana, 43.46% glucana, 19.79% lignina insolúvel em ácido, 5.62% lignina solúvel em ácido e 0.9% cinzas (SILVA et al., *in press*). Toda a porção holocelulósica foi somada para formar a fração de holocelulose total e a quantidade de

açúcares liberados redutores liberados foi comparada com essa fração para os cálculos de rendimento.

Os rendimentos hidrolíticos em relação à holocelulose total também demonstraram a superioridade do monocultivo de *T. reesei* RUT-C30, que se saiu relativamente bem ao hidrolisar aproximadamente 20% da holocelulose total de um substrato complexo, não pré-tratado e altamente recalcitrante (Figura 22, B). Reforça-se também o fato de que houve pouca diferença entre os co-cultivos e seus monocultivos nos rendimentos totais (Figura 22, B).

Apesar da medição de açúcares redutores totais fornecer um comparativo entre as amostras, ela não pode ser usada para descartar totalmente o uso de determinadas combinações de cultivo. Aqui foram medidos apenas os açúcares redutores totais, não sendo avaliados quais tipos de açúcares foram liberados (monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, etc.). Futuramente, pretende-se analisar os resultados das hidrólises com o auxílio de técnicas como HPLC e espectrometria de massas, para averiguar quais os tipos de açúcares redutores que estão sendo liberados ao longo do tempo por cada extrato bruto e se existem diferenças entre eles.

No estudo realizado por FANG, ZHAO e SONG (2010), o extrato bruto de uma cultura mista de *T. reesei* RUT-C30 e *A. niger* NL02 obteve melhores rendimentos hidrolíticos em celulose microcristalina e em palha de milho pré-tratada com explosão a vapor do que o monocultivo de *T. reesei* e um coquetel industrial. KOLASA et al. (2014) reportou maior liberação de glicose e celobiose por extratos brutos de co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 com diferentes cepas de *Aspergillus* ao hidrolisar farelo de trigo pré-tratado. Logo, observa-se nestes e outros estudos que diferentes cepas, designs experimentais e substratos irão contribuir para respostas variadas. É recomendado que os co-cultivos sejam avaliados em cada caso separadamente, pois com as informações publicadas até o momento, é difícil fazer generalizações.

A diminuição na concentração dos açúcares redutores totais nos períodos de 12 e 24 horas foi um resultado inesperado. Primeiramente, foi considerada a ocorrência de uma contaminação, então o experimento foi refeito adicionando-se azida sódica na concentração de 0,2% às amostras. No entanto, a queda nos dois períodos se repetiu, eliminando a possibilidade de uma contaminação por organismos aeróbicos. Devido a agitação no meio, a contaminação por microrganismos anaeróbicos é uma hipótese pouco provável. Não foram encontrados vestígios da presença de bactérias ou fungos nas amostras. Este experimento foi

repetido 3 vezes, com diferentes concentrações de azida sódica e sem a presença da mesma, o padrão foi idêntico em todas as repetições.

Uma explicação para a queda na concentração de açúcares redutores nos períodos de 12 e 24 horas pode ser dada pela ocorrência de reações de transglicosilação. Reações de transglicosilação ocorrem quando, dada uma certa concentração de açúcares como glicose e celobiose no meio, enzimas que geralmente hidrolisam ligações glicosídicas começam a forma-las. Estas reações não necessariamente são equivalentes à reação reversa da enzima e já foram documentados casos onde β -glicosidases produziam o dissacarídeo sofrorose via transglicosilação, por exemplo (VAHERI; LEISOLA; KAUPPINEN, 1979). Este efeito já foi observado em celulasas de *T. reesei* (VAHERI; LEISOLA; KAUPPINEN, 1979) e *A. niger* (BOHLIN et al., 2013), ambos fungos utilizados neste estudo. No entanto, não foram realizados experimentos que corroborassem ou refutassem esta hipótese.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Amostras sólidas resultantes de sete dias de mono e co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30, QM 9414 e *A. niger* em bagaço de cana foram coletadas e tratadas como descrito na seção metodológica para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Primeiramente, é importante ressaltar uma limitação da técnica de microscopia de varredura ao analisar materiais considerados de maiores dimensões para um microscópio de resolução tão poderosa. Cada suporte que é inserido no microscópio só pode ser carregado com uma pequena quantidade de material sólido (bagaço) devido ao grande tamanho do mesmo. Devido a isso, as amostras analisadas não necessariamente são uma reflexão total do que está ocorrendo no meio de cultura, pois as mesmas representam uma minúscula fração do todo.

Na Figura 23 (A-E), podemos observar os diferentes padrões de degradação do bagaço de cana pelos mono e co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30, QM 9414 e *A. niger*. De acordo com as imagens, podemos ver que os monocultivos (A, B e D) apresentaram um menor grau visual de degradação da superfície do bagaço de cana-de-açúcar do que os co-cultivos (C e E).

Esse resultado é de certa forma conflitante com aqueles obtidos pelo experimento de hidrólise discutido acima, pois de acordo com o mesmo, não deveriam existir diferenças significativas na degradação do substrato pelos mono ou co-cultivos, com exceção do

monocultivo de *A. niger*, que tem desempenho muito inferior aos co-cultivos com sua presença. Tal diferença pode talvez ser explicada pelo modo de colonização do fungo e alguma interação micelial direta com o substrato, já que nos experimentos de hidrólise os fungos em si não estão presentes, apenas seus extratos brutos. Um experimento futuro com imagens da hidrólise realizada pelos extratos brutos ajudaria a elucidar a questão.

Outra possibilidade remete à limitação metodológica de analisar substratos de maiores dimensões, como o bagaço de cana-de-açúcar via MEV. O tamanho da amostra limita a quantidade que pode ser analisada, fazendo com que o resultado obtido não seja representativo da amostra total.

A Figura 24 enfatiza o crescimento dos fungos nos mono e co-cultivos. Pode-se ver o crescimento dos fungos *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 (Figura 24, B e D respectivamente) e *A. niger* (Figura 24, A). Todos os exemplares cresceram altamente aderidos ao bagaço de cana-de-açúcar. *A. niger* apresentou a tendência de crescer em grandes massas miceliais (Figura 23, A) em frestas no substrato (Figura 24, A), enquanto ambos os *T. reesei* além de crescerem em grandes conjuntos miceliais (Figura 24, B e D), apresentaram também um crescimento na porção superficial do bagaço (Figura 24, E) com hifas em menor densidade se espalhando pelo substrato.

Não foi possível diferenciar as hifas dos diferentes fungos nos co-cultivos das amostras analisadas. A tendência de todas as três cepas de crescer em densas massas miceliais dificulta a diferenciação das espécies. Não foi possível encontrar visualmente hifas semelhantes àquelas apresentadas por *A. niger* (Figuras 23, A e 24, A) nos co-cultivos, mas as cepas de *T. reesei* foram prontamente identificadas. Sabe-se que *A. niger* teve influência nos co-cultivos, devido ao perfil das atividades enzimáticas, mas a visualização do mesmo nas amostras não ocorreu.

Três possibilidades podem ser consideradas: (1) *A. niger* estava presente e influenciou as atividades enzimáticas do co-cultivo, mas ao longo do tempo a cultura enfrentou alguma forma de competição e não resistiu até o sétimo dia de cultivo. (2) Tanto as cepas de *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 quanto a de *A. niger* estão presentes nos co-cultivos, mas seus micélios estão muito interligados, comprometendo a diferenciação. Esse tipo de crescimento interligado já foi relatado por FRIEDRICH, CIMERMAN e PERDIH (1987) em culturas de *T. reesei* com *A. awamori*. (3) Os resultados podem ter sido comprometidos pela limitação metodológica já discutida e não refletem a amostra como um todo.

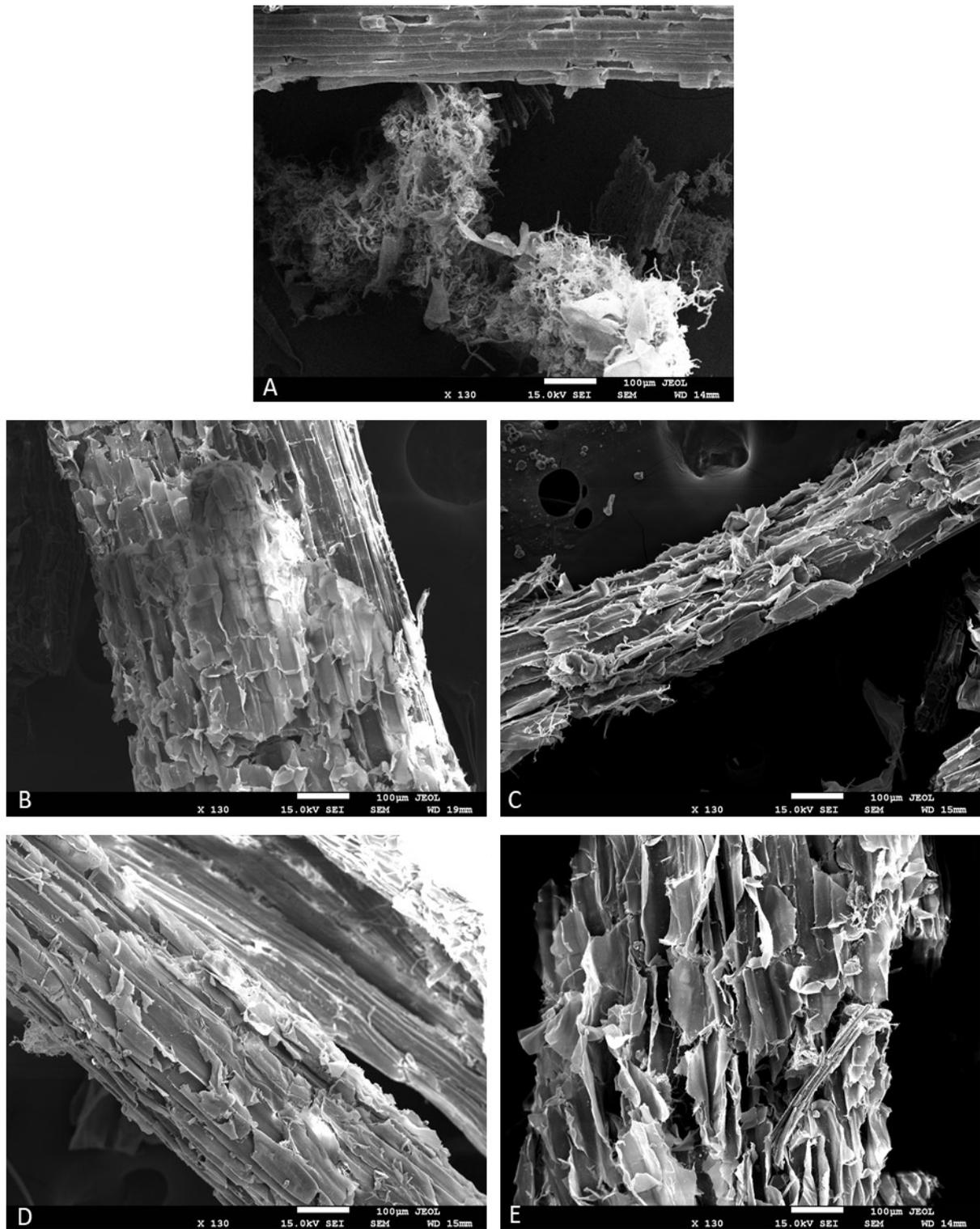


Figura 23 – Degradação do bagaço de cana-de-açúcar por *T. reesei* RUT-C30, QM 9414, *A. niger* e seus respectivos co-cultivos após sete dias de cultivo, 120 rpm a 28 °C. Imagens obtidas via microscopia eletrônica de varredura. A) *A. niger*, B) *T. reesei* RUT-C30, C) *T. reesei* RUT-C30 + *A. niger*, D) *T. reesei* QM 9414, E) *T. reesei* QM 9414 + *A. niger*.

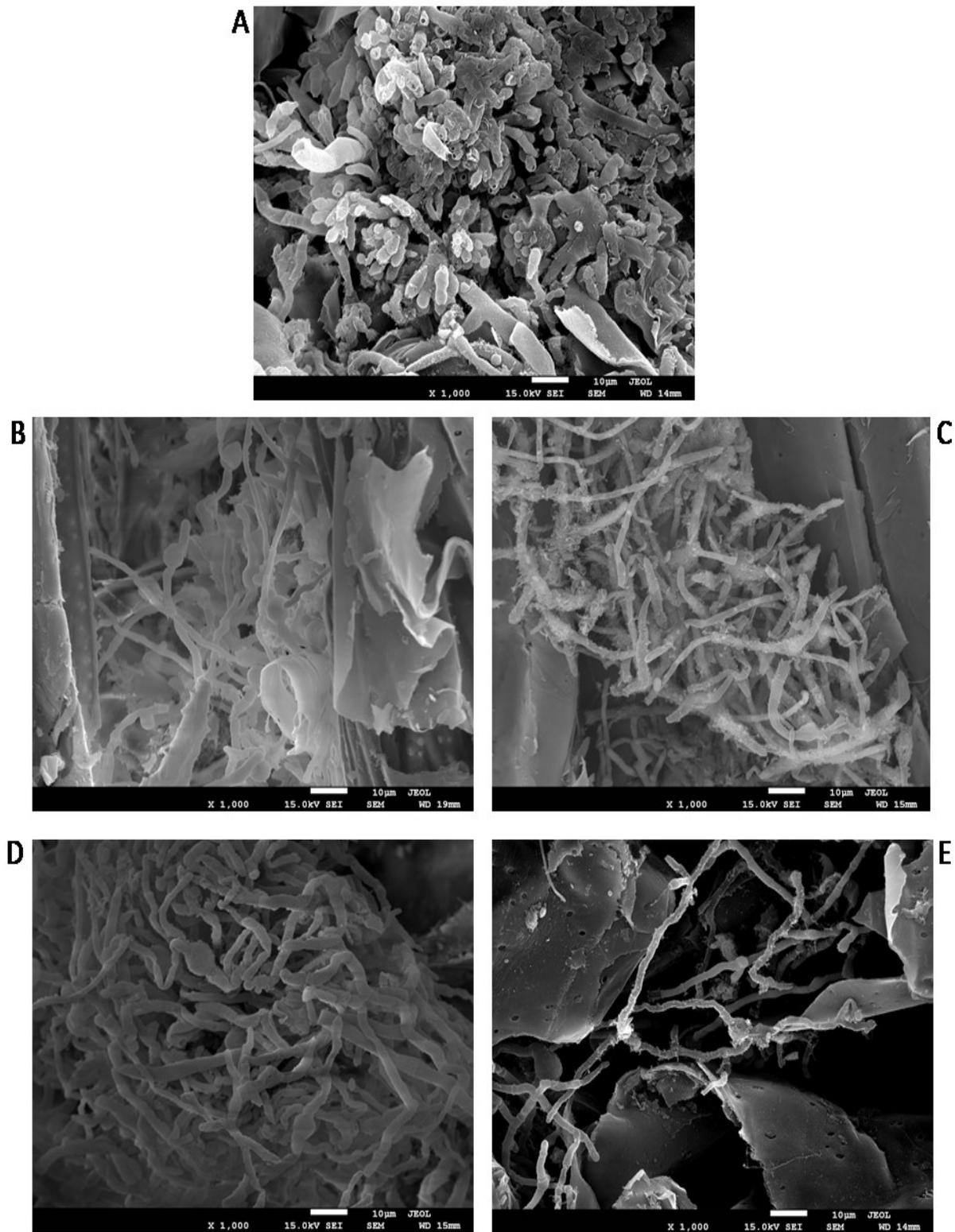


Figura 24 – Hifas de *T. reesei* RUT-C30, QM 9414, *A. niger* e seus respectivos co-cultivos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar após sete dias de cultivo, 120 rpm a 28 °C. Imagens obtidas via microscopia eletrônica de varredura. A) *A. niger*, B) *T. reesei* RUT-C30, C) *T. reesei* RUT-C30 + *A. niger*, D) *T. reesei* QM 9414, E) *T. reesei* QM 9414 + *A. niger*.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foram avaliados os efeitos do co-cultivo de *T. reesei* RUT-C30 com *A. niger*, *P. chrysosporium* e *A. tamarii*, bem como o co-cultivo de *T. reesei* QM 9414 com *A. niger* na alteração das atividades enzimáticas e perfil proteico em relação aos monocultivos dos participantes.

Foi confirmado que os perfis enzimáticos mudam em regime de co-cultivo, com certas atividades aumentando enquanto outras diminuem. A atividade de β -glicosidase foi aumentada em 142% e 140% nos co-cultivos dos *T. reesei* RUT-C30 e QM 9414 respectivamente quando co-cultivados com *A. niger*. No entanto, este aumento significativo não se refletiu em maiores atividades de celulasas totais (FPase) nem em maior liberação de açúcares redutores totais na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Apesar do perfil diferenciado na maioria dos co-cultivos os resultados da hidrólise enzimática demonstraram que os co-cultivos não tiveram grande diferença em relação aos monocultivos, com exceção de *A. niger* que teve um baixo desempenho na hidrólise em monocultivo.

Portanto, é imperativo realizar uma varredura sobre o máximo de atividades enzimáticas possíveis para conseguir-se determinar diferenças reais entre os cultivos. No entanto, ensaios enzimáticos utilizando substratos simples e homogêneos não são garantia de desempenho proporcional quando as mesmas enzimas estão atuando sobre biomassa lignocelulósica. Experimentos que reflitam atividades totais como FPase e a hidrólise de materiais lignocelulósicos estão entre os mais importantes para realizar comparações sobre a eficiência e diferenças entre os mono e co-cultivos.

A falta de informação sobre como os fungos filamentosos interagem em nível molecular dificulta a discussão aprofundada dos resultados obtidos. O campo de co-cultivos fúngicos para aplicações biotecnológicas ainda é limitado e informações importantes que auxiliariam na implantação de designs experimentais mais eficientes ainda não estão disponíveis na literatura. Novos trabalhos que investiguem a interação molecular entre fungos filamentosos serão essenciais para o desenvolvimento deste campo de estudo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisando os resultados obtidos e com a experiência adquirida ao longo deste trabalho, algumas perspectivas e recomendações podem ser feitas para novos estudos:

1. Realizar ensaios de outras atividades enzimáticas menos relatadas como α -arabinofuranosidasas.
2. Testar tempos de inóculos diferentes para os co-cultivos, com atrasos entre a inoculação das espécies a serem utilizadas.
3. Realizar zimogramas que ajudem a identificar se as bandas diferenciais entre os co-cultivos representam enzimas hidrolíticas como celulasas, xilanasas, etc.
4. Analisar os experimentos de hidrólise enzimática utilizando técnicas como HPLC para entender melhor quais açúcares redutores estão sendo liberados pelos mono e co-cultivos.
5. Realizar análises de espectrometria de massas para identificar o secretoma e o exometaboloma dos fungos filamentosos em regime de mono e co-cultivos.
6. Identificar possíveis padrões de proteínas e metabolitos secundários envolvidos nas interações positivas e negativas entre os co-cultivos para melhor embasar as discussões sobre as interações moleculares de fungos filamentosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREGO, N.; SALCEDO, I. How does fungal diversity change based on woody debris type? A case study in Northern Spain. **Ekologija**, v. 57, n. 3, p. 109–119, 2011.
- ADESIOYE, F. A. et al. Phylogeny, classification and metagenomic bioprospecting of microbial acetyl xylan esterases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 93–94, p. 79–91, 2016.
- ADITIYA, H. B. et al. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.
- AGROENERGIA, E. **Biorrefinarias**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48750/1/biorrefinaria-modificado-web.pdf>>.
- AL-ANI, F.; SMITH, J. E. Effect of chemical pretreatments on the fermentation and ultimate digestibility of bagasse by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 42, n. 1, p. 19–28, 1988.
- ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; SIVAKUMAR, N. Cellobiohydrolases: Role, Mechanism, and Recent Developments. In: GUPTA, V. K. (Ed.). **Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass**. 1. ed. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2016. v. 3p. 29–36.
- AZIZA, M.; AMRANE, A. Commensalism during submerged mixed culture of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on glutamate and lactate. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2452–2457, 2006.
- BARROS, S. **Brazil Biofuels Annual Report**. [s.l.: s.n.].
- BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 106, 2016.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.
- BLOT, W. J.; DAY, N. E. Synergism and Interactions: are they Equivalent?. **American Journal of Epidemiology**, v. 110, n. 1, p. 99–100, 1979.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.
- BODDY, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, n. 3, p. 185–194, 2000.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 519–546, 2003.
- BOHLIN, C. et al. A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 159–169, 2013.
- BOKULICH, N. A. et al. Indigenous bacteria and fungi drive traditional kimoto sake fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5522–5529, 2014.
- BOOMINATHAN, K. et al. Lignin peroxidase-negative mutant of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 1, p. 260–265, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BUCKERIDGE, M. et al. The cell wall architecture of sugarcane and its implications to cell wall recalcitrance. In: LAM, E. et al. (Eds.). **Compendium of Bioenergy Plants: Sugarcane**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2015.

p. 31–50.

Carbohydrate Active Enzymes database. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>.

CARPIO, L. G. T.; DE SOUZA, F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 111, p. 771–780, 2017.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, jan. 2005.

CORRÊA DO LAGO, A. et al. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 5–12, 2012.

COSGROVE, D. J. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 22, p. 122–131, 2014.

COSTA, A. M. et al. Production of Tannase by *Aspergillus tamaris* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 399–404, 2008.

DA SILVA, A. M. **Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiária).** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2005.

DASHTBAN, M. et al. Cellulase activities in biomass conversion: Measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 302–309, 2010.

DE SOUZA, A. P. et al. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564–579, 2013.

DE SOUZA, A. P. et al. How cell wall complexity influences saccharification efficiency in *Miscanthus sinensis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4351–4365, 2015.

DE SOUZA, D. F.; DE SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaris* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8–9, p. 835–838, 2001.

DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160–1167, 2011.

DIAS, M. O. S. et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 152–161, 2012.

DING, S.-Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 3, p. 597–606, 2006.

DOBLIN, M. S.; PETTOLINO, F.; BACIC, A. Plant cell walls: The skeleton of the plant world. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 5, p. 357–381, 2010.

ENERGY, U. . D. OF. **Energy, environmental, and economics (E3) handbook - A resource tool to aid the office of industrial technologies.** 1. ed. [s.l.: s.n.].

EYRE, C. **Interspecific interactions between saprotrophic basidiomycetes: effect on volatile production and gene expression of mycelia.** [s.l.] Cardiff University, 2007.

FANG, H. et al. Enhanced cellulolytic enzyme production by the synergism between *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02 and by the addition of surfactants. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 2, p. 390–398, 2013.

FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X. Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4111–4119, 2010.

FAO, F. AND A. O. OF THE U. N. **Production of Sugar cane: top 10 producers**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/beta/en/>>.

FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; NETO, J. S. A. Use of Steam Explosion Liquor from Sugar Cane Bagasse for Lignin Peroxidase Production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 98, n. 100, p. 289–300, 2002.

FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaraii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, n. 2, p. 335–339, 1999.

FERREIRA, J. A. et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334–345, 2016.

FRANKLAND, J. C. Fungal succession - Unravelling the unpredictable. **Mycological Research**, v. 102, n. 1, p. 1–15, 1998.

FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A.; PERDIH, A. Mixed culture of *Aspergillus awamori* and *Trichoderma reesei* for bioconversion of apple distillery waste. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 299–303, 1987.

FUJIAN, X.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Solid-state production of lignin peroxidase (lip) and manganese peroxidase (mnp) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. **Bioresource Technology**, v. 80, n. 2, p. 149–151, 2001.

GHOSH, S.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 10, p. 4283–4295, 2016.

GRATTEPANCHE, F. et al. Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. **Dairy Science and Technology**, v. 88, n. 4–5, p. 421–444, 2008.

GRIVET, L. et al. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 2, n. 0, p. 9–17, 2004.

GUTIERREZ-CORREA, M. et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 173–178, 1999.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENGERDY, R. P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665–667, 1997.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENGERDY, R. R. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 45–47, 1998.

HARRIS, R. Z. et al. The catalytic site of manganese peroxidase: Regiospecific addition of sodium azide and alkylhydrazines to the heme group. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 14, p. 8751–8758, 1991.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 80, n. 5, p. 204–214, 2004.

HOCQ, L.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, V. Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 20–29, 2017.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564–573, 2012.

HÖFTE, H.; VOXEUR, A. Plant cell walls. **Current Biology**, v. 27, n. 17, p. R865–R870, 2017.

HU, H. L. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 248–252, 2011.

HU, J. et al. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2013.

HYMERY, N. et al. Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 437–456, 2014.

JAGAVATI, S. et al. Cellulase Production by Co-Culture of *Trichoderma* sp. and *Aspergillus* sp. under Submerged Fermentation. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 79–83, 2012.

JOHNSON, K. L. et al. Cell wall biomechanics: a tractable challenge in manipulating plant cell walls “fit for purpose”! **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 163–171, 2017.

JOURDIER, E. et al. Proximity ligation scaffolding and comparison of two *Trichoderma reesei* strains genomes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017.

JUHÁSZ, T. et al. Production of b-glucosidase in mixed culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 49–53, 2003.

JUNGMEIER, G.; HINGSAMER, M.; VAN REE, R. **Biofuel-driven Biorefineries: A selection of the most promising biorefinery concepts to produce large volumes of road transportation biofuels by 2025**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.nachhaltigwirtschaften.at/resources/iea_pdf/iea_task_42_biofuel_drive%0An_biorefineries_lr.pdf>.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137–145, 2004.

KARLSSON, J. et al. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 63–78, 2002.

KHINDARIA, A.; YAMAZAKI, I.; AUST, S. D. Veratryl Alcohol Oxidation by Lignin Peroxidase. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16860–16869, 1995.

KIRK, T. K. Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465–505, 1987.

KOLASA, M. et al. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RUT-C30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 143–148, 2014.

KUBICEK, C. P.; KUBICEK, E. M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 35, p. 51–57, 2016.

KULASINSKI, K. et al. A comparative molecular dynamics study of crystalline, paracrystalline and amorphous states of cellulose. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1103–1116, 2014.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247–250, 1984.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAGAERT, S. et al. β -Xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 316–332, 2014.

LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 4, p. 345–363, 2005.

LATARULLO, M. B. G. et al. Pectins, Endopolygalacturonases, and Bioenergy. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. September, p. 1–7, 2016.

LEITE, D. C. C. **Regulação da degradação da parede celular durante a formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

LICHIUS, A. et al. Genome sequencing of the *Trichoderma reesei* QM9136 mutant identifies a truncation of the transcriptional regulator XYR1 as the cause for its cellulase-negative phenotype. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–20, 2015.

LIGUORI, R.; FARACO, V. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. **Bioresource Technology**, 2016.

MACIEL, G. M. et al. Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 183–189, 2008.

MADAMWAR, D.; PATEL, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 183–186, 1992.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 695–700, 2004.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553–560, 2008.

MCINERNEY, M. J.; SIEBER, J. R.; GUNSALUS, R. P. Syntrophy in Anaerobic Global Carbon Cycles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 623–632, 2010.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MOLLA, A. H. et al. In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 849–856, 2001.

MONCLARO, A. V.; FILHO, E. X. F. Fungal lytic polysaccharide monoxygenases from family AA9: Recent developments and application in lignocellulose breakdown. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 771–778, 2017.

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5205–5214, 2016.

MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; TSANG, A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: From dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monoxygenase family. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 471–481, 2014.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian journal of microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1119–27, 2011.

O'BRIEN, H. E. et al. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, 2005.

OKEKE, B. C. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High B-Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1581–1598, 2014.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 244–263, 2007.

PEL, H. J. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221–231, 2007.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–91, jun. 2005.

RABELLO, G. C. et al. Simultaneous biosynthesis of biomass-degrading enzymes using co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 4, p. 236–243, 2014.

RAHIKAINEN, J. L. et al. Cellulase-lignin interactions-The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 5, p. 315–321, 2013.

RICKLEFS, R. E. Species interactions. In: **The Economy of Nature**. 6. ed. New York, NY: W. H. Freeman and Company, 2006. p. 287–299.

ROBINSON, J. M. Lignin, land plants, and fungi: Biological evolution affecting Phanerozoic oxygen balance. **Geology**, v. 15, n. July, p. 607–610, 1990.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SANT'ANNA, C. et al. Sugarcane cell wall structure and lignin distribution investigated by confocal and electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 8, p. 829–834, 2013.

SARKAR, P.; BOSNEAGA, E.; AUER, M. Plant cell walls throughout evolution: Towards a molecular understanding of their design principles. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 13, p. 3615–3635, 2009.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SCORE, A. J.; PALFREYMAN, J. W.; WHITE, N. A. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 39, n. 2–3, p. 225–233, 1997.

SHARMA, K.; DHILLON, A.; GOYAL, A. Insights into structure and reaction mechanism of β -mannanases. **Current protein & peptide science**, v. 19, n. 1, p. 34–47, 2018.

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: Sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 45–60, 2012.

SHCHEGOLKOVA, N. M. et al. Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–15, 2016.

SHEARER, C. A. Fungal competition. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. 1259–1264, 1995.

SHUKLA, L. et al. Syntrophic microbial system for ex-situ degradation of paddy straw at low temperature under controlled and natural environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 30–37,

2016.

SILVA, C. G. et al. Microbial biofuel production: An overview on recent developments. In: GUPTA, V. K. et al. (Eds.). . **Microbial Applications: Recent Advancements and Future Developments**. 1. ed. Berlin: de Gruyter, 2016. p. 237–267.

SILVA, C. O. G. et al. Sugarcane Bagasse Hydrothermal Pretreatment Liquors as Suitable Carbon Sources for Hemicellulase Production by *Aspergillus niger*. **Bioenergy Research**, *in press*.

SILVA, C. O. G.; FILHO, E. X. F. A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. **Bioenergy Research**, v. 10, n. 2, p. 592–602, 2017.

SILVA, C. O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. 1–13, 2017.

SINGHANIA, R. R. et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013.

SINGHANIA, R. R. et al. Cellulases. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (Eds.). . **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2017. p. 73–101.

SIQUEIRA, F. G. DE; FILHO, E. X. F. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. June 2017, p. 54–60, 2010.

SLINKER, B. K. The statistics of synergism. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 30, n. 4, p. 723–731, 1998.

SMID, E. J.; LACROIX, C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 148–154, 2013.

SPRIBILLE, T. et al. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. **Science**, 2016.

STAHL, P. D.; CHRISTENSEN, M. In vitro mycelial interactions among members of a soil microfungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 309–316, 1992.

TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 447–453, 2014.

TATARKO, M.; BUMPUS, J. A. Further studies on the inactivation by sodium azide of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 339, n. 1, p. 200–209, 1997.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods in Enzymology**, v. 161, n. 1985, p. 238–249, 1988.

TIUNOV, A. V.; SCHEU, S. Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity-functioning relationships in laboratory fungal communities. **Ecology Letters**, v. 8, n. 6, p. 618–625, 2005.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. A bioeletricidade da cana em números. p. 1–6, 2016.

VAHERI, M.; LEISOLA, M.; KAUPPINEN, V. Transglycosylation products of cellulase system of *Trichoderma reesei*. **Biotechnology Letters**, v. 1, n. 41, p. 41–46, 1979.

VAN DER WAL, A. et al. A thready affair: Linking Fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 4, p. 477–494, 2013.

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VITIKAINEN, M. et al. Array comparative genomic hybridization analysis of *Trichoderma reesei* strains with

- enhanced cellulase production propertie. **BMC Genomics**, v. 11, n. 441, p. 16, 2010.
- WENG, J.-K. et al. Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering plants. **The Plant cell**, v. 22, n. 4, p. 1033–1045, 2010.
- WENG, J.-K.; CHAPPLE, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. **New phytologist**, v. 187, n. 2, p. 273–285, 2010.
- WERNER, S.; POLLE, A.; BRINKMANN, N. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8651–8665, 2016.
- WONG, D. W. S. **Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes**. [s.l: s.n.]. v. 157
- WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87–112, 1988.
- YANG, R. et al. Saccharification of pumpkin residues by coculturing of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Phanerochaete chrysosporium* burdsall with delayed inoculation timing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 9192–9199, 2013.
- ZAMIL, M. S.; GEITMANN, A. The middle lamella - More than a glue. **Physical Biology**, v. 14, n. 1, 2017.
- ZAPALSKI, M. K. Is absence of proof a proof of absence? Comments on commensalism. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 302, n. 3–4, p. 484–488, 2011.