



UnB

Universidade de Brasília

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

Instituto de Biologia

**Caracterização enzimática do co-cultivo entre
Aspergillus brasiliensis e *Trichoderma reesei* RUT-
C30**

Guilherme Bento Sperandio

Orientador: Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Brasília, dezembro de 2022



UnB

**Caracterização enzimática do co-cultivo entre
Aspergillus brasiliensis e *Trichoderma reesei* RUT-
C30**

Guilherme Bento Sperandio

Orientador: Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

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

Brasília, dezembro de 2022

**Caracterização enzimática do co-cultivo entre
Aspergillus brasiliensis e *Trichoderma reesei* RUT-
C30**

Guilherme Bento Sperandio

Banca examinadora:

Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues

Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale

Prof. Dr. Helder Andrey Rocha Gomes

Suplente: Dra. Maria Carolina de Andrade

Apoio Financeiro

Este projeto foi financiado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF, Pronex).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho por ter me acolhido em seu laboratório. Agora, com a finalização do doutorado, vão-se 8 ou 9 anos de parceria, já nem me lembro mais!

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 minha namorada Maria Clara pelo carinho, paciência e companheirismo.

Agradeço aos membros da banca, Dra. Dasciana, Dr. Helson e Dr. Helder, por dedicarem seu tempo, nosso bem mais precioso, à leitura e elaboração de contribuições construtivas ao meu trabalho. Gratidão!

Um agradecimento especial aos colegas passados e presentes do laboratório de enzimologia: Helder, Caio, Babi, Raissa, Andreza, Carol, Leonora, Antonielle, Jéssica(s), Raul, Tayná e Rafael. Todos vocês contribuíram intelectual ou emocionalmente para esse trabalho!

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.

Agradeço a Taisa, Guilherme e Professor Dr. Robert, do laboratório de interação planta-patógeno pelas valiosas contribuições no último ano e no auxílio na identificação das cepas.

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

Agradeço a todos os meus amigos que souberam ouvir um “não” quando eu não podia estar com eles pois fungos não entendem o conceito de “final de semana”. A vida adulta é difícil. Grato pela paciência e não desistam de mim.

OBRIGADO!

Sumário

Lista de Tabelas	9
Lista de Figuras	9
Resumo	11
Abstract.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
As Biorrefinarias e a Bioeconomia Circular.....	15
A Cana-de-açúcar	19
A Parede Celular Vegetal (PCV).....	21
Celulose.....	22
Hemicelulose.....	24
Pectinas	26
Lignina	27
PCV da cana-de-açúcar.....	28
Holocelulases	30
Celulases	30
Xilanases.....	32
Pectinases.....	34
β -galactosidase.....	36
Mananases.....	36
Fungos saprofiticos	37
Interações microbianas, co-cultivos fúngicos e a interação fungo-fungo.....	39
OBJETIVOS.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
Cepas utilizadas	41
Fonte de Carbono e Meio de Cultura.....	41

Identificação Molecular dos Fungos Filamentosos	41
Extração de DNA	42
Amplificação e sequenciamento	42
Crescimento em Placa, Contagem de Esporos e Inoculação	43
Curva de Indução Enzimática	44
Avaliação do Efeito do Tempo de Colonização	44
Ensaio Enzimáticos	45
Determinação da Concentração de Proteínas e Atividade Específica	47
Efeito da Temperatura	47
Efeito do pH.....	47
Gel de Eletroforese	48
Experimentos de Sacarificação.....	48
Design Experimental, Análise Estatística e Programas Utilizados.....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
Caracterização do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> cultivado em bagaço de cana-de-açúcar	49
Caracterização do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de <i>A. brasiliensis</i>	52
Caracterização do efeito do pH sobre a atividade enzimática de <i>A. brasiliensis</i>	55
Concentração de proteínas e atividade específica de <i>A. brasiliensis</i>	55
Experimentos de sacarificação.....	56
Co-cultivos entre <i>A. brasiliensis</i> e <i>T. reesei</i> RUT-C30	58
Curvas de Indução Enzimática e Avaliação do Efeito do Tempo de Colonização.....	58
Efeito da temperatura na atividade enzimática dos co-cultivos.....	63
Efeito do pH na atividade enzimática dos co-cultivos.....	68
Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pelos extratos brutos dos co-cultivos fúngicos	70
Gel de eletroforese SDS-PAGE	73

Perspectivas futuras e Conclusão	74
ANEXO I.....	77
ANEXO II	78
Referências Bibliográficas.....	79

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição percentual das hemiceluloses mais comuns em dicotiledôneas, gramíneas e coníferas.....	25
Tabela 2 - Primers utilizados para identificação molecular de <i>T. reesei</i> RUT-C30 e <i>A. brasiliensis</i>	43
Tabela 3 – Configurações dos monocultivos e co-cultivos utilizados no trabalho, incluindo os experimentos de intervalo de inoculação entre os fungos.	45
Tabela 4 – Compilação das atividades (UI/mL) apresentadas por <i>A. brasiliensis</i> quando cultivado em meio líquido com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e as respectivas atividades específicas.	56

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferentes estágios de biorrefinarias e suas respectivas características.....	16
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.....	17
Figura 3 - Produção mundial de cana-de-açúcar em toneladas..	20
Figura 4 - Organização geral da parede celular vegetal.....	22
Figura 5 - Estrutura da celulose e sua organização em microfibrilas..	23
Figura 6 - Representações computacionais das fases cristalina (a), paracristalina (b) e amorfa (c) da celulose..	23
Figura 7 - Polissacarídeos hemicelulósicos mais comuns. “Fer” representa esterificações com ácido ferúlico..	25
Figura 8 - Esquematização estrutural dos polímeros de celulose, hemicelulose e pectina, com suas respectivas variações e monossacarídeos constituintes..	26
Figura 9 - Estrutura geral da lignina incluindo seus monolignóis precursores.....	28
Figura 10 - Principais tipos de celulasas e sua forma de atuação na cadeia celulósica..	30
Figura 11 - Esquematização de uma porção da cadeia de xilana e de algumas enzimas xilanolíticas que atuam sobre a mesma.....	33
Figura 12 - Modo de ação de alguns grupos de enzimas pectinolíticas.....	35
Figura 13 - <i>Print Screen</i> do buscador Google tendo <i>Aspergillus brasiliensis</i> como objeto de pesquisa.....	38

Figura 14 - Atividades enzimáticas de <i>A. brasiliensis</i> ao longo de nove dias em meio líquido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono..	50
Figura 15 - Atividades enzimáticas de <i>A. brasiliensis</i> sobre substratos sintéticos ao longo de nove dias em meio líquido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono..	51
Figura 16 – Caracterização do efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas de <i>A. brasiliensis</i> ..	54
Figura 17 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática de CMCase produzida por <i>A. brasiliensis</i> crescido em bagaço de cana-de-açúcar.....	55
Figura 18 – Absorbância em 540 nm após experimento de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pelo extrato bruto de <i>A. brasiliensis</i>	57
Figura 19 – Perfil das atividades enzimáticas (em UI/mL) testadas em substratos naturais, obtidas ao longo de 9 dias pelos mono e co-cultivos de <i>A. brasiliensis</i> e <i>T. reesei</i> RUT-C30 crescidos em meio líquido com bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono.	58
Figura 20 - Perfil das atividades enzimáticas (em UI/mL) testadas em substratos sintéticos, obtidas ao longo de nove dias pelos mono e co-cultivos de <i>A. brasiliensis</i> e <i>T. reesei</i> RUT-C30 crescidos em meio líquido com bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono..	61
Figura 21 - Influência da temperatura sobre a atividade enzimática dos extratos brutos dos monocultivos de <i>A. brasiliensis</i> , <i>T. reesei</i> RUT-C30 e seus co-cultivos simultâneos e com diferentes tempos de inoculação..	64
Figura 22 – Efeito do pH na atividade CMCase de diferentes mono e co-cultivos de <i>A. brasiliensis</i> e <i>T. reesei</i> RUT-C30.....	69
Figura 23 – Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar não pré-tratado por mono e co-cultivos de <i>A. brasiliensis</i> e <i>T. reesei</i> RUT-C30... ..	70
Figura 24 – Gel SDS-PAGE com os perfis proteicos dos monocultivo e co-cultivos entre <i>A. brasiliensis</i> e <i>T. reesei</i> RUT-C30.....	73

Resumo

Biorrefinarias lignocelulósicas são conceitos industriais sustentáveis que utilizam resíduos agrícolas como matéria-prima para produção de produtos de maior valor agregado como biocombustíveis e químicos de base. Um dos custos das biorrefinarias são as enzimas necessárias para desconstruir a parede celular vegetal em açúcares fermentescíveis. Essas enzimas são obtidas de fontes microbianas como fungos filamentosos. O padrão atual da indústria de coquetéis enzimáticos é o monocultivo fúngico. Essa técnica produz coquetéis limitados, pois, nenhum organismo é capaz de secretar todas as enzimas necessárias em quantidades suficientes. Uma alternativa a ser explorada é simular a degradação de matéria orgânica que ocorre na natureza e utilizar mais de um fungo filamentoso na produção enzimática na prática denominada de co-cultivo. Neste trabalho, foi realizada a caracterização enzimática de *Aspergillus brasiliensis* e avaliado seu co-cultivo com o fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Os coquetéis enzimáticos resultantes foram caracterizados quanto ao efeito do tempo de inoculação das cepas e os efeitos de pH e temperatura nas atividades enzimáticas. Os resultados mostram que o perfil de cada extrato enzimático é altamente dependente do tipo de cultivo e da ordem com que os fungos participantes foram inoculados. Alguns dos co-cultivos, dentro de certas condições, atingiram maiores atividades que seus respectivos monocultivos para enzimas como CMCase, pectinase, β -glicosidase e β -xilosidase.

Palavras-chave: co-cultivos, enzimas fúngicas, biorrefinarias;

Abstract

Lignocellulosic biorefineries are sustainable industrial facilities that use agricultural waste as raw material to produce higher value-added products such as biofuels and chemical “building-blocks”. One of the major costs of biorefineries is the enzymes needed to break down the plant cell wall into fermentable sugars. These enzymes are obtained from microbial sources such as filamentous fungi. The current industry standard for enzyme production are fungal monocultures. This technique produces limited cocktails, as no organism is capable of secreting all the necessary enzymes in sufficient quantities. An alternative to be explored is to simulate the degradation of organic matter that occurs in nature and to use more than one filamentous fungus in the enzymatic production, a practice called co-cultivation. In this work, the enzymatic characterization of *Aspergillus brasiliensis* was performed and its co-cultivation with the fungus *Trichoderma reesei* RUT-C30 was evaluated using sugarcane bagasse as carbon source. The resulting enzymatic cocktails were characterized regarding the effect of strain inoculation time and the effects of pH and temperature on enzymatic activities. The results show that the profile of each enzymatic extract is highly dependent on the type of culture and the order in which the participating fungi were inoculated. Some of the co-cultures, under certain conditions, reached higher activities than their respective monocultures for enzymes such as CMCase, pectinase, β -glucosidase and β -xylosidase.

Keywords: co-cultures, fungal enzymes, biorefineries;

INTRODUÇÃO

Biorrefinarias lignocelulósicas são conceitos de plantas industriais capazes de produzir diversos bens de consumo como biocombustíveis e químicos de base, utilizando resíduos agroindustriais de baixo valor agregado como matéria prima (KAMM; KAMM, 2004). As biorrefinarias são, portanto, uma das grandes apostas científicas no esforço de alavancar uma bioeconomia sustentável (*bio-based economy*) e que reduza ou elimine a dependência de combustíveis fósseis não renováveis e altamente poluentes.

Os resíduos agroindustriais, compostos por lignocelulose, precisam primeiramente ter seus polissacarídeos constituintes hidrolisados em açúcares fermentescíveis para viabilizar os processos subsequentes. Um dos maiores gargalos dessa indústria é o alto custo das enzimas necessárias para realizar a hidrólise supracitada (KUBICEK; KUBICEK, 2016).

A lignocelulose que compõe a parede celular vegetal pode ser dividida em 2 porções principais. Na porção holocelulósica tem-se os seguintes carboidratos: 1) fibras de celulose, um polímero rígido de glicose organizado linearmente 2) hemicelulose, uma estrutura complexa e heterogênea, que contém diversos polissacarídeos que podem ou não ser ramificados e que possuem grande variação de acordo com a espécie vegetal, e por fim 3) a pectina, composta por monômeros de ácido galacturônico (SIQUEIRA; FILHO, 2010). Além dos polissacarídeos supracitados a lignina também se faz presente. A lignina é uma rede de compostos fenólicos interligada às porções sacarídicas. Devido a sua estrutura não repetitiva e irregular, é um composto altamente resistente à desconstrução enzimática, sendo responsável por parte considerável da recalcitrância da parede celular 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 desafiador para as enzimas microbiológicas.

As enzimas hidrolíticas empregadas em biorefinarias geralmente são oriundas de fontes microbianas, sendo os fungos filamentosos os seus principais produtores industriais. O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* RUT-C30 é a cepa industrial mais utilizada produção de enzimas hidrolíticas comerciais. No entanto, o espectro de enzimas necessárias para a hidrólise completa dos resíduos lignocelulósicos é demasiadamente diverso para ser secretado por um único organismo. Mesmo a cepa RUT-C30 não secreta um coquetel enzimático completo, possuindo uma baixa produção de β -glicosidasas (OKEKE, 2014), quando comparado a sua capacidade de produzir outras hidrolases.

O reino *Fungi* agrega uma grande diversidade de organismos, possuindo atualmente cerca de 5.1 milhões de espécies estimadas (O'BRIEN *et al.*, 2005). No entanto, um número muito

inferior é atualmente conhecido e menos ainda são aqueles cultiváveis e com aplicações industriais sólidas.

A decomposição da recalcitrante matéria vegetal morta é realizada em ambientes naturais por uma diversa comunidade de microrganismos, dos quais os fungos filamentosos são os principais atores (VAN DER WAL et al., 2013). Não existe evidência da existência de um organismo capaz de degradar eficientemente a todas as porções lignocelulóticas sozinho. No entanto, nos processos industriais para a produção de enzimas lignocelulolíticas, o monocultivo é a técnica padrão, devido a este processo já estar bem estabelecido e ser mais simples de controlar. Por essa limitação de fontes enzimáticas, os coquetéis atuais necessitam ser enriquecidos com enzimas de outros fungos para atingirem níveis satisfatórios de hidrólise. Isso culmina em um dispendioso processo *downstream* que eleva consideravelmente os custos do produto.

Uma alternativa para obtenção de coquetéis enzimáticos mais diversos e completos sem necessidade de mesclar enzimas no processamento *downstream* é a utilização de co-cultivos fúngicos. Nesse sistema, dois ou mais fungos são crescidos simultaneamente, dividindo o mesmo aparato fermentativo. A cooperação, ou mais frequentemente o antagonismo, entre esses fungos faz com que certas atividades enzimáticas sejam aumentadas em relação aos seus monocultivos. Diversos estudos nesse sentido já foram publicados e compilados em uma publicação anterior (SPERANDIO; FILHO, 2019). No entanto, o campo de co-cultivos fúngicos para produção de enzimas lignocelulolíticas ainda é uma área largamente inexplorada dentro da microbiologia industrial.

O presente trabalho propõe a análise de co-cultivos fúngicos utilizando a cepa *T. reesei* RUT-C30 e *Aspergillus brasiliensis*, com o objetivo não só de produzir novas combinação de coquetéis enzimáticos, mas também caracterizar esses coquetéis. A caracterização de coquetéis enzimáticos resultantes dos co-cultivos é extremamente escassa na literatura científica internacional e esse trabalho objetiva-se a contribuir com novas informações nesse cenário.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As Biorrefinarias e a Bioeconomia Circular

Os combustíveis fósseis são atualmente a base de toda a cadeia produtiva mundial. No entanto, seu uso está atrelado a diversas consequências negativas por ser uma fonte energética não renovável e sua produção e uso causarem severos danos climáticos e poluentes (QIAO; QIAO, 2013). Pode-se definir este modelo econômico como sendo “linear” e o mesmo se mostra insustentável a longo prazo em sua atual conjuntura (LIGUORI; FARACO, 2016).

Uma alternativa possível a este modelo econômico é adoção de medidas que fomentem uma economia circular. Em uma economia circular, objetiva-se a execução dos 3 Rs: reduzir, reusar e reciclar (LIGUORI; FARACO, 2016). Nesta contraproposta de modelo econômico objetiva-se diminuir a poluição ambiental, escassez de recursos e diversos outros conflitos associados ao modelo linear (QIAO; QIAO, 2013). Dentro do contexto da economia circular, as biorrefinarias podem ser vistas como fundamentais no avanço deste modelo econômico.

O termo “biorrefinaria” comporta diferentes definições que podem ser ainda subdivididas a depender do tipo de biorrefinaria citada. Uma das definições mais abrangentes é fornecida pelo Departamento de Energia dos EUA (1997), que coloca a biorrefinaria como “uma unidade de processamento onde a biomassa pode ser convertida e extraída em um espectro de produtos de valor, baseando-se na refinaria petroquímica”.

Com o avanço das possibilidades produtivas das biorrefinarias, novas, e mais específicas, definições surgiram. Para a EMBRAPA Agroenergia (2011), uma 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”.

As biorrefinarias podem ainda ser classificadas em 3 diferentes estágios, que variam com seu estágio de desenvolvimento e flexibilidade de insumos e produtos (KAMM; KAMM, 2004). Em seu primeiro estágio, biorrefinarias geralmente usam grãos como matéria-prima e tem pouca ou nenhuma flexibilidade em seus processos, gerando sempre os mesmos produtos. No segundo estágio as biorrefinarias ainda possuem matérias-primas fixas, mas sua capacidade processual é expandida, podendo alterar seus produtos finais a depender das demandas do mercado. Em seu terceiro e último estágio, ocorre a flexibilização das matérias-primas que podem ser utilizadas. Além disso, a diversidade processual dessas instalações permite a fabricação de uma maior variedade de produtos (Figura 1).

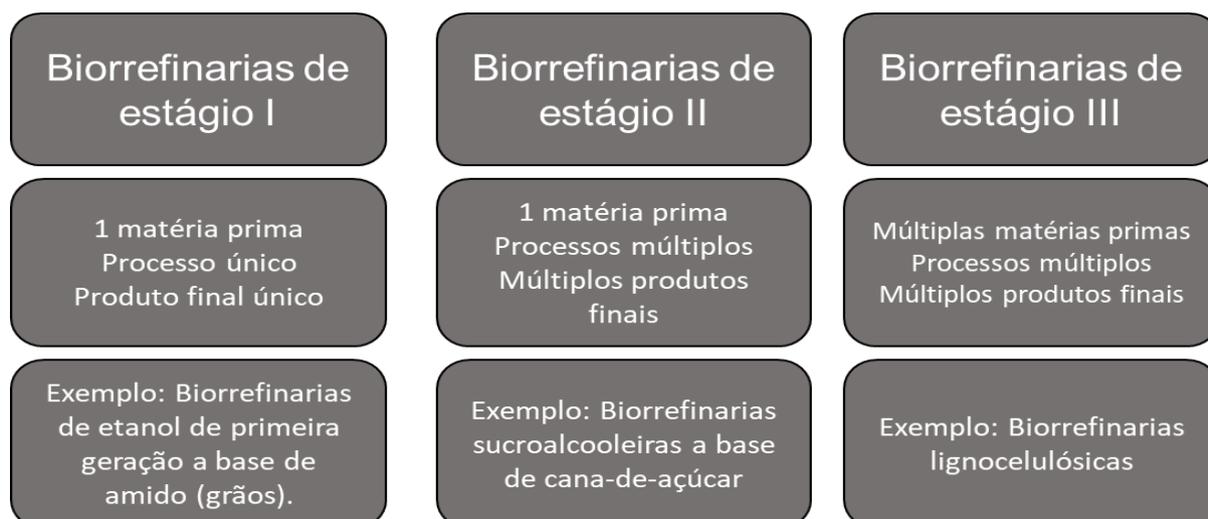


Figura 1 - Diferentes estágios de biorrefinarias e suas respectivas características. Definições extraídas de KAMM; KAMM (2004), imagem de autoria própria.

Neste trabalho, é destacada a importância de um dos tipos de refinaria de terceiro estágio: as biorrefinarias lignocelulósicas. Estas instalações utilizam matérias lignocelulósicas como matéria-prima para a produção de moléculas químicas de base (os chamados “*building blocks*”), biocombustíveis e energia. Uma vantagem operacional das biorrefinarias lignocelulósicas é o baixo custo relativo de sua matéria-prima e a compatibilidade de seus produtos finais com a já estabelecida economia linear baseada em combustíveis fósseis (KAMM; KAMM, 2004).

Outro atrativo referente às biorrefinarias lignocelulósicas se deve ao fato que sua principal matéria-prima é composta de resíduos. Estes resíduos lignocelulósicos agroindustriais possuem pouco ou nenhum valor comercial e podem ser reaproveitados nas biorrefinarias. O uso de resíduos também implica que não é necessário o aumento de áreas de plantio, diminuindo desgastes ambientais, sociais e políticos relacionados ao uso de terras agrícolas (HATTI-KAUL, 2010).

As biorrefinarias lignocelulósicas podem funcionar utilizando uma grande variedade de insumos como matéria-prima. Resíduos agroindustriais 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, bagaço de cana-de-açúcar e casca de soja, são todos exemplos de insumos capazes de alimentar uma biorrefinaria lignocelulósica (CORRÊA DO LAGO et al., 2012; FERREIRA et al., 2016; SILVA; VAZ; FILHO, 2017).

Uma série de etapas e processos é necessária para transformar resíduos agroindustriais em produtos de maior valor agregado (Figura 2). Primeiramente, os insumos devem ser

transportados à biorrefinaria. Ao chegar nas instalações, estes resíduos precisam passar por uma etapa chamada pré-tratamento. Os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos. O objetivo desta etapa é alterar as propriedades físico-químicas da lignocelulose, facilitando seu processamento por microrganismos e sua degradação enzimática. 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).

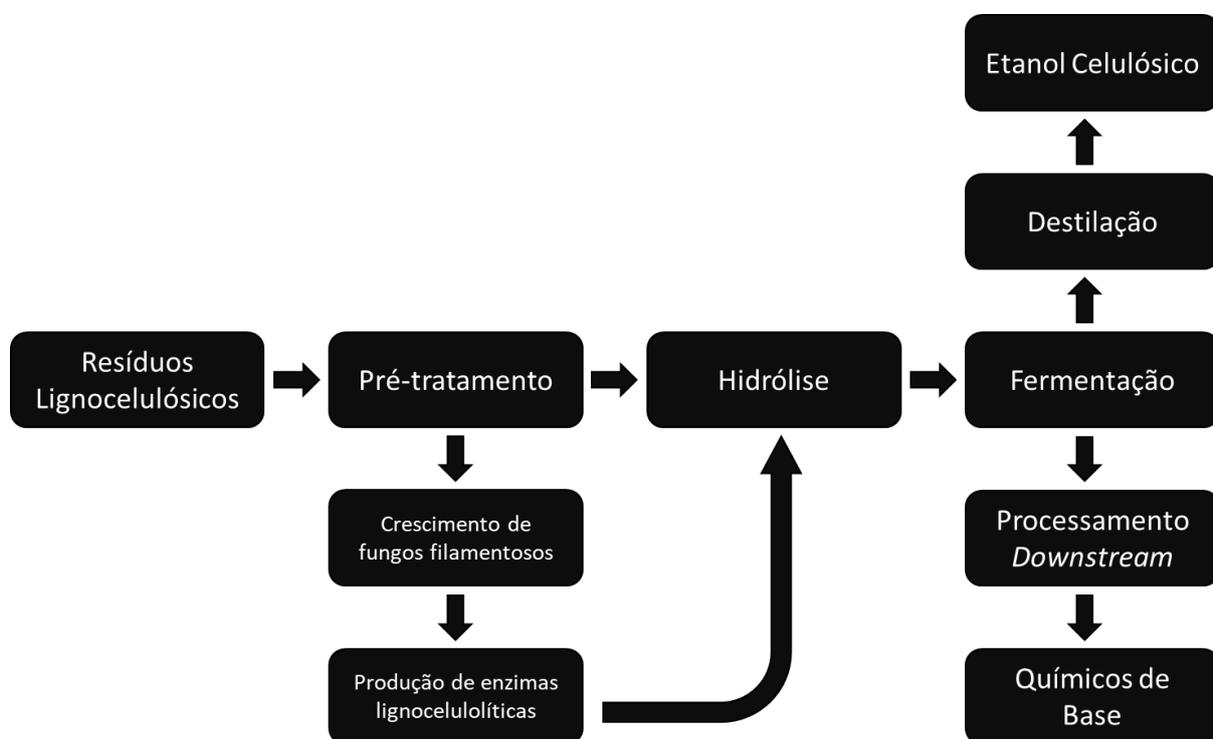


Figura 2 - Fluxograma simplificado do processo de biorrefino, incluindo a opção de produção local de enzimas lignocelulolíticas por fungos filamentosos que podem ser usadas na etapa de hidrólise. Fonte: autoria própria.

O pré-tratamento da biomassa também é vantajoso para a produção *in situ* de enzimas lignocelulolíticas. Já foi verificado que fungos filamentosos crescidos em fontes de carbono pré-tratadas possuem uma maior produção destas enzimas de interesse biotecnológico (SILVA; FILHO, 2017). Isso oferece uma importante opção comercial para as biorrefinarias, pois, permite economia na compra de enzimas de fornecedores externos, evita gastos com transporte e ainda possibilita a comercialização das enzimas para outras indústrias (ELLILÄ et al., 2017).

Após o pré-tratamento a biomassa é hidrolisada utilizando-se um coquetel de enzimas lignocelulolíticas e acessórias (enzimas que não desconstruem diretamente a parede celular vegetal, mas auxiliam neste processo). O objetivo desta etapa é desconstruir a parede celular vegetal ao seus monômeros constituintes, entre os quais destacam-se os açúcares fermentescíveis, que podem ser fermentados por microrganismos produzindo etanol ou químicos de base, por exemplo. As enzimas utilizadas, sua classificação, modo de ação e importância industrial serão discutidas em uma seção futura deste trabalho.

Em posse dos açúcares fermentescíveis, diferentes abordagens podem ser empregadas. Entre elas está a conversão dos açúcares à etanol de segunda geração ou a outros químicos de interesse industrial. Em ambos os casos, fungos da divisão Ascomycota são amplamente utilizados, seja pelo uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol ou de ascomicetos filamentosos como *A. niger* e *A. terreus* na produção de ácido cítrico e itacônico respectivamente (FERREIRA et al., 2016).

Considerando a produção de etanol celulósico, as biorefinarias já provaram sua efetividade em escalas laboratorial e em plantas piloto (PAVLENKO, 2018; SILVA; VAZ; FILHO, 2017). No entanto, sua real viabilidade comercial ainda é frágil. Na última década, diversas plantas comerciais de etanol celulósico foram implantadas, mas falharam em atingir suas projeções de produção e muitas encerraram suas atividades (PAVLENKO, 2018). Este cenário mostra a necessidade de mais pesquisas sobre este nicho tecnológico, visando o melhoramento de todas as suas etapas.

Quanto ao cenário nacional, o Brasil possui duas instalações que realizam a produção de etanol celulósico, sendo elas as biorrefinarias da GranBio e Raízen/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). De acordo com o relatório anual da Raízen, a empresa produziu 16,5 milhões de litros de etanol celulósico no ano-safra de 2018/2019 (RAÍZEN, 2019).

A Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é cultivada em diversos países devido aos seus caules ricos em sacarose, que pode ser extraída e utilizada para a produção de açúcar ou fermentada para fins energéticos (etanol combustível) ou para produção de bebidas alcoólicas. Quanto à produção de açúcar, cerca de 70% da produção é oriunda do cultivo de cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al., 2005).

O termo “cana-de-açúcar” é utilizado para se referir a espécies selvagens e domesticadas pertencentes ao gênero *Saccharum* (Poacea). Estudos moleculares apontam a Nova Guiné como centro de origem de diversificação da planta, onde surgiu o cultivar *S. officinarum* L., que ao ser hibridizado e extensivamente selecionado com *S. spontaneum* produziu muitos dos híbridos hoje utilizados na agricultura (GRIVET et al., 2004; LAKSHMANAN et al., 2005).

O Brasil tem extensa tradição no uso de tecnologias sucroalcooleiras derivadas do cultivo e processamento da cana-de-açúcar. Em 1975, visando diminuir a dependência nacional de combustíveis fósseis externos, foi lançado o programa Proálcool (HOFSETZ; SILVA, 2012). Desde então, o Brasil vem desenvolvendo diversas tecnologias de cultivo de cana-de-açúcar 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 cana-de-açúcar é a maior do mundo, com quase o dobro da produção anual da Índia, o segundo maior produtor (Figura 3). De acordo com os dados mais recentes disponíveis pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, o Brasil produziu cerca de 757 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em 2020, o correspondente a 40% da produção mundial (FAO, 2020). Alguns autores divergem ao tratar da quantidade da produção de cana-de-açúcar que acaba se tornando bagaço de cana. CORRÊA DO LAGO e colaboradores (2012), estimam que 14% da produção de cana-de-açúcar torna-se bagaço. Já HOFSETZ e SILVA (2012) calculam que este valor pode chegar a até 28%.

Quanto à sua composição, o bagaço de cana-de-açúcar é composto por cerca de 42% de celulose, 25% de hemicelulose e 23% de lignina (ALVES et al., 2010). Logo, a cana-de-açúcar e seus produtos residuais como o bagaço de cana, são matérias primas abundantes e possuem grande potencial para serem exploradas no Brasil como insumos de biorrefinarias lignocelulósicas.

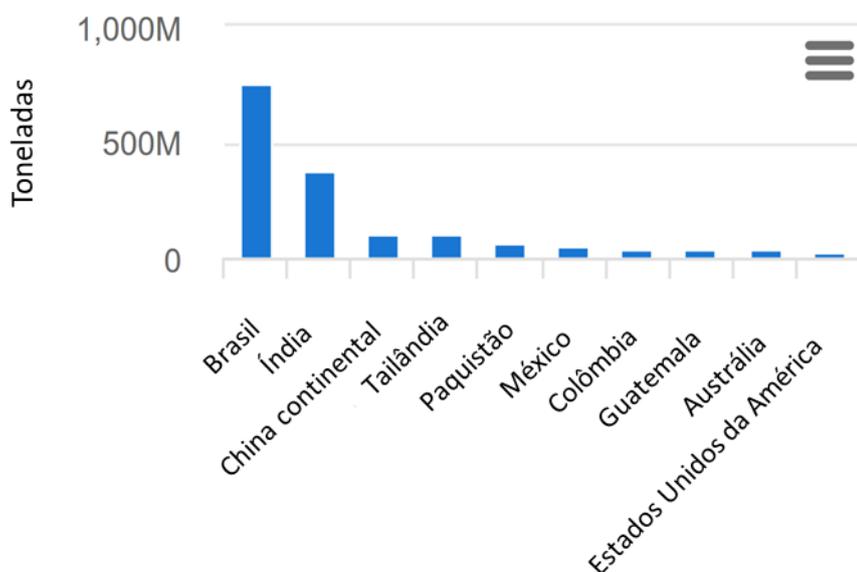


Figura 3 - Produção mundial de cana-de-açúcar em toneladas. Dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* para 2019.

Considerando a produção de etanol, o Brasil produziu mais de 33 bilhões de litros na safra 2018/2019, distribuídos por mais de 410 usinas sucroalcooleiras (NOVACANA, 2020; UNICA, 2019). Portanto, o cenário mais aceito para a inserção de biorrefinarias lignocelulósicas em território nacional é que elas sejam acopladas às refinarias sucroalcooleiras já existentes. 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 instalações 2G isoladas.

O destino mais comum do bagaço de cana-de-açúcar produzido nas usinas é a queima para a produção de vapor e energia elétrica (bioeletricidade), que é usada na própria usina. A colheita da cana-de-açúcar coincide com os períodos de seca, onde a produtividade hidrelétrica é baixa e os preços da eletricidade aumentam. Logo, existe grande incentivo para que o bagaço de cana seja queimado e transformado em bioeletricidade neste período. O baixo e instável preço pago pela energia desestimula o investimento na produção de bioeletricidade para fornecimento externo por parte do setor sucro-alcooleiro, apesar de algumas usinas venderem seu excedente para a rede elétrica (CARPIO; DE SOUZA, 2017; HOFSETZ; SILVA, 2012; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2016).

Percebe-se então um conflito entre a utilização do bagaço de cana-de-açúcar para a geração de bioeletricidade ou para usos diversos dentro de uma biorrefinaria de terceira geração. Ao considerar, por exemplo, a produção de etanol celulósico, dois fatores são determinantes na escolha dessa destinação: (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). Sendo assim, modelos devem ser elaborados calculando como melhor administrar o bagaço de cana disponível.

CORRÊA DO LAGO et al. (2012) elaborou um modelo que comporta o uso de parte do bagaço na produção de bioenergia (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. Outro modelo, desenhado por CARPIO e de SOUZA (2017), vislumbra a produção mista entre bioeletricidade e produção de etanol 2G, estimando 84% de alocação de bagaço para produção do último. CARPIO e de SOUZA (2017) justificam o maior investimento na produção de etanol celulósico dadas às projeções de grande demanda pelo combustível devido à disseminação dos veículos *flex-fuel* no país e a atual mistura brasileira de 27% de etanol na gasolina.

A Parede Celular Vegetal (PCV)

Uma das características mais marcantes do reino *Plantae* é a parede celular vegetal (PCV). A PCV compõe cerca de 50% do peso total da planta e tem suma importância para a classificação botânica, biologia, evolução e inclusive para as aplicações biotecnológicas da matéria vegetal (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010).

Diversos setores comerciais dependem diretamente das propriedades e composição das PCVs para seus processos, podendo ser aqui destacadas as indústrias têxtil, madeireiras, do papel e, mais recentemente, as biorrefinarias lignocelulósicas (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010).

A composição da PCV é fortemente marcada pela presença de carboidratos e compostos fenólicos, sendo que ambas as moléculas compõem 90% da PCV enquanto as proteínas compõem os 10% restantes (HÖFTE; VOXEUR, 2017). Essa característica é evolutivamente coerente com a abundante disponibilidade de carbono disponível às plantas (por serem organismos fotossintéticos) e pela relativa baixa presença de nitrogênio e enxofre (ambos cruciais para a síntese proteica) adquiridos no solo em relação ao carbono (HÖFTE; VOXEUR, 2017; SARKAR; BOSNEAGA; AUER, 2009).

A PCV pode ser encontrada em duas composições distintas, sendo elas a parede primária e a parede secundária. Tais organizações variam sua presença de acordo com a fase de desenvolvimento do tecido observado e com o tipo de célula em questão. A parede primária é encontrada nos tecidos em crescimento. Sua composição mais flexível permite a expansão do protoplasma interno enquanto sustenta a pressão exercida por tal crescimento e por choques mecânicos externos (JOHNSON et al., 2017). A flexibilidade da parede primária permite que diferentes tecidos vegetais possuam células com formas e tamanhos variados. A parede celular secundária é mais grossa, com camadas depositadas internamente à parede primária e com um alto teor de lignina, tornando-as células mais inflexíveis e também impermeáveis (JOHNSON et al., 2017).

Apesar de possuírem diferenças marcantes, tanto a parede celular primária como a secundária obedecem a uma mesma estrutura básica conservada, apresentada na Figura 4. Essa estrutura básica 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).

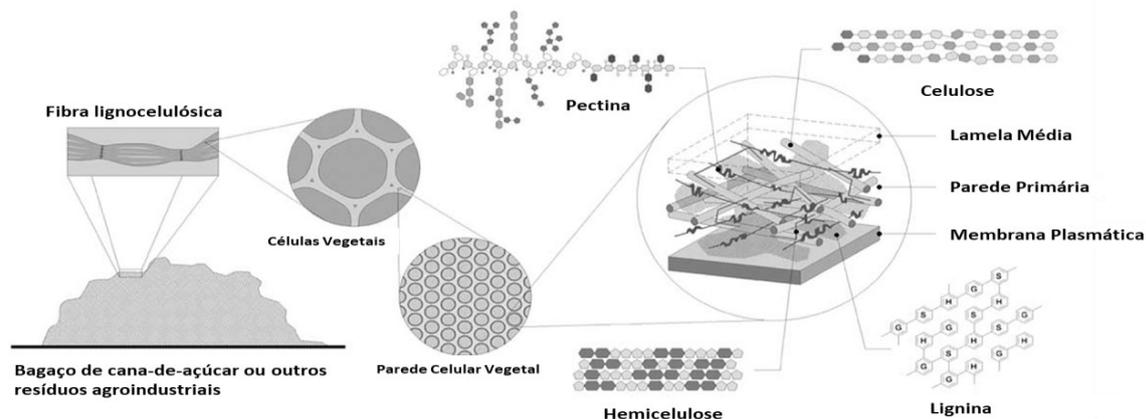


Figura 4 - Organização geral da parede celular vegetal. Extraído e modificado de SIQUEIRA e FILHO (2010).

Celulose

A celulose é um polímero linear constituído de monômeros de glicose, unidos entre si por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4). Essas cadeias lineares são sintetizadas em paralelo por um complexo enzimático denominado celulose sintase, imerso na membrana plasmática da célula vegetal (COSGROVE, 2014). As cadeias de celulose produzidas são organizadas em microfibrilas (Figura 5) cujo comprimento é altamente variado e ainda incerto (COSGROVE, 2014).

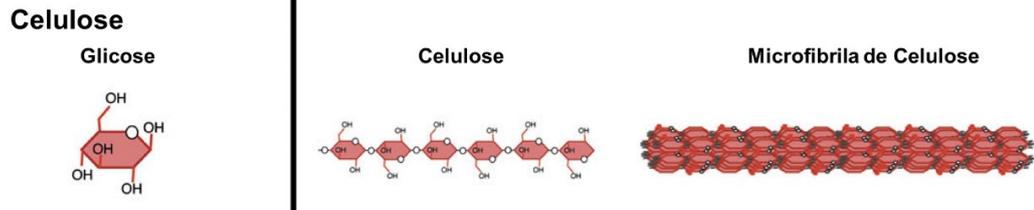


Figura 5 - Estrutura da celulose e sua organização em microfibrilas. Extraído e modificado de SARKAR, BOSNEAGA e AUER (2009).

Atualmente, o modelo mais aceito estima que cerca de 18 cadeias de celulose, organizadas em formato hexagonal, compõem uma microfibrila (COSGROVE, 2014; HÖFTE; VOXEUR, 2017). Esta estrutura hexagonal básica com 18 cadeias de celulose é denominada microfibrila fundamental e sua espessura é estimada em aproximadamente 3 nm (HÖFTE; VOXEUR, 2017). Os monômeros de glicose envolvidos na formação das fibras celulósicas se organizam de forma a criar duas superfícies distintas. Uma superfície hidrofílica na porção superior e inferior do hexágono e uma superfície hidrofóbica nas laterais, onde ocorre interação entre as cadeias apolares dos carboidratos. Esta configuração anfifílica parece ter relações importantes com a arquitetura da PCV (HÖFTE; VOXEUR, 2017).

A celulose apresenta ainda duas configurações conformacionais de grande relevância para a recalcitrância da fibra: as porções amorfas e cristalinas. As porções amorfas são pouco organizadas e direcionais, o que resulta em maior facilidade à desconstrução e, portanto, menos recalcitrância. Em oposição, a porção cristalina é altamente direcional e organizada, criando uma estrutura resistente e altamente recalcitrante (KULASINSKI et al., 2014). A Figura 6 abaixo exibe uma simulação computacional das fases e de sua fase de transição, a celulose paracristalina.

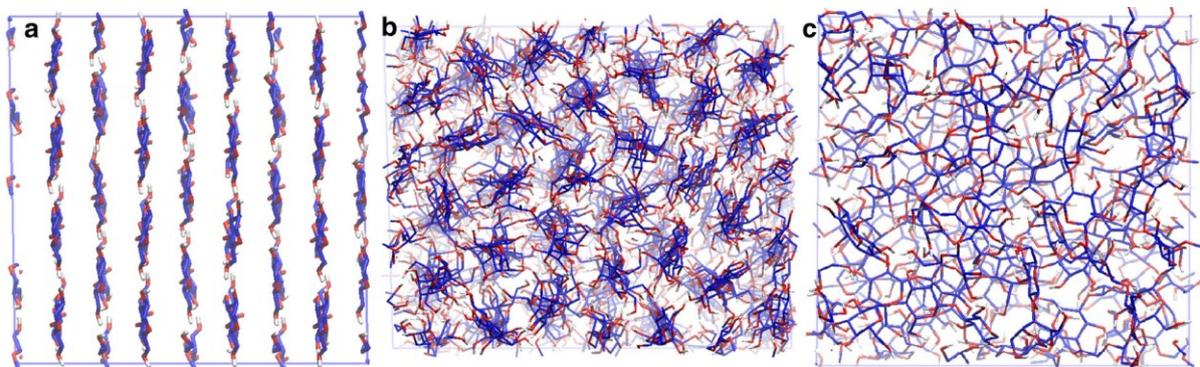


Figura 6 - Representações computacionais das fases cristalina (a), paracristalina (b) e amorfa (c) da celulose. Extraído de KULASINSKI et al. (2014).

Hemicelulose

A hemicelulose não é um único polímero, mas sim, uma coleção variada de diferentes cadeias polissacarídicas não celulósicas, que formam uma matriz com características gelatinosas que interage diretamente com as microfibrilas de celulose (SAHA, 2003). A hemicelulose é a segunda maior porção polissacarídica da PCV (sendo a celulose a mais abundante). Este conjunto de polissacarídeos compõe entre 20 a 35% da PCV (SAHA, 2003), sendo as xilanas os polissacarídeos hemicelulósicos mais abundantes em geral.

Xilanas são polissacarídeos compostos por uma cadeia principal de D-xilose unida por ligações β -(1 \rightarrow 4). Essa cadeia principal pode, ou não, 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 relevante é a manana, constituída de resíduos de D-manose também unidos por ligação β -(1 \rightarrow 4). 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 que alterna entre resíduos de manose e glicose e que podem, ou não, ser ramificadas com resíduos de galactose (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). A Figura 7 ilustra as estruturas das principais cadeias hemicelulósicas.

Uma diferença marcante entre a celulose e a hemicelulose é que enquanto a primeira é relativamente conservada em todos os vegetais, a última é altamente variável entre espécies. A hemicelulose é tão distinta entre os grupos que a mesma é um critério de classificação para diferenciar paredes primárias dos Tipos I e II. Paredes do Tipo I são encontradas em gimnospermas, dicotiledôneas e monocotiledôneas não comelinídeas, sua principal característica é a abundância dos xiloglicanos (XyG) e pectinas em 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 a Figura 7 abaixo mostram respectivamente a quantidade de componentes hemicelulósicos encontrados em diferentes plantas e as 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	Dicotiledônias		Gramíneas		Coníferas	
	Primária	Secundária	Primária	Secundária	Primária	Secundária
Xiloglicanos	20-25	Mínimo	2-5	Mínimo	10	- ^b
Glicuronoxilana	-	20-30	-	-	-	-
Glicuronoarabinoxilana	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).

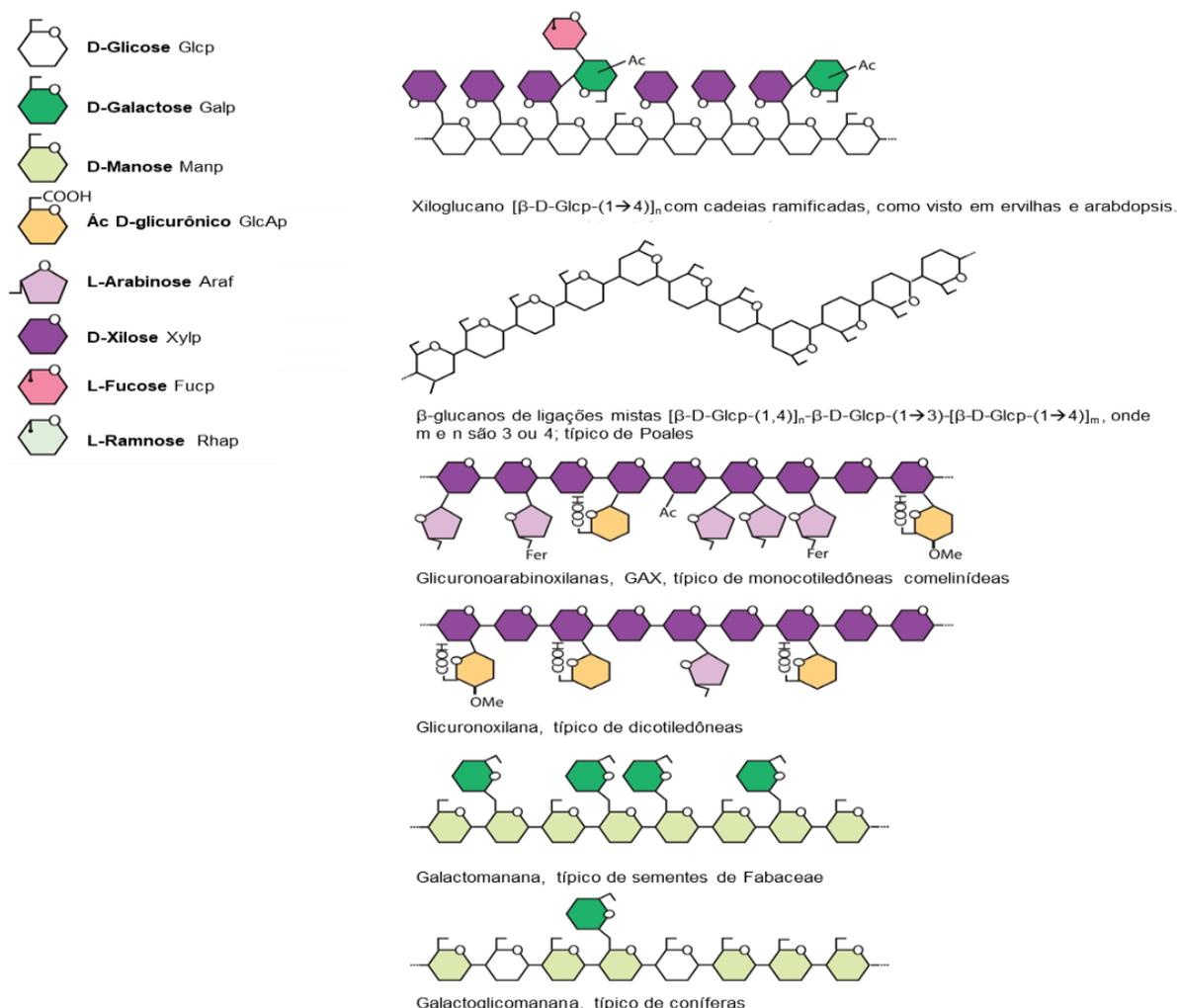


Figura 7 - Polissacarídeos hemicelulósicos mais comuns. “Fer” representa esterificações com ácido ferúlico. Extraído e adaptado de SCHELLER e ULVSKOV (2010).

Pectinas

As 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). A pectina também atua 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).

A pectina tem uma classificação diferenciada, sendo classificada em “domínios”. Os domínios da pectina são regiões ao longo da cadeia principal que podem ser diferenciadas com base em sua composição química. Os 4 domínios macromoleculares principais são as homogalacturonanas, as ramnogalacturonanas I, as ramnogalacturonanas II e as xilogalacturonanas (HOCQ; PELLOUX; LEFEBVRE, 2017, Figura 8).

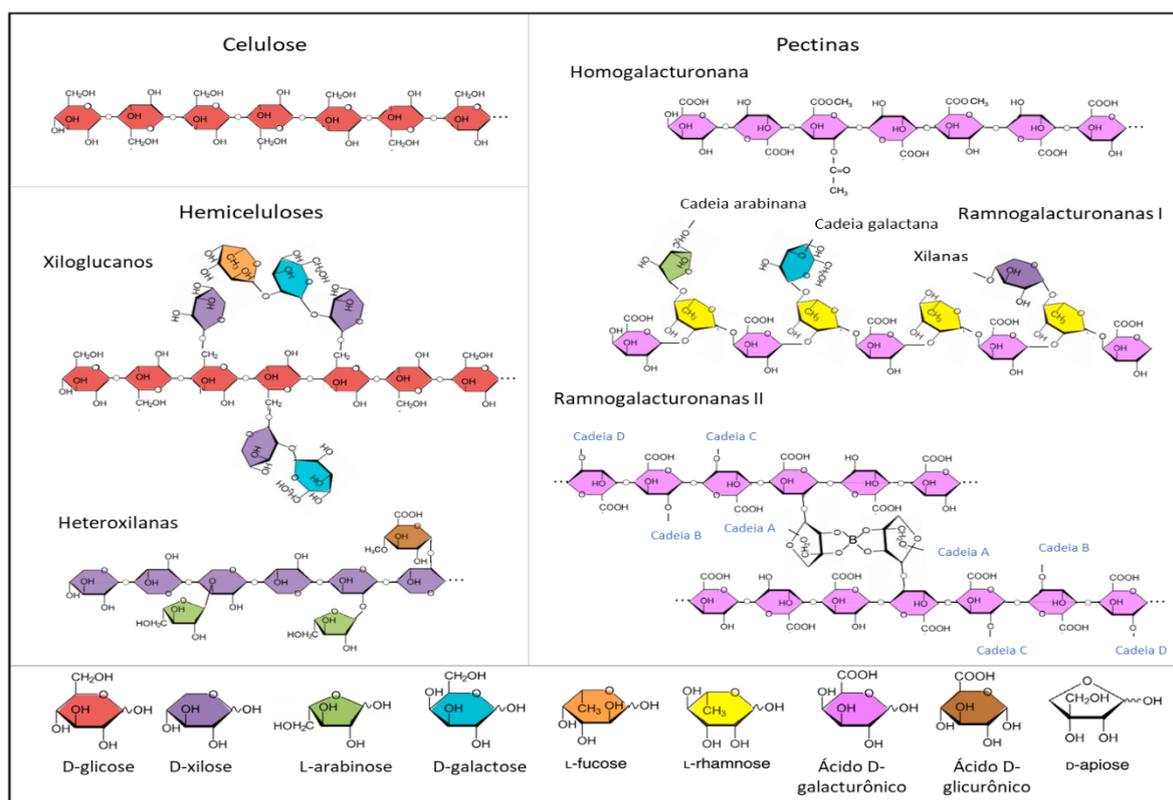


Figura 8 - Esquemática estrutural dos polímeros de celulose, hemicelulose e pectina, com suas respectivas variações e monossacarídeos constituintes. Extraído e modificado de HÖFTE e VOXEUR (2017).

As homogalacturonanas cumprem papel fundamental na adesão entre as células vegetais e, portanto, tem influências na indústria dos biocombustíveis 2G por afetar o processo de 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).

Lignina

A lignina é um composto extremamente abundante, representando cerca de 30% do carbono presente na biosfera. Ela é a segunda molécula mais abundante na natureza, logo atrás da celulose (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). É importante não confundir tal colocação com a hemicelulose, que é o segundo *polissacarídeo* mais abundante, mas não a segunda molécula (*lato sensu*) mais abundante.

É provável que a lignina seja o composto mais importante na história evolutiva da colonização terrestre pelas plantas. Seu aparecimento influenciou enormemente não só as plantas como os organismos que com elas interagem, a disponibilidade de recursos energéticos como o carvão mineral, e até mesmo a composição da atmosfera terrestre (FLOUDAS et al., 2012; ROBINSON, 1990; WENG et al., 2010).

A lignina é composta por 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 9), que quando incorporados via combinação oxidativa formam os resíduos *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (VANHOLME et al., 2010).

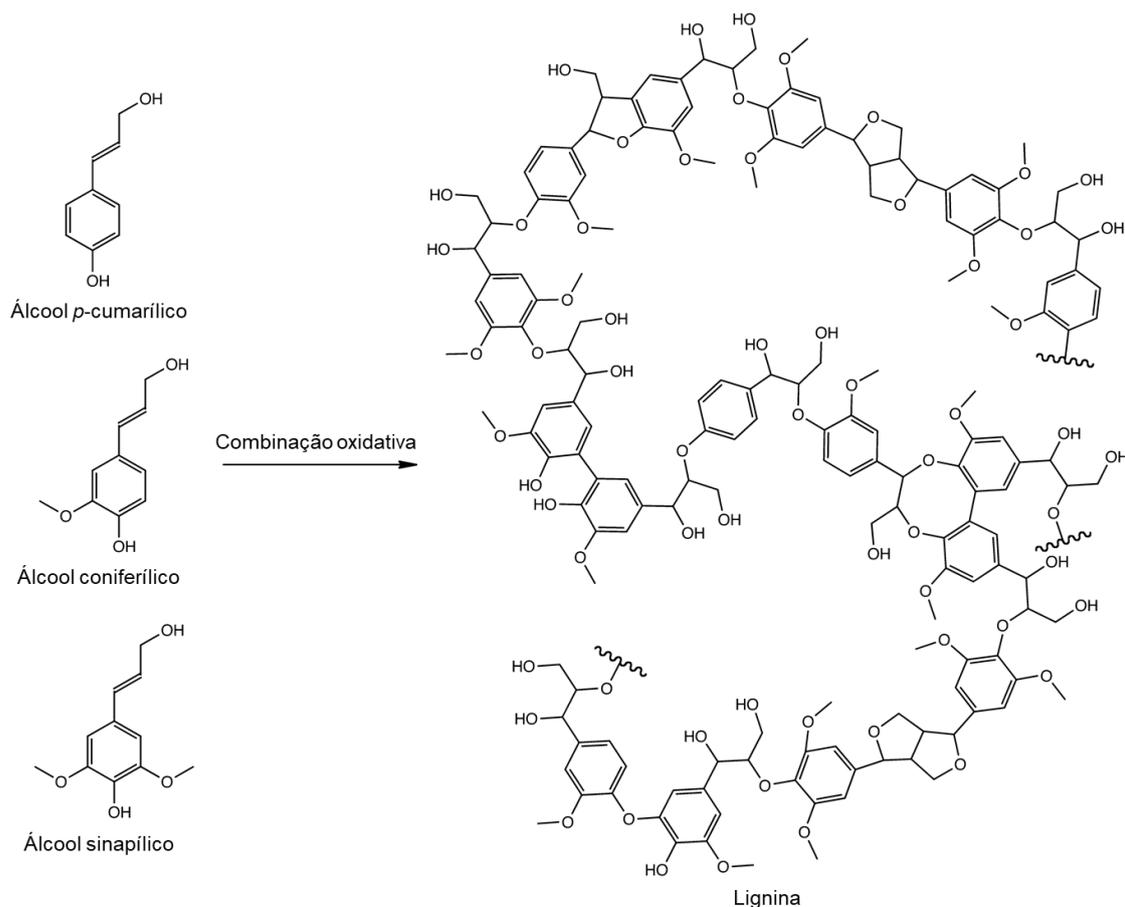


Figura 9 - Estrutura geral da lignina incluindo seus monolignóis precursores. Extraído e modificado de WENG e CHAPPLE (2010).

Pode-se afirmar que um dos principais contribuintes para a recalcitrância da PCV, em relação à degradação microbiana, é a presença de lignina e de complexos lignina-carboidratos. Pelo menos 5 razões principais fazem da lignina (e seus complexos) uma molécula 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 unicamente da mesma (KIRK, 1987; ROBINSON, 1990).

PCV da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à ordem *Poales* e à família das *Poaceae* (gramíneas), o que a classifica como uma monocotiledônea comelinídea. Como já citado anteriormente, tais plantas possuem parede primária classificada como Tipo II.

Um dos modelos mais atuais e completos para a organização da porção celulósica da PCV da cana-de-açúcar foi proposto por BUCKERIDGE et al. (2015). Neste modelo, as microfibrilas de celulose estão unidas, formando uma “macrofibrila”. Esta macrofibrila seria formada por aproximadamente 7 microfibrilas, de cerca de 3 nm cada, e seu diâmetro foi estimado em 12 nm. As microfibrilas não estariam em contato direto umas com as outras, mas sim intercaladas e firmemente associadas com arabinoxilanas e xiloglicanos, ambos componentes da hemicelulose. Todo o exterior dessa estrutura estaria recoberto por outra porção hemicelulósica, mais frouxamente aderida, composta de arabinoxilanas ramificadas e β -glucanos de cadeias mistas. Toda essa estrutura de macrofibrilas e polissacarídeos adjacentes estariam inseridos em uma matriz gelatinosa composta por pectinas e β -glucanos de cadeias mistas. Este modelo é baseado em dados experimentais de DE SOUZA et al. (2013) e DING e HIMMEL (2006), mas apesar de ser um dos modelos mais completos novos experimentos devem ser feitos para sua total confirmação.

No que tange à hemicelulose, a PCV da cana-de-açúcar possui 60% de arabinoxilana, 10% de xiloglicanos, 10% de β -glucanos de cadeias mistas e apenas traços de mananas (DE SOUZA et al., 2013). BUCKERIDGE et al. (2015) ressaltam ainda que fatores como interações polímero-polímero, ramificações com resíduos de acetil ésteres e ácido ferúlico e ligações cruzadas da hemicelulose com a lignina, contribuem significativamente para a recalitrância desta PCV.

As pectinas estão pouco presentes na PCV da cana-de-açúcar (assim como em todas as gramíneas, mas as mesmas ainda podem ser encontradas na lamela média (homogalacturonana) e inseridas nas paredes celulares de virtualmente todos os órgãos da planta (ramnogalacturonanas I, arabinanas e galactanas) (LEITE, 2013). LEITE (2013) também verificou que os vértices entre células adjacentes são relativamente mais ricos com compostos pécticos como a homogalacturonana. Apesar de sua quantidade relativamente baixa nas gramíneas, a pectina tem papel importante na recalitrância da PCV, pois controlam o nível de porosidade da célula, modulando assim a o contato de enzimas com as estruturas mais internas (BUCKERIDGE et al., 2015).

Em relação às ligninas, estudos com microscopia confocal e eletrônica realizados por SANT’ANNA et al. (2013) evidenciaram a presença das mesmas em virtualmente todas as células da PCV da cana, com destaque para as células do xilema (como esperado). Também foi percebida a presença de ligninas (ou compostos semelhantes) na lamela média entre as células (SANT’ANNA et al., 2013). Uma concentração elevada de compostos fenólicos associados a

polissacarídeos na PCV da cana-de-açúcar, que não estão na forma de lignina, já foi constatado (DA SILVA, 2005).

Holocelulases

Celulases

Celulases são glicosídeo hidrolases (GH) capazes de hidrolisar as ligações β -(1,4) do polímero de celulose. Por serem enzimas de extrema importância industrial, compõe um dos grupos enzimáticos mais estudados entre as GHs. As informações detalhadas sobre diferentes famílias de GHs e de outras enzimas ativas em carboidratos podem ser encontradas no banco de dados CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>).

As celulases podem primeiramente ser divididas em três grupos, dependendo de sua região de atuação no 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 10. As três enzimas atuam de forma conjunta com o objetivo de despolimerizar a celulose aos seus monômeros constituintes.

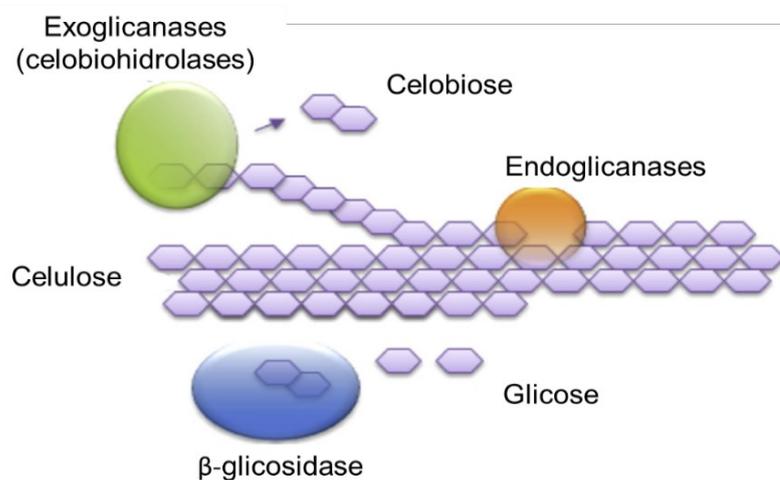


Figura 10 - Principais tipos de celulases e sua forma de atuação na cadeia celulósica. Extraído e modificado de SINGHANIA et al. (2017).

As endoglicanases atuam hidrolisando aleatoriamente as porções internas da cadeia celulósica, criando novas extremidades redutoras e não redutoras onde as exoglicanases (celobiohidrolases) podem atuar. As exoglicanases por sua vez atuam nas extremidades do polímero. Existem exoglicanases especializadas em atuar sobre as extremidades redutoras e

não redutoras, sendo assim denominadas celobiohidrolases I (CBH I) ou II (CBH II), respectivamente. Independentemente de sua porção preferencial de hidrólise, ambas as exoglicanases liberam celobiose (dímero de glicose) e outros celooligômeros como produto (ANNAMALAI; RAJESWARI; SIVAKUMAR, 2016).

As moléculas de celobiose (e alguns celooligômeros) podem então ser hidrolisadas pela última classe de celulases, as β -glicosidases. Essas enzimas finalizam o processo de desconstrução da celulose, hidrolisando a ligação β -(1,4) da celobiose para liberar duas moléculas de glicose ao fim de sua atuação. Como as β -glicosidases são as enzimas que disponibilizam a glicose assimilável pelos microrganismos, a mesma é considerada como um ponto limitante no processo de hidrólise (SINGHANIA et al., 2013).

Um conceito chave ao se tratar da interdependência entre as diferentes atividades das celulases é o sinergismo enzimático. Sinergismo é o fenômeno onde grupos enzimáticos atuando em conjunto possuem uma maior atividade/eficiência do que a soma aritmética de suas partes atuando isoladamente. Um exemplo da importância do sinergismo ocorre na degradação da celulose pelo conjunto celulolítico de *T. reesei*.

T. reesei e suas cepas derivadas são os maiores produtores de celulases comerciais. No entanto, é conhecido a décadas que este fungo possui uma relativa deficiência de β -glicosidases em comparação com as outras atividades (DUFF; COOPER; FULLER, 1985; OKEKE, 2014). Como resultado, tem-se um gargalo, onde a ausência de β -glicosidases suficientes gera um acúmulo de celobiose. A celobiose é uma molécula inibidora da atividade exoglicanases e, portanto, seu acúmulo prejudica todo o processo hidrolítico (SINGHANIA et al., 2013).

Celulases fúngicas podem ser encontradas como enzimas unimodulares (possuem apenas seu módulo catalítico) ou multimodulares. As celulases que apresentam mais de um módulo geralmente possuem um módulo de ligação a carboidratos (CBMs). CBMs são módulos auxiliares, não catalíticos, cuja função é fixar a enzima em seu substrato celulósico. Por exemplo, em *T. reesei* a maioria das endo e exoglicanases são bimodulares e possuem CBMs (KARLSSON et al., 2002).

Apesar da presença de CBMs parecer uma clara vantagem por manter a enzima próxima de seu substrato alvo, sua presença também pode causar inconveniências no processo hidrolítico. A presença de CMBs já foi identificada como uma característica que aumenta a frequência de ligações não produtivas das celulases com a lignina (RAHIKAINEN et al., 2013), reduzindo a eficiência hidrolítica. Logo, a presença de CBMs não é uma garantia de melhores resultados hidrolíticos e se possível deve ser avaliada separadamente para cada aplicação.

As celulasas classicamente possuem um papel de protagonismo na degradação enzimática da celulose, mas elas não são as únicas enzimas a atuarem na desconstrução do polímero. As monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), anteriormente classificadas na família GH61 e recentemente reclassificadas na família de enzimas acessórios AA9, também contribuem para a desconstrução da celulose. No caso das LPMOs fúngicas, a principal contribuição dessas enzimas parece estar relacionada com degradação das porções cristalinas da celulose, mas pouco ainda é conhecido sobre o papel das mesmas.

Apesar de sua importância, por não serem o foco deste trabalho, o papel e mecanismo dessas enzimas não será aqui aprofundado. Revisões sobre a história, bioquímica e modo de ação destas enzimas podem ser encontrados nos trabalhos de MORGENSTERN, POWLOWSKI e TSANG (2014) e MONCLARO e FILHO (2017).

Outra classe de enzimas auxiliares com atividade não hidrolítica são as swoleninas. As swoleninas fúngicas foram primeiramente identificadas em *T. reesei* (SALOHEIMO et al., 2002). Seu papel na degradação celulósica é reduzir as ligações de hidrogênio entre os carboidratos, facilitando o acesso das enzimas hidrolíticas às fibras celulósicas (SALOHEIMO et al., 2002). Existe evidência de que a swolenina também atue na amorfogênese da porção hemicelulósica da PCV. GOURLAY et al. (2013) encontrou um aumento de 300% na liberação de xilose quando swolenina foi adicionada juntamente com enzimas xilanolíticas. Além da swolenina, para certos autores, xilanases também podem ser consideradas como enzimas acessórias na degradação de celulose (HU et al., 2013) e esse grupo de enzimas será discutido a seguir.

Xilanases

O termo “xilanase” pode, tecnicamente, ser empregado para qualquer enzima que atue sobre a cadeia de xilana e suas ramificações. No entanto, o termo é mais comumente utilizado para descrever a enzima Endo-1,4- β -xilanase (E.C 3.2.1.8). Essas enzimas são GHs que catalisam a quebra da ligação β -(1,4) que une as xiloses na cadeia principal de xilana. Nos estágios iniciais de hidrólise são liberados xilooligômeros de tamanhos variados, mas em estágios mais avançados de hidrólise as endoxilanases eventualmente liberam tri, di e mono xilosacarídeos (POLIZELI et al., 2005).

As xilanases são classificadas em diversas famílias como as GH 5, 7, 8, 10, 11 e 43 (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Diferentemente das celulasas, ainda não foi

encontrada uma enzima específica com uma atividade “exoxilanase” que atue de forma análoga às exoglicanases. Esse papel é então realizado pela Endo-1,4- β -xilanase mencionada acima.

As β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), são responsáveis por catalisar a hidrólise da ligação β -(1,4) de moléculas de xilobiose (ou xilotriose), liberando assim os monossacarídeos de xilose. Em realidade, as β -xilosidases possuem a capacidade de liberar monossacarídeos de xilose a partir de xilooligômeros ligeiramente maiores, mas sua afinidade pelo substrato decresce à medida que o grau de polimerização da cadeia aumenta (POLIZELI et al., 2005).

Como mencionado na seção sobre a composição da PCV, a xilana é um substrato diverso e heterogêneo, podendo conter diversas ramificações, chamadas por alguns autores de “decorações” (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; BORIN et al., 2015; BUCKERIDGE et al., 2015). Dentre essas ramificações uma das mais comuns, principalmente nas paredes de gramíneas, são os resíduos de L-arabinose, muito presentes na arabinoxilana. A remoção destas ramificações é feita pela enzima exo- α -L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55) (LAGAERT et al., 2014). Uma esquematização dessas atividades é ilustrada na Figura 11 abaixo.

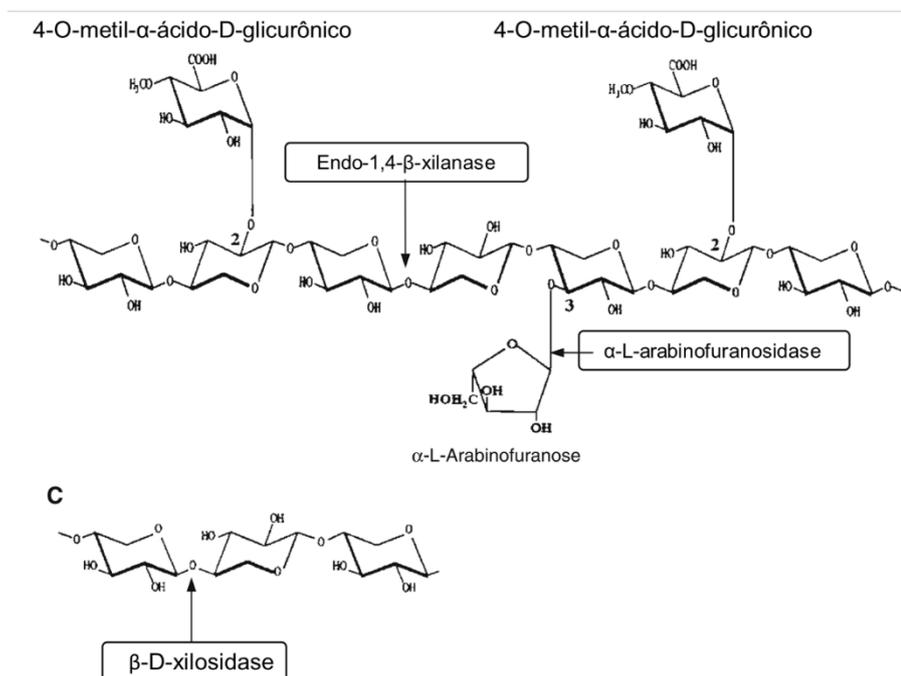


Figura 11 - Esquematização de uma porção da cadeia de xilana e de algumas enzimas xilanolíticas que atuam sobre a mesma. Extraído e modificado de POLIZELI et al. (2005).

Existem ainda outras enzimas que atuam sobre as ramificações presentes na cadeia de xilana, como as α -glicuronidases (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.-) (MOREIRA e FILHO, 2016). Tais atividades enzimáticas não foram aqui investigadas, mas revisões informativas sobre seu funcionamento e sobre o modo de ação das outras xilanases já citadas podem ser encontrado nos trabalhos de ADESIOYE et al. (2016, COLLINS, GERDAY e FELLER (2005) e POLIZELI et al. (2005).

Pectinases

As pectinases catalisam a quebra das ligações α -(1,4) entre os resíduos de ácido galacturônico na cadeia principal da pectina. Elas podem atuar por dois modos distintos: hidrólise e/ou trans-eliminação. A pectina é um dos compostos mais complexos e variados da PCV. Logo, não é uma surpresa que ao longo da evolução os microrganismos tenham desenvolvido um complexo arsenal enzimático capaz de degradar este polímero. Dentre essa variedade de atividades, três grupos enzimáticos merecem ser citados neste trabalho.

As pectinaesterases catalisam a remoção dos grupos metil-ésteres 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.

Se a pectina não for desesterificada (pela ação das pectinaesterases), as enzimas atuantes são as polimetilgalacturonases. Elas 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. Caso a desconstrução seja feita por vias de trans-eliminação, as enzimas responsáveis são 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, seu mecanismo 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 12 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).

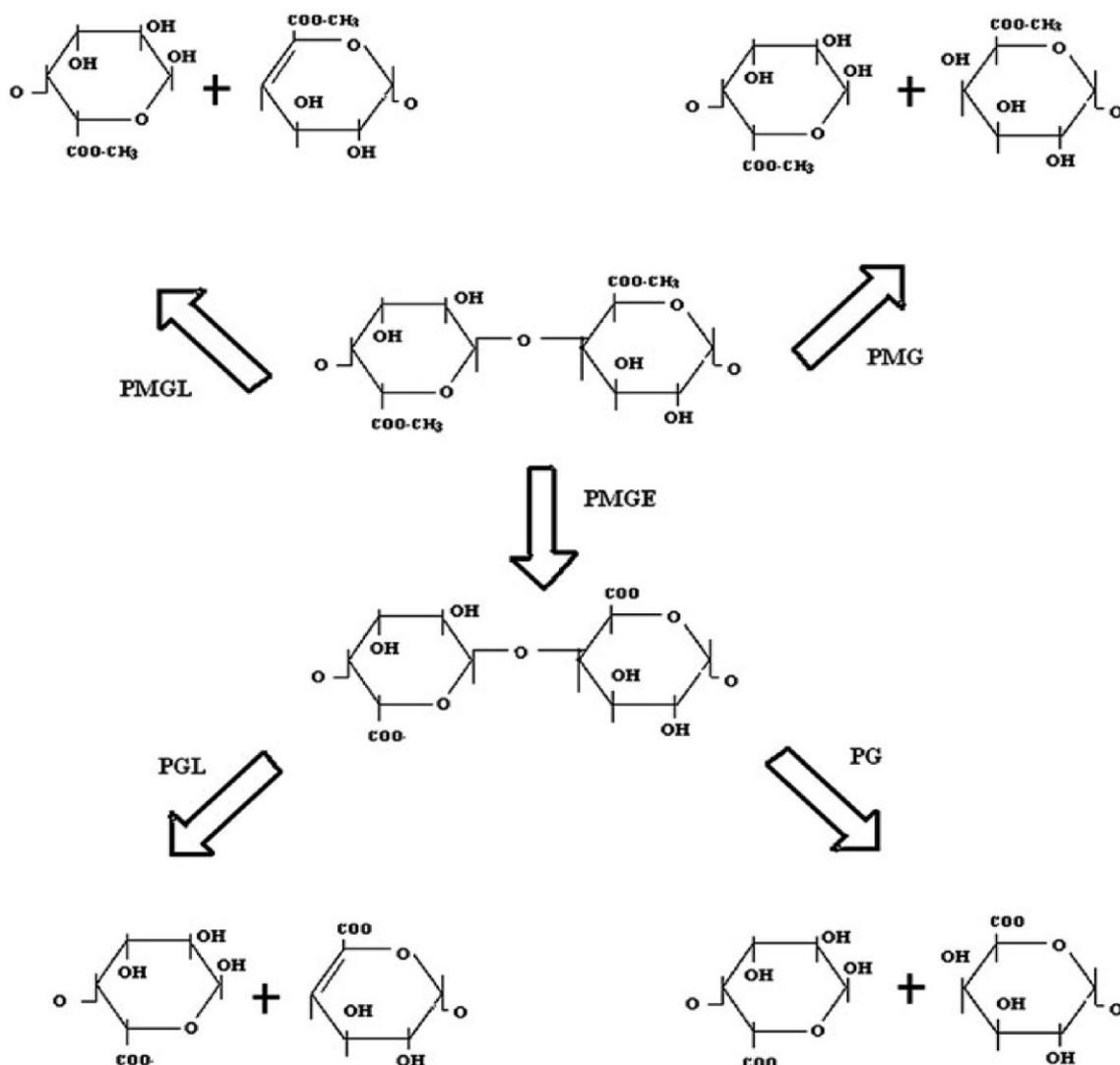


Figura 12 - Modo de ação de alguns grupos de enzimas pectinolíticas. PMGL – polimetilgalacturonato liases (pectina liase), PMG – polimetilgalacturonases (hidrolase), PMGE – polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase), PG – poligalacturonases (hidrolase). Extraído e modificado de SHARMA, RATHORE e SHARMA (2012).

β -galactosidase

β -galactosidases (β -D-galactohidrolase/Lactase, EC 3.2.1.23), popularmente conhecidas como “lactases”, são enzimas pertencentes ao grupo das glicosil hidrolases. Seu funcionamento consiste em clivar resíduos D-galactosil de diversas fontes como no próprio dissacarídeo de lactose, de polímeros (como resíduos de pectina e xiloglucanos na PCV) ou de metabolitos secundários (SINGH; SAMBYAL, 2022). Essas enzimas são encontradas nos mais diversos organismos, como microrganismos, plantas e células animais. Fontes microbianas de β -galactosidase são fungos - principalmente do gênero *Aspergillus* (SINGH; SAMBYAL, 2022) -, leveduras e bactérias. Nos vegetais, essas enzimas possuem papel importante no crescimento das plantas e amadurecimento de frutos (MOVAHEDPOUR et al., 2022).

Em animais essa enzima é importante na digestão da lactose, onde ocorre a clivagem do dissacarídeo em glicose e galactose. Humanos que possuem baixos níveis dessas enzimas em seu intestino delgado são considerados intolerantes à lactose e sofrem de diversos sintomas após o consumo de leite e derivados (CATANZARO; SCIUTO; MAROTTA, 2021).

Essas enzimas possuem enorme importância na indústria alimentícia, sendo utilizadas principalmente na produção de alimentos voltados ao público intolerante à lactose. Sua produção anual é de aproximadamente 5.75 milhões de toneladas (MOVAHEDPOUR et al., 2022).

Durante o processo de degradação da PCV, as β -galactosidases são empregadas por microrganismos para desconstruir diversos polímeros que possuem ramificações de galactose em sua composição, como diversas formas de pectina e alguns xiloglucanos. Essa enzima também é essencial para a produção de outras enzimas ativas em carboidratos, já que o fungo *T. reesei* RUT-C30, um dos principais produtores de CAZymes industriais, pode ser cultivado em meio contendo lactose como fonte de carbono (BAZAFKAN; TISCH; SCHMOLL, 2014; PETERSON; NEVALAINEN, 2012). Logo, suas β -galactosidases são necessárias para que ele hidrolise a lactose e absorva os monossacarídeos que serão utilizados em seu metabolismo para produzir e secretar outras enzimas.

Mananases

As mananases são enzimas atuantes sobre o polímero de manana. As principais atividades empregadas na desconstrução da manana são relativas às enzimas endo- β -mananases (EC 3.2.1.78) que hidrolisam ligações β -(1,4) internas da cadeia e exo- β -mananases (EC 3.2.1.25). As β -mananases, também chamadas de β -manosidases, catalisam a mesma

reação, porém atuando nas extremidades não-redutoras da manana. Em certos tipos de mananas, como a glicomanana, enzimas características da hidrólise da celulose também atuam sobre este polímero, como por exemplo as β -glicosidases (EC 3.2.1.21). 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).

Fungos saprofíticos

O fungo *T. reesei* (Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales) é a forma anamorfa de *Hypocrea jecorina*. Devido à sua notável capacidade celulolítica, que possui grande interesse industrial, *T. reesei* é um dos ascomicetos mais estudados na literatura. A cepa original foi isolada a cerca de 70 anos atrás, nas Ilhas Salomão, onde o fungo era uma praga que apodrecia tendas e uniformes militares dos E.U.A. Desde seu isolamento, diversos mutantes foram criados visando o melhoramento da capacidade de produção de celulasas (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016). O genoma do isolado original, conhecido como QM6a foi sequenciado, possuindo 34 Mbps em 7 cromossomos (MARTINEZ et al., 2008). O genoma do mutante RUT-C30, o mais amplamente utilizado industrialmente, também já foi sequenciado (JOURDIER et al., 2017). Diversas outras cepas derivadas da original também já foram sequenciadas (LICHIOUS et al., 2015; VITIKAINEN et al., 2010). *T. reesei* RUT-C30 também é amplamente empregado em trabalhos de co-cultivo. Dada sua importância no cenário de co-cultivos, ao longo deste trabalho foi escrito um artigo de revisão (*mini-review*) que enfatiza o uso de *T. reesei* nesse contexto. O artigo foi publicado no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology* (fator de impacto: 5.56) e encontra-se no ANEXO I.

Aspergillus brasiliensis (Filo Ascomycota, Ordem Eurotiales) é um fungo cosmopolita, isolado primeiramente em diversos solos brasileiros, mas também encontrado em amostras de solo da Austrália, EUA e Holanda. O fungo também já foi encontrado em uvas de vinhedos em Portugal (VARGA et al., 2007). *A. brasiliensis* pertence à seção *Nigri*, uma seção de *Aspergillus* com esporos negros em que seus componentes são extremamente semelhantes e a identificação taxonômica é um desafio considerável. A seção *Nigri* contém fungos de grande interesse industrial, médico e ecológico e comporta atualmente cerca de 27 espécies, dentre as quais podemos destacar membros como *A. niger*, *A. fumigatus* e *A. nidulans* (VESTH et al., 2018). É comum que fungos pertencentes à esta seção sejam classificados de forma errônea. O fungo *A. brasiliensis* é facilmente confundido com *A. niger*, outro fungo encontrado em amostras de solo ao redor do mundo e que pertence à mesma seção. Ambos os fungos possuem

grande similaridade genética, sendo próximos nas árvores filogenéticas mais recentes propostas para a seção *Nigri* (VESTH et al., 2018). Tamanha é a similaridade entre esses fungos que diversas coleções de culturas de microrganismos que possuíam cepas previamente identificadas como *A. niger* reclassificaram e renomearam suas cepas após a identificação de *A. brasiliensis*. Essa falha de classificação ocorreu inclusive durante este projeto e apenas após a identificação molecular (ver Materiais e Métodos) foi concluído que a cepa utilizada neste trabalho se tratava de *A. brasiliensis*. A questão da identificação e da discussão sobre esses fungos serem espécies diferentes é tão crítica que as ferramentas de busca não acadêmicas, como o Google, consideram o termo “*Aspergillus brasiliensis*” como sinônimo do termo “*Aspergillus niger*”, como pode ser visto na figura abaixo.

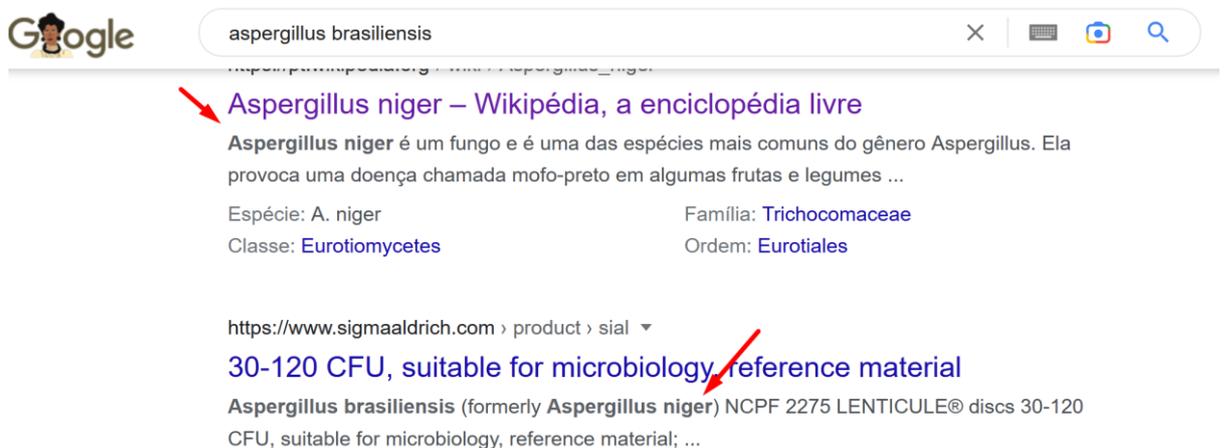


Figura 13 - “Print Screen” do buscador Google tendo *Aspergillus brasiliensis* como objeto de pesquisa. Fica evidenciado pelos termos “*Aspergillus niger*” em negrito (destacados pelas setas vermelhas) que o buscador considera este termo como sinônimo para *Aspergillus brasiliensis*. Inclusive, uma das páginas resultantes da pesquisa por *A. brasiliensis* é a página principal de *A. niger* no site Wikipédia. O mesmo resultado se repete por várias páginas de busca.

A. niger é uma das espécies mais conhecidas de *Aspergillus* e 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). Apesar de *A. niger* possuir o registro GRAS, fornecido pela FDA, para algumas aplicações industriais, certas cepas deste organismo são produtoras de micotoxinas como a ocratoxina A (VARGA et al., 2007). Além disso, cepas de *A. niger* já foram reportadas como causadoras de aspergilose, uma infecção respiratória oportunista causada por alguns fungos do gênero *Aspergillus* (BARAC et al., 2019). Em contrapartida, *A. brasiliensis* também é produtor de enzimas lignocelulolíticas (MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017; PEDERSEN et

al., 2007) de importância industrial mas não é conhecido como um causador de aspergilose e nem como produtor de micotoxinas (VARGA et al., 2007).

O fungo *A. brasiliensis* possui seu genoma sequenciado e depositado no NCBI bem como *A. niger* e outros *Aspergillus* da mesma seção. Essa condição é essencial para a aplicação de estratégias ômicas, as quais são fundamentais para o entendimento do comportamento dessas espécies em mono e co-cultivos. Apesar dessa facilidade, estudos sobre a produção enzimática e sobre a participação de *A. brasiliensis* em co-cultivos são escassos, principalmente em comparação com os diversos trabalhos já publicados com outros fungos semelhantes como *A. niger*, por exemplo.

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

O estudo das interações fúngicas e seu impacto na produção e atividade de enzimas de interesse industrial é tido como o ponto principal deste trabalho. Portanto, foi realizada a escrita de um artigo de revisão cobrindo todos os aspectos principais sobre o tema. Até o momento da escrita deste trabalho, esta é a primeira revisão publicada em periódicos internacionais que versa sobre o tema de interações fúngicas no contexto da produção de enzimas de interesse para biorrefinarias. O artigo foi publicado no periódico *International Biodeterioration & Biodegradation* (fator de impacto: 4.9) e pode ser consultado na referência presente no ANEXO II.

JUSTIFICATIVA

- A literatura sobre o potencial enzimático de *Aspergillus brasiliensis* é escasso quando comparado a outros membros do gênero *Aspergillus*, como *A. niger*.
- O barateamento da etapa de hidrólise de biomassa vegetal lignocelulósica é vital para viabilizar a implantação de uma nova bioeconomia baseada em biorefinarias, onde químicos de base e biocombustíveis possam ser obtidos de forma sustentável. O preço elevado e a dificuldade de obtenção de coquetéis enzimáticos efetivos são gargalos constantes nesse processo. Novas formas de se produzir esses coquetéis enzimáticos devem ser uma preocupação básica rumo ao real desenvolvimento desta bioeconomia.
- O Brasil é líder na produção de diversos insumos agrícolas, principalmente a cana-de-açúcar. O cultivo e beneficiamento dessas *commodities* geram diversos resíduos ao

longo de seu processamento e estes resíduos podem ser reaproveitados para a produção de enzimas por fungos filamentosos.

- A literatura sobre as interações fungo-fungo 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.
- Poucos estudos visam caracterizar os extratos brutos de co-cultivos, apresentando os resultados apenas em condições padronizadas. Sendo assim, informações sobre o efeito da temperatura e pH em extratos brutos de co-cultivos são escassas.
- Co-cultivos fúngicos são uma área sub-estudada e conseqüentemente pouco compreendida em diversas instancias, e novos trabalhos que agreguem conhecimento ao tema devem ser estimulados.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar os parâmetros enzimáticos do fungo *Aspergillus brasiliensis* e verificar o efeito de seu co-cultivo com o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* RUT-C30 na produção extratos brutos enzimáticos com potencial aplicação industrial quando crescidos em bagaço de cana-de-açúcar e caracterizar estes extratos brutos quanto ao efeito que a temperatura, pH e tempo de inoculação tem sobre sua atividade enzimática.

Objetivos Específicos

- Caracterizar o potencial enzimático de *Aspergillus brasiliensis* quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar não pré-tratado.
- Utilizar cultivos em estado líquido usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono na forma de mono e co-cultivos para induzir as atividades enzimáticas de CMCase, xilanase, pectinase, mananase, β -glicosidase, β -xilosidase, β -manosidase e β -galactosidase em ambos os casos.
- Averiguar o efeito que diferentes intervalos de inoculação causam na produção enzimática dos co-cultivos.
- Caracterizar os extratos brutos quanto aos efeitos de fatores como pH e temperatura na atividade enzimática.

- Comparar os perfis proteicos dos diferentes cultivos em géis de eletroforese.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas utilizadas

O isolado de *T. reesei* RUT-C30 foi gentilmente cedido pelo Dr. Roberto do Nascimento Silva da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP). O isolado de *A. brasiliensis* pertence à coleção micológica do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília e foi isolado do solo de uma fazenda privada em Planaltina (DF), que possui Autorização de Acesso e Remessa de Componente do Patrimônio Genético, com número de processo 010237/2015-1. O local de depósito de subamostras é o Banco de Germoplasma de Microrganismos/CENARGEN, EMBRAPA.

Fonte de Carbono e Meio de Cultura

Neste trabalho foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) como fonte de carbono em todos os experimentos. O BCA não foi pré-tratado com o objetivo de simular a degradação do material lignocelulósico como ocorreria de forma natural se descartado no ambiente.

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 (BCA) 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.

Identificação Molecular dos Fungos Filamentosos

Como citado anteriormente o fungo *A. brasiliensis* foi isolado do solo do Cerrado e inicialmente identificado morfológicamente como *Aspergillus niger*. No entanto, por ciência de que erros na identificação morfológica desse grupo de fungos são comuns, foi realizada a identificação molecular da cepa. No processo, também foi identificado molecularmente a cepa de *T. reesei* RUT-C30 com o intuito de verificar novamente sua identidade.

O processo de identificação foi realizado com o auxílio do Laboratório de Interação Planta-Patógeno da Universidade de Brasília.

Extração de DNA

As cepas de *T. reesei* RUT-C30 e *A. brasiliensis* foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo meio Malte, a 28°C, em agitação constante (120 rpm) por 7 dias. Após o tempo de cultivo, a massa micelial foi separada do meio líquido, por meio de filtração em bomba a vácuo. Após isso, o micélio fúngico foi macerado com nitrogênio líquido para extração do material genético. A extração total de DNA foi realizada usando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega®). A integridade do DNA total extraído foi avaliada em gel de agarose (1%), corado com GelRed (Biotium®), visualizado em transiluminador-UV. Foi utilizado como referência o marcador de peso molecular 1 kb *DNA Ladder* (Invitrogen®). A quantidade e pureza do DNA foi estimada por análise da absorbância a 260 nm, utilizando como padrão 1 unidade A₂₆₀=40 µg de RNA, por meio de espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), que pela razão A₂₆₀/A₂₈₀, indica possíveis contaminações de ácido nucleico como: proteínas, sais caotrópicos (guanidina isotiocianato) ou fenol. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C para uso posterior.

Amplificação e sequenciamento

As sequências de fator de alongamento de tradução parcial (TEF1 α) foram amplificadas por reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction*- PCR), e foram utilizados como código de barras primário para identificação, devido ao alto sucesso e precisão da PCR para determinar espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus*. Para validar definitivamente a identificação das cepas, também foram amplificadas as seguintes sequências: espaçadores transcritos internos do núcleo DNA ribossomal (ITS), RNA polimerase II (RPB2), calmodulina (CAL) e actina (ACT). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12,5µL: 6,25µL de MyTaq MasterMix 2x (Bioline, EUA), 0,3µL (10 pmol/µL) de cada primer, 4,25µL de água sem nuclease e 1µL da amostra de DNA (25ng/µL). As condições do ciclo para todos os marcadores foram a desnaturação inicial a 96°C por 5 min seguido por 35 ciclos a 90°C por 30 s, temperatura de anelamento (de acordo com a **Tabela 2**) por 45 s, e 72°C por 45 s, e uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR, após purificação (ExoSAP-IT™), foram sequenciados bidireccionalmente por eletroforese capilar (Método de Sanger) em equipamento ABI3130 (LifeTechnologies), utilizando kit BigDye v3.1 (Life Technologies) pela Universidade Católica de Brasília (UCB). Para análise dos dados, foi utilizado o programa Geneious 6.1.8 (Biomatters). E posteriormente, foi montada a sequência consenso de cada amostra através da leitura forward e reverse. Quando possível, pequenos erros do sequenciamento foram manualmente corrigidos através da análise e comparação das fitas. Por

fim, os bases iniciais e terminais do fragmento sequenciado de cada amostra foram excluídas, e a sequência final, contendo bases de alta qualidade (Quality value ≥ 20), foi utilizada para identificação em comparação aos bancos de dados GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Os acessos que apresentaram a maior porcentagem de similaridade/identidade com a sequência em estudo, analisando a melhor combinação de “score” e “e-value” foram considerados.

Tabela 2 - Primers utilizados para identificação molecular de *T. reesei* RUT-C30 e *A. brasiliensis*

Região gênica	Iniciador	Sequência	Senso	Referência	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento
18S-5.8 S-28S rDNA (ITS)	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	Senso	Vilgalys and Hester (1990)	1,500 bp	53°C
	V9G	TTACGTCCCTGCCCTTTGT A	Antisenso	Hoog and Ende (1998)		
Translation elongation factor (TEF1 α)	EF1F	TGCGGTGGTATCGACAAG CGT	Senso	Jacobs et al. (2004)	700 bp	56°C
	EF2R	AGCATGTTGTCGCCGTTG AAG	Antisenso	Jacobs et al. (2004)		
Calmodulin (<i>cal</i>)	CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTC TCCC	Senso	Carbone and Kohn (1999)	700 bp	55°C
	Cal2RD	TGRTCNGCCTCDCGGATC ATCTC	Antisenso	Groenewald et al. (2013)		
Actin (<i>act</i>)	TRI-ACT1	TGGCACCACACCTTCTAC AATGA	Senso	Samuels et al. (2012)	700 bp	56°C
	TRI-ACT2	TCTCCTTCTGCATACGGTC GGA	Antisenso	Samuels et al. (2012)		
RNA polymerase II (RPB2)	5F2	GGGGWGAYCAGAAGAAG GC	Senso	Sung et al. (2007)	1,100 bp	57°C
	7cR	CCCATRGCTTGYTTRCCC AT	Antisenso	Liu et al. (1999)		

Crescimento em Placa, Contagem de Esporos e Inoculação

Os fungos *T. reesei* RUT-C30 e *A. brasiliensis* 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. Com o auxílio de uma lâmina de microscopia de vidro, os esporos foram raspados da placa e mergulhados em 50 mL de solução salina (NaCl 0.9%, m/v). 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 descritos 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, para evitar contaminações por tais instrumentos.

Após a contagem de esporos, uma determinada quantidade da solução foi inoculada em 100 mL do meio suplementar previamente esterilizado. O volume inoculado foi calculado de forma que a concentração de esporos no meio de cultura seja de 10^5 esporos/mL. No caso dos monocultivos, todos os 10^5 esporos/mL pertencem ao mesmo fungo. Tratando-se dos co-cultivos, foram realizados os cálculos para que metade dessa concentração fosse preenchida por cada fungo participante (5×10^4 para cada fungo), mantendo assim a concentração final de 10^5 esporos/mL no meio em ambas as condições testadas.

Curva de Indução Enzimática

Os frascos inoculados com os esporos foram então alocados em agitadores automáticos com agitação a 120 rpm, 28 °C, por nove dias. Os cultivos foram realizados em triplicata biológica (3 frascos distintos). A cada 48h foi coletado 1 mL de amostra de cada frasco para construção da curva de indução enzimática, de forma que apenas os dias ímpares (1, 3, 5, 7 e 9) foram avaliados. Essas alíquotas foram congeladas a -20 °C para posterior análise. Após o período de incubação de nove dias, os cultivos foram filtrados usando-se tecido sintético livre de celulose, pois a presença da mesma poderia ocasionar a ligação de enzimas ao filtro, alterando os resultados finais. O sobrenadante, que contém as atividades enzimáticas, foi coletado e denominado Extrato Bruto (EB). O EB foi congelado a -20 °C para posterior análise e caracterização.

Avaliação do Efeito do Tempo de Colonização

O experimento para avaliação dos efeitos do tempo de colonização na atividade enzimática foi realizado de forma similar à curva de indução enzimática, feitas as alterações descritas a seguir.

Além dos experimentos realizados na indução enzimática (monocultivos de *T. reesei* RUT-C30 e *A. brasiliensis* e co-cultivo de ambos inoculados ao mesmo tempo) foram adicionadas duas novas configurações: 1) inocula-se o fungo X, espera-se 24h de crescimento nas condições descritas na seção anterior e então inocula-se o fungo Y. 2) inocula-se o fungo X, espera-se 48h de crescimento nas condições descritas na seção anterior e então inocula-se o fungo Y. Sendo que ambos os casos, os fungos “X” e “Y” podem representar *T. reesei* RUT-

C30 e *A. brasiliensis*. O experimento então é refeito, invertendo a ordem dos fungos. Após a realização deste experimento, obteve-se a seguinte configuração de amostras:

Tabela 3 – Configurações dos monocultivos e co-cultivos utilizados no trabalho, incluindo os experimentos de intervalo de inoculação entre os fungos.

Configuração do Experimento (abreviação)	Intervalos entre inoculações
<i>A. brasiliensis</i> (AB)	-
<i>T. reesei</i> RUT-C30 (C30)	-
<i>A. brasiliensis</i> + <i>T. reesei</i> RUT-C30 (AB + C30 0h)	-
<i>A. brasiliensis</i> + <i>T. reesei</i> RUT-C30 (AB + C30 24h)	24h
<i>A. brasiliensis</i> + <i>T. reesei</i> RUT-C30 (AB + C30 48h)	48h
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>A. brasiliensis</i> (C30 + AB 24h)	24h
<i>T. reesei</i> RUT-C30 + <i>A. brasiliensis</i> (C30 + AB 48h)	48h

Obs: a cepa cujo nome aparece em primeiro lugar foi a primeira a ser inoculada e a segunda cepa mencionada foi adicionada após os intervalos descritos na tabela.

Os cultivos citados acima foram então caracterizados em todos os aspectos que serão citados adiante, sendo a comparação das características enzimáticas entre essas diferentes configurações experimentais a base deste trabalho.

Ensaio Enzimáticos

Foram realizados diferentes ensaios enzimáticos com os EBs coletados para avaliar a atividade enzimática de cada cultivo. Dois protocolos distintos foram utilizados neste trabalho para detectar as atividades enzimáticas: MILLER (1959) e WOOD & BHAT (1988).

O método de MILLER (1959), também conhecido como método do ácido dinitrosalicílico, foi empregado para avaliar as atividade de celulase (carboximetilcelulase – CMCCase), hemicelulases (xilanas e mananas) e pectinases. O método de Miller detecta açúcares redutores liberados pelas enzimas durante os ensaios enzimáticos. Os valores são comparados com curvas de calibração padrão, que fornecem uma equação de regressão capaz de estimar a quantidade de açúcares redutores liberados durante o ensaio enzimático. Com essa quantidade, é possível calcular a atividade enzimática apresentada. Este método foi utilizado para avaliar a atividade enzimática utilizando substratos naturais.

Os substratos naturais utilizados para os ensaios de xilanase, mananase, pectinase e CMCCase 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 reação enzimática foi composta por 10 μL de substrato e 5 μL de EB. Foram realizados controles para descontar eventuais influências do extrato bruto e do substrato na absorbância final. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicatas 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 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS), e as placas foram novamente incubadas a 97 °C por 10 minutos, para a detecção dos açúcares redutores liberados pela ação enzimática, segundo metodologia descrita por MILLER (1959). Ao término da reação com o DNS, foram adicionados 150 μL de H_2O_d às amostras, que foram homogeneizadas e transferidas para placas de leitura de 96 poços tipo ELISA. A absorbância resultante da reação enzimática foi mensurada por espectrofotômetro *SpectraMax Plus 384* (*Molecular Devices*; San José, CA, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. Esta metodologia é utilizada como padrão em nosso laboratório e já foi empregada em trabalhos anteriores (COSTA, 2013; SILVA, 2018; VAZ, 2019). 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 μmol de açúcar redutor por minuto.

O método de WOOD & BHAT (1988) consiste no uso de um substrato sintético para averiguar a atividade enzimática, sendo este substrato os diversos derivados do 4-Nitrophenyl. Foram avaliadas as atividades de β -glicosidase, β -xilosidase, β -manosidase e β -galactosidase. Os substratos utilizados foram, respectivamente: 4-Nitrophenyl β -D-glicopiranosídio (pNPG), 4-Nitrophenyl β -D-xilopiranosídio (pNPX), 4-Nitrophenyl β -D-manopiranosídio (pNPM) e 4-Nitrophenyl β -D-galactopiranosídio (pNPGAL). A ação das enzimas libera o 4-Nitrophenyl que quando acrescido de uma solução básica (como o carbonato de sódio) apresenta uma coloração amarelada que pode ser mensurada no espectrofotômetro e comparada com uma curva de calibração previamente estabelecida.

Os volumes utilizados foram: 5 μL de extrato bruto, 25 μL de substrato (pNPG, pNPX, pNPM ou pNPGAL) a 5 mM em tampão acetato de sódio pH 5 e 45 μL de tampão acetato de sódio pH 5 a 100 mM. Esses volumes foram alocados em placas de PCR e incubados por 30 min a 50 °C em termocicladores (T100™, *Bio-Rad Laboratories Inc.*). Após esta incubação foram adicionados 100 μL de carbonato de sódio 1 M às amostras, que foram homogeneizadas e tiveram 150 μL de seu volume transferidos para placas de leitura tipo ELISA. As leituras

foram realizadas a 430 nm em espectrofotômetro *SpectraMax Plus 384* (Molecular Devices; San José, CA, EUA) e representadas em U.I/mL. Os volumes e cálculos de atividade descritos acima foram feitos de acordo com os trabalhos de SILVA (2018).

Determinação da Concentração de Proteínas e Atividade Específica

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.

Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado realizando-se os mesmos ensaios descritos na seção de Ensaio Enzimáticos, variando-se apenas a temperatura empregada no primeiro período de incubação. Foram testadas as temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. As atividades foram igualmente expressas em UI/mL. O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado com o EB do 9º dia de cultivo.

Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi avaliado. Utilizou-se uma variação do protocolo do método DNS de Miller. Para esta porção do trabalho, foi avaliada apenas a atividade CMCCase. A influência do pH na faixa de 3 a 10 (com intervalos de 1 unidade) foi testada. O mix reacional foi constituído de 5 µL dos substratos na concentração de 2%, 5 µL de enzima (extrato bruto) e 5 µL de tampão. Os tampões utilizados foram: citrato de sódio (pHs 3, 4 e 5), fosfato de sódio (pHs 6, 7 e 8) e glicina (pHs 9 e 10), todos em 50 mM. No preparo dos tampões, o pH foi ajustado com HCl ou NaOH conforme necessário. É sabido que os íons presentes em cada tampão podem apresentar efeito diferenciado sobre a atividade enzimática. Por isso, nas transições de faixas de pH foram realizados testes extras, onde tampões diferentes – mas no mesmo pH – foram utilizados. Não é possível realizar testes de efeito de pH nas atividades enzimáticas de β-glicosidase, β-xilosidase, β-manosidase e β-galactosidase, pois os ensaios para revelação da atividade enzimática dessas atividades são dependentes de pH e alterar o pH do ensaio alteraria a percepção dos resultados. O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi avaliado com o EB do 9º dia de cultivo.

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 utilizando-se ácido tricloroacético (TCA) 100%. Foi utilizado o marcador *TrueColor High Range Protein Marker (Sinapse.Inc)*, que abrange pesos moleculares entre 10 e 245 kDa (quiloDalton). 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).

Experimentos de Sacarificação

Para testar a capacidade total dos extratos brutos em hidrolisar biomassa lignocelulósica, foram realizados ensaios de sacarificação. Os ensaios foram realizados em microescala, em tubos de 1,5 mL. Foram adicionados aos tubos 0,01 g de bagaço-de-cana de açúcar (1% m/v) e 20 µg de proteína de cada cultivo. O volume foi completado para 1 mL com tampão acetato de sódio pH 5.0 100 mM. As amostras foram incubadas a 50 °C, em agitação de 720 RPM em agitador de microtúbulos *vortemp* (Labnet). Os valores utilizados nessa hidrólise foram estabelecidos e estatisticamente validados pela Dra. Andreza de Mello Lopes, membra do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília. Por questões de propriedade intelectual, sua tese, onde é demonstrada essa validação, ainda não está disponível ao público. Foram realizados testes após 4, 8, 12 e 24 horas de incubação. Para cada ponto de coleta, uma triplicata de tubos era “sacrificada”, ou seja, não foram retirados volumes dos tubos para evitar o efeito de concentração de açúcares, que poderia levar a resultados errôneos. Os açúcares redutores liberados pelas enzimas foram mensurados utilizando o método de Miller (1959) com o reagente DNS e comparados a uma curva de glicose. É importante ressaltar que esse método é apenas uma aproximação, já que diversos açúcares redutores são liberados durante o processo de sacarificação. A real quantidade e diversidade desses açúcares só podem ser meticulosamente mensurados utilizando-se técnicas como HPLC, algo que não foi realizado ao longo desse trabalho.

Design Experimental, Análise Estatística e Programas Utilizados

Todos os cultivos realizados ao longo desse trabalho foram feitos em triplicatas biológicas. Para minimizar erros de pipetagem, todos os ensaios acima descritos foram feitos em quintuplicatas (replicatas técnicas) para cada uma das replicaras biológicas. Os gráficos apresentam o valor médio entre as triplicatas biológicas e as barras de erro representam os desvios padrão entre as mesmas (a não ser que especificado de outra forma na legenda). Foram realizadas análises de variância (one-way ANOVA) para determinar se existe diferença estatística real entre as configurações de cultivo. Todas as manipulações de dados, produção de gráficos e análises estatísticas foram realizadas no *software* Microsoft Excel 2016.

Resultados e Discussão

Caracterização do fungo *Aspergillus brasiliensis* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar

Foi realizada a caracterização enzimática do fungo *A. brasiliensis*, crescido em meio líquido, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono durante nove dias. É importante destacar que, como já citado anteriormente, a literatura sobre o potencial enzimático de *A. brasiliensis* é escassa. Justifica-se então a importância deste trabalho em realizar uma caracterização mais completa quanto às atividades enzimáticas deste fungo. Neste contexto, fazer comparações com publicações que possuam condições semelhantes às aqui apresentadas é virtualmente impossível, dada a inexistência de dados. Além disso, comparar *A. brasiliensis* com espécies próximas como *A. niger*, apesar de fornecer alguma direção, reforça a errônea percepção que esses fungos são a mesma entidade, ideia essa que precisa ser revista.

Dentro das condições estabelecidas, a maior atividade analisada com substratos naturais no monocultivo de *A. brasiliensis* foi a atividade xilanase, como evidenciado na Figura 14. A atividade de xilanase (endoxilanase) teve seu pico no terceiro dia, com 0,57 UI/mL, e assim se manteve até o nono e último dia de cultivo. Menezes e colaboradores (2018) já demonstraram o potencial de *A. brasiliensis* em hidrolisar xilana, mas em condições de fermentação em estado sólido e utilizando casca de arroz como fonte de carbono. O trabalho de Menezes e colaboradores demonstra que a cepa de *A. brasiliensis* por eles encontrada em solo amazônico, possui atividade xilanólítica comparável a uma cepa de *Aspergillus nidulans* geneticamente modificada para a produção de xilanases (MENEZES et al., 2018). Os resultados aqui encontrados, em conjunto com o trabalho de Menezes e colaboradores são um indício de uma potencial aplicação de *A. brasiliensis* para a produção de xilooligosacarídeos, os quais possuem valor comercial como probióticos para humanos (NORDBERG KARLSSON et al., 2018).

As atividades de CMCase (endocelulase), mananase e pectinase resultaram em valores inferiores aos de xilanase ao longo de todo o experimento (Figura 14). O pico de atividade CMCase ocorreu no sétimo dia, e a atividade se manteve até o fim do experimento. Já as atividades de mananase e pectinase demonstraram valores pequenos, próximos de 0,1 UI/mL, algo esperado, pois manana e pectina são polissacarídeos menos abundantes em material lignocelulósico derivado do bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, neste trabalho foi utilizado um substrato lignocelulósico altamente recalcitrante e não pré-tratado, a fim de simular condições naturais de degradação de um substrato no solo. Nesse sentido, a aplicação de pós-tratamento ao bagaço de cana-de-açúcar poderia potencializar algumas atividades.

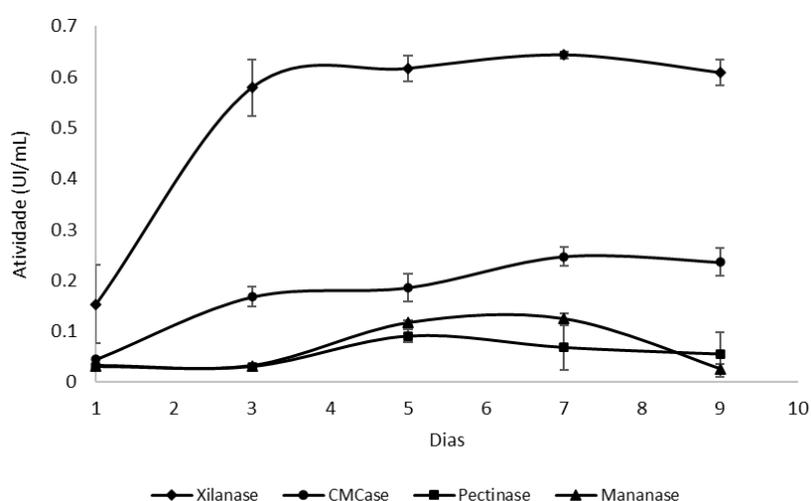


Figura 14 - Atividades enzimáticas de *A. brasiliensis* ao longo de nove dias em meio líquido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. As barras de erro representam o desvio padrão entre as replicatas biológicas ($n = 3$).

As atividades de β -glicosidase, β -xilosidase, β -manosidase e β -galactosidase foram mensuradas usando substratos sintéticos derivados do pNP. O resultado dessas atividades ao longo de 9 dias de cultivo pode ser visto na Figura 15. A avaliação dessas enzimas é importante, pois são atividades que atuam nas últimas etapas da hidrólise enzimática, liberando monossacarídeos que são captados e utilizados pelos microrganismos. A sua ausência pode significar um gargalo para o processo, inclusive causando inibição das enzimas de etapas anteriores devido ao acúmulo de seus substratos.

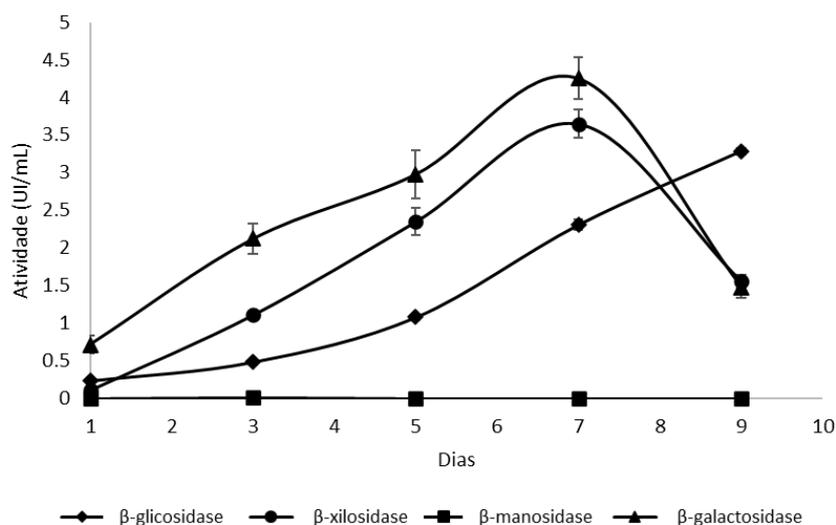


Figura 15 - Atividades enzimáticas de *A. brasiliensis* sobre substratos sintéticos ao longo de nove dias em meio líquido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. As barras de erro representam o desvio padrão entre as replicatas biológicas ($n = 3$).

A atividade que alcançou os maiores valores foi β -galactosidase, que atingiu 4.25 UI/mL no sétimo dia. No nono dia, no entanto, houve queda de 32% dessa mesma atividade. Acontecimento similar se deu com a atividade β -xilosidase, que foi a segunda maior atividade enzimática no sétimo dia mas apresentou queda de 42% ao final do cultivo. Aplicações biotecnológicas que se beneficiem dessas duas atividades teriam mais proveito em interromper o cultivo durante o sétimo dia, quando ocorre o pico de atividade dessas enzimas no extrato bruto. A queda nessas atividades enzimáticas pode ser explicada pela própria durabilidade e instabilidade natural de tais enzimas ou pela presença de proteases, secretadas por *A. brasiliensis*, no meio. Os trabalhos de Novelli e colaboradores (2016) e de Chimbekujwo e colaboradores (2020) mostram que *A. brasiliensis* é capaz de produzir proteases quando cultivado em substratos agroindustriais.

As β -galactosidases (lactases) são enzimas de enorme importância na indústria alimentícia, usadas na produção de alimentos seguros para consumidores intolerantes à lactose (SINGH; SAMBYAL, 2022). A presença de tais enzimas elenca *A. brasiliensis* como um potencial produtor de β -galactosidases, produção essa que potencialmente pode ser melhorada dadas as devidas investigações de otimização. Já a presença de β -xilosidases, juntamente com outras xilanases, é mais um indício do potencial de *A. brasiliensis* como um secretor de enzimas que atuem na produção de xilooligossacarídeos com potencial probiótico (NORDBERG KARLSSON et al., 2018).

A atividade de β -glicosidase apresentou um comportamento crescente ao longo dos dias analisados. Uma curva de indução enzimática mais duradoura seria necessária para avaliar quando tal atividade começaria a estabilizar ou diminuir. As β -glicosidases são enzimas importantes na hidrólise da celulose, por atuarem na quebra de celobiose (dissacarídeo composto por duas glicoses em ligação β -1,4). O acúmulo de celobiose é conhecido por inibir endocelulases, diminuindo a eficiência hidrolítica. A capacidade de *A. brasiliensis* em expressar β -glicosidases é fundamental para a segunda parte deste trabalho, onde esse fungo foi co-cultivado com *T. reesei* RUT-C30. Apesar de secretar grandes quantidades de endocelulases, *T. reesei* RUT-C30 tem uma produção de β -glicosidases proporcionalmente baixa, criando assim um gargalo no processo de hidrólise devido à inibição das endocelulases e celobiohidrolases por acúmulo de seus produtos (OKEKE, 2014; SØRENSEN et al., 2013). Esse resultado demonstra que *A. brasiliensis* é um bom par em potencial para testes de co-cultivo com *T. reesei* RUT-C30.

Não foram detectadas, em nenhum dos dias avaliados, atividades de β -manosidase expressadas por *A. brasiliensis* dentro destas condições de cultivo. Por essa, razão, não foi realizado mais nenhum tipo de caracterização para esta atividade.

Caracterização do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de *A. brasiliensis*

Após avaliar o desenvolvimento das atividades enzimáticas ao longo dos dias, averiguou-se o efeito que diferentes temperaturas teriam sobre as atividades enzimáticas. Foram testadas diferentes temperaturas para avaliar o comportamento das enzimas secretadas por *A. brasiliensis* nessas condições. Ao avaliar o comportamento de uma dada atividade enzimática em cada faixa de temperatura, é possível escolher extratos enzimáticos que se apliquem melhor as peculiaridades de diferentes aplicações industriais. A Figura 16 apresenta as atividades enzimáticas de CMCase, xilanase, pectinase e mananase (A), concomitantemente com as atividades de β -glicosidase, β -xilosidase e β -galactosidase (B).

Na Figura 16 (A) observa-se que a temperatura de maior atividade para as xilanases foi a 60 °C e que temperaturas acima desse valor também aumentaram as atividades de CMCase em relação à temperatura de ensaio padrão (50 °C). Quanto à pectinase, a maior atividade foi obtida em 70 °C. Porém, o desvio padrão não permite tirar conclusões precisas sobre o efeito real dessa temperatura nessa atividade enzimática. Na temperatura de 50 °C, quando considerados os desvios padrões, tem-se uma atividade semelhante àquela encontrada em 70 °C. A atividade mananase foi igual ou inferior a 0.1 UI/mL em todas as temperaturas testadas.

Esse fato, somado ao efeito de desvio padrão, faz que se possa considerar a atividade mananase de *A. brasiliensis* como irrelevante para quaisquer aplicações.

Como evidenciado na Figura 16 (B), a temperatura de maior atividade para a enzima β -glicosidase está na faixa entre 50 e 60 °C. Acima dessas temperaturas, a enzima inicia o processo de desnaturação e sua atividade começa a diminuir, chegando a virtualmente zero nos 80 °C. No caso da β -galactosidase, a temperatura que resultou em maiores atividades foi 60 °C. Ao atingir 70 e 80°C essa atividade se torna praticamente nula.

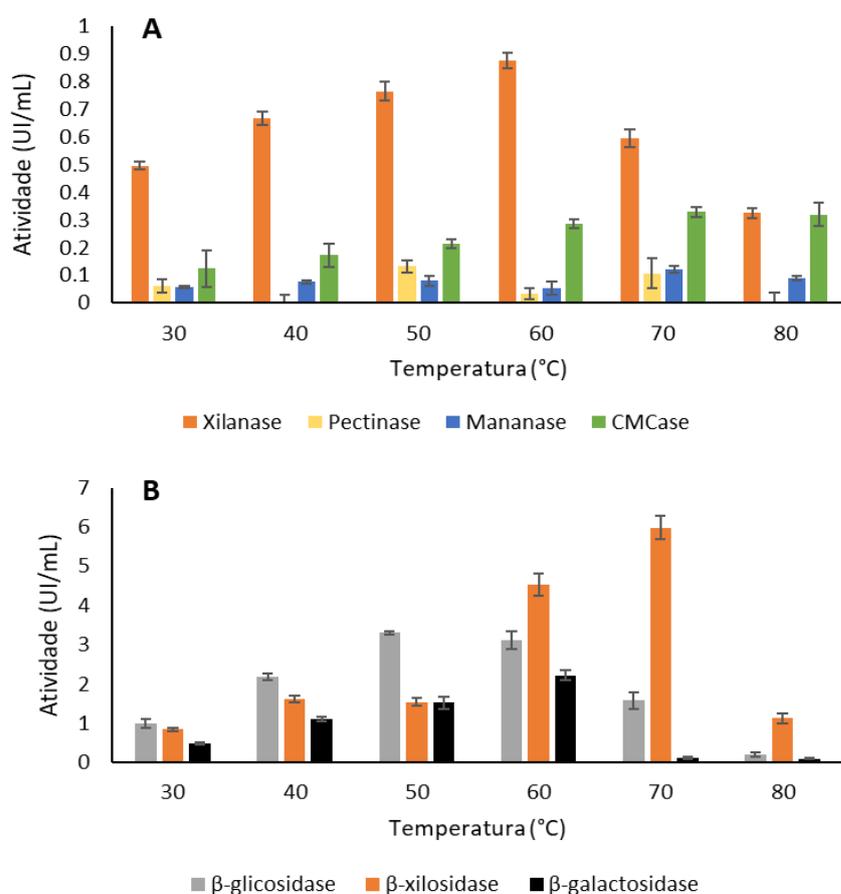


Figura 16 – Caracterização do efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas de *A. brasiliensis*. (A) Apresenta as atividades oriundas da hidrólise de substratos naturais enquanto (B) apresenta as atividades que hidrolisam substratos sintéticos derivados do pNP. As barras de erro representam o desvio padrão entre as replicatas biológicas ($n = 3$).

A atividade de β -xilosidase contrasta das demais por possuir a maior temperatura que incrementou sua atividade, atingindo seu máximo dentre as temperaturas testadas aos 70 °C. Atividade de aproximadamente 6 UI/mL é cerca de 4 vezes maior que a atividade apresentada nas condições padrão de 50 °C. Um estudo anterior já demonstrou a existência de β -xilosidases de *A. brasiliensis* que apresentam maior atividade em 75 °C, algo corroborado pelos resultados obtidos neste trabalho (PEDERSEN et al., 2007).

Conclui-se que, para as enzimas aqui estudadas, as faixas de temperatura que resultaram em atividades mais altas encontram-se entre 60 e 70 °C. Em temperaturas abaixo ou acima desses valores, ocorre perda de atividade. É importante destacar que uma atividade mais elevada não é o único parâmetro relacionado à temperatura que também é útil avaliar como as enzimas se comportam em testes de termoestabilidade. Por questões de cronograma, não foi possível realizar testes de termoestabilidade para uma quantidade tão grande de atividades

enzimáticas diversas, mas a realização desse experimento é uma perspectiva futura para a publicação de resultados sobre esse tópico.

Caracterização do efeito do pH sobre a atividade enzimática de *A. brasiliensis*

Além da temperatura, outro fator importante que influencia a atividade enzimática é o pH do meio em que a enzima se encontra. A Figura 17 mostra o efeito do pH na atividade CMCase de *A. brasiliensis*.

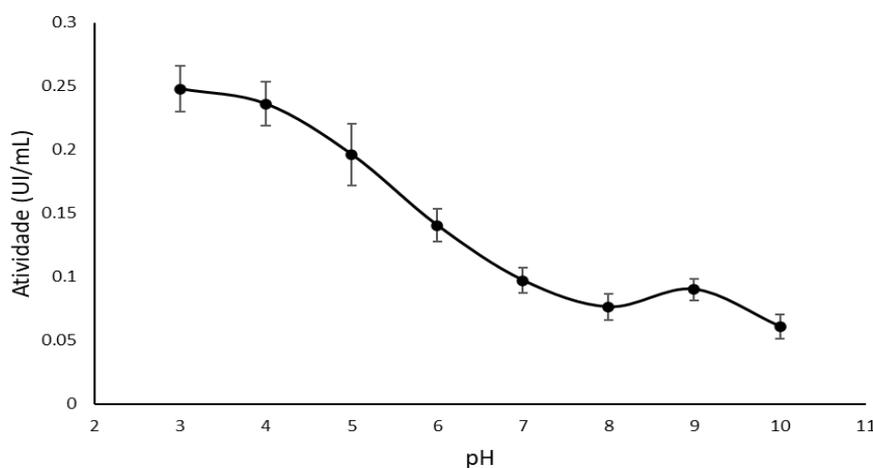


Figura 17 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática de CMCase produzida por *A. brasiliensis* crescido em bagaço de cana-de-açúcar.

Não foram encontradas na literatura investigações sobre o efeito do pH sobre a atividade de CMCase em *A. brasiliensis*. No entanto, na ausência de tais dados, pode-se recorrer ao fungo *A. niger*, que seria uma das espécies geneticamente mais próximas ao fungo em questão. Semelhante ao que foi encontrado neste trabalho, já foram reportadas atividades celulolíticas em *A. niger* com a maior atividade sendo expressa em pH 4 (SULYMAN; IGUNNU; MALOMO, 2020). Já Budenkova e colaboradores encontraram uma faixa de pH de maior atividade levemente mais alcalina: entre 4,5 e 5, para a cepa *Aspergillus niger* F-1270 (BUDENKOVA et al., 2021). No melhor de nosso conhecimento, este pode ser um dos primeiros trabalhos a avaliar as características das CMCases de *A. brasiliensis* crescido em material lignocelulósico.

Concentração de proteínas e atividade específica de *A. brasiliensis*

As concentrações de proteína nos extratos brutos foram mensuradas utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). As replicatas de *A. brasiliensis* atingiram concentrações de proteína na ordem de 0,23 mg/mL. Cultivos fúngicos naturais (sem uso de tecnologias de expressão heteróloga) geralmente possuem valores menores de proteína nos

extratos brutos quando comparados com cultivos de fungos geneticamente modificados. Os valores de concentração de proteína são utilizados para mensurar a atividade enzimática específica (UI/mg de proteína). A Tabela 4 abaixo sumariza as atividades específicas de *A. brasiliensis*.

Tabela 4 – Compilação das atividades (UI/mL) apresentadas por *A. brasiliensis* quando cultivado em meio líquido com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e as respectivas atividades específicas.

Enzimas	Atividade (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg)*
CMCase	0.23	1
Xilanase	0.60	2.6
Pectinase	0.05	0.2
Mananase	0.02	0.08
β -glicosidase	3.28	14.26
β -xilosidase	1.55	6.74
β -galactosidase	1.47	6.39

* Atividade específica obtida ao se dividir a concentração de proteína (0.23 mg/mL) pelas respectivas atividades enzimáticas em UI/mL.

As atividades específicas podem ser utilizadas como uma mensuração indireta da contribuição de uma determinada atividade enzimática para a composição proteica total do meio. Logo, se grandes atividades enzimáticas se apresentam em um meio com baixa concentração de proteína, pode-se inferir a “eficiência” desse extrato para aquela atividade, pois com menos proteínas obtém-se as atividades desejadas. Nesse contexto, β -glicosidase foi a enzima que apresentou maior atividade específica. Esse resultado contribui para a hipótese de que *A. brasiliensis* seja um potencial parceiro de co-cultivo para *T. reesei* RUT-C30 com o intuito de suplementar a atividade β -glicosidase deficiente do último fungo.

Experimentos de sacarificação

A capacidade do extrato bruto produzido por *A. brasiliensis* de sacarificar (hidrolisar) bagaço de cana-de-açúcar não pré-tratado foi avaliada. Inicialmente, averiguou-se a capacidade hidrolítica ao longo de 4, 8, 12 e 24 horas. No entanto, não foram detectadas quantidades significativas de açúcares redutores após esses períodos.

Por ser um fungo selvagem, isolado diretamente do solo do Cerrado, foi lançada a hipótese de que ele precisaria de mais tempo para realizar a secreção de enzimas hidrolíticas

capazes de degradar um substrato tão recalcitrante, sem nenhum pré-tratamento, sob as condições do experimento.

Para testar tal hipótese, o experimento de sacarificação foi refeito, mas desta vez utilizando-se intervalos muito maiores, sendo eles 24, 48, 72 e 96 horas. No entanto, mesmo com esse tempo adicional, não foram detectadas quantidades significativas de açúcares redutores após esses períodos, como mostra a Figura 18. Durante este experimento foi optado por utilizar a absorbância em 540 nm como medida indireta da produção de açúcares redutores, como descrito no método de Miller (1959). Como foram utilizados extratos brutos com diversas atividades enzimáticas distintas, na teoria, uma diversidade de oligômeros, dissacarídeos e monossacarídeos diferentes deveria ter sido liberada. Como as concentrações de açúcares são medidas de acordo com uma curva de regressão linear específica de cada substrato, se torna uma tarefa complexa mensurar precisamente as quantidades de cada carboidrato liberado durante o experimento. Portanto, optou-se por utilizar a absorbância como medida de inferência de capacidade hidrolítica.

Independentemente da metodologia utilizada para estipular a sacarificação do substrato, fica claro que, dentro das condições neste trabalho estabelecidas, *A. brasiliensis* foi incapaz de sacarificar de forma eficiente o bagaço de cana-de-açúcar não pré-tratado.

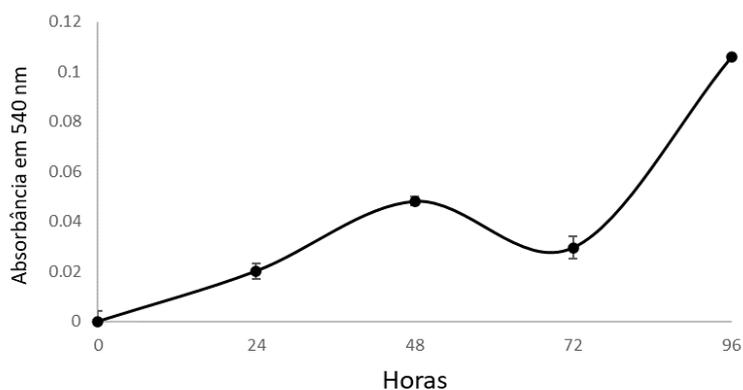


Figura 18 – Absorbância em 540 nm após experimento de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pelo extrato bruto de *A. brasiliensis*. A absorbância em 540 nm é um indicativo indireto da presença de açúcares redutores, resultantes da desconstrução da parede celular vegetal, no meio.

Co-cultivos entre *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30

Curvas de Indução Enzimática e Avaliação do Efeito do Tempo de Colonização

Os mono e co-cultivos foram crescidos em meio líquido, com agitação constante de 120 RPM, 28° C e utilizando bagaço de cana-de-açúcar moído como fonte de carbono. Além da indução enzimática ao longo do tempo averiguou-se o efeito de diferentes tempos de colonização entre os fungos participantes do co-cultivo. A Figura 19 representa os resultados obtidos com os monocultivos de *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 bem como seus co-cultivos simultâneos (0h) e o teste de efeito do tempo de colonização de 24 e 48 horas para as atividades mensuradas com substratos naturais.

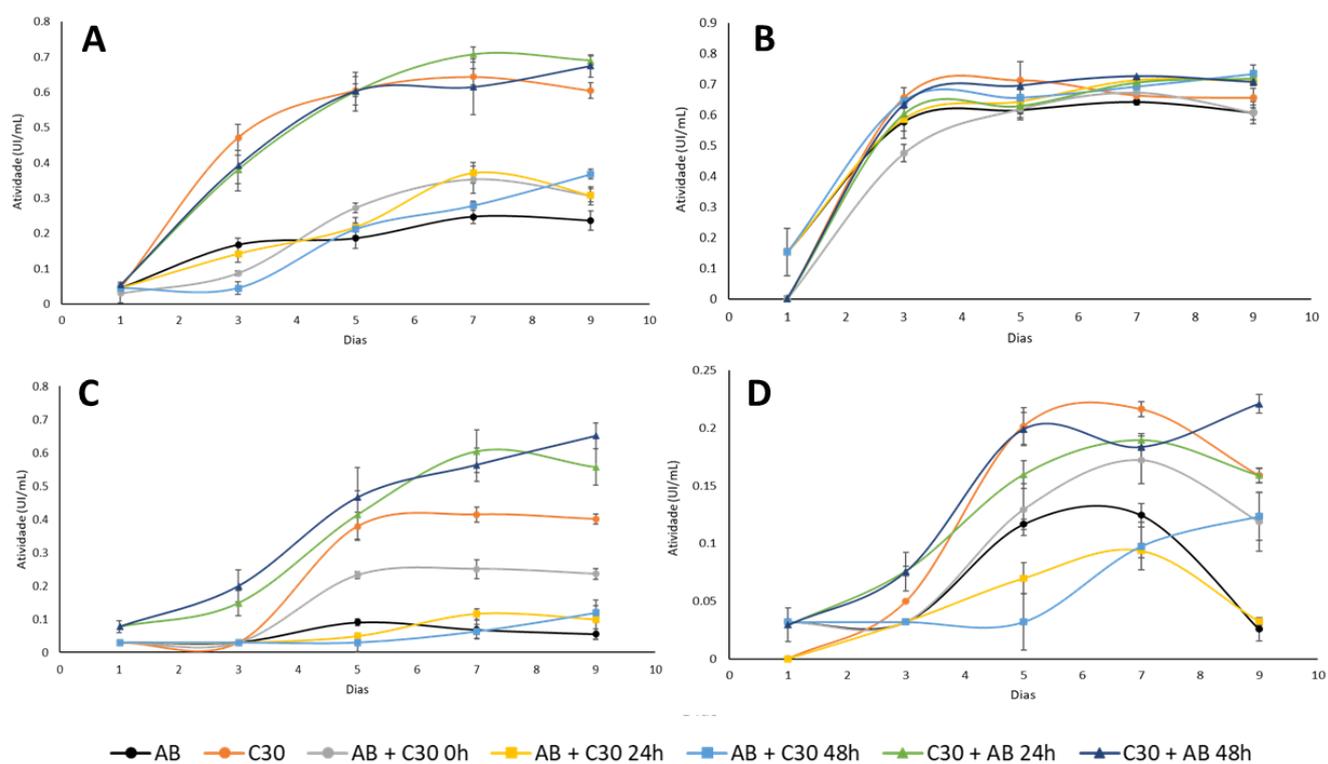


Figura 19 – Perfil das atividades enzimáticas (em UI/mL) testadas em substratos naturais, obtidas ao longo de 9 dias pelos mono e co-cultivos de *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 crescidos em meio líquido com bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono. A = Atividade de CMCCase (endocelulase), B = Atividade de xilanase, C= Atividade de Pectinase, D = Atividade de Mananase. AB = *A. brasiliensis*, C30 = *T. reesei* RUT-C30, AB + C30 0h = *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 inoculados simultaneamente, AB + C30 24h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, AB + C30 48h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 48h após o primeiro, C30 + AB 24h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, C30 + AB 48h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 48h após o primeiro. As barras de erros representam o desvio padrão entre três replicatas biológicas. Todos os experimentos apresentaram $p < 0,05$ (ANOVA).

Os co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 com *A. brasiliensis* inoculados após 24h e 48h (linhas verdes e azul marinho, respectivamente) obtiveram as maiores atividades de CMCCase (endocelulase). Considerando-se os desvios padrão, pode-se dizer que ambos os co-cultivos obtiveram o mesmo resultado (Fig. 19-A). A performance desses modelos de co-cultivos foi cerca de 10% superior ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 para esta atividade. Uma hipótese para a interpretação desses resultados seria o fato que a β -glicosidase de *A. brasiliensis* poderiam complementar a baixa produção desta enzima por *T. reesei* RUT-C30. Essa suplementação impediria eventos como a inibição das CMCases pelos seus produtos de hidrólise, aumentando assim a liberação de açúcares redutores. Apesar de não terem sido encontrados, até a escrita deste trabalho, relatos do co-cultivo de *T. reesei* com *A. brasiliensis*, o fungo *T. reesei* RUT-C30 já foi co-cultivado em diversos trabalhos com *A. niger*, como compilado por Sperandio e Filho (2021). Certos trabalhos já reportaram – em condições de cultivo diferentes e utilizando *A. niger* – aumento nas atividades de celulasas nos co-cultivos de *T. reesei* com outros fungos do gênero *Aspergillus*. Por exemplo, Zhao e colaboradores (2018) obtiveram aumento de 40% na atividade CMCCase nos co-cultivos entre *T. reesei* RUT-C30 e *A. niger* em comparação ao monocultivo do primeiro fungo. Este é apenas um, dentre outros exemplos, do benefício do co-cultivo para certas atividades enzimáticas (SPERANDIO; FILHO, 2019, 2021).

Quanto à atividade de xilanase (Fig. 19, B), houve pouca diferença entre os cultivos avaliados, sendo que a partir do 4º dia as atividades de todos os cultivos tornam-se indistinguíveis umas das outras. Ambos *A. brasiliensis* e *T. reesei* já possuem sua atividade xilanolítica descrita em trabalhos anteriores (MENEZES et al., 2018; OKEKE, 2014).

Na Figura 19 (C), tem-se a atividade de pectinase. Para essa atividade os co-cultivos de *T. reesei* RUT-C30 inoculados com *A. brasiliensis* após 24h e 48h também se destacaram. Esses co-cultivos resultaram em atividades de pectinase 37% e 48% maiores que o monocultivo de *T. reesei* RUT-C30, respectivamente. Ao considerar a produção quase nula de pectinases pelo monocultivo de *A. brasiliensis*, esses co-cultivos apresentam valores que chegam a alcançar 700% no incremento dessa atividade em relação a este monocultivo. O estudo de co-cultivos sobre a atividade de pectinase é muito menos explorado na literatura que as celulasas e mananases e não foram encontrados trabalhos que viabilizassem paralelos construtivos com os resultados aqui apresentados para esta atividade enzimática. As atividades aqui encontradas são interessantes pois pectinases são enzimas de relevante interesse para a indústria de polpas e sucos de frutas (TAPRE; JAIN, 2014) e em indústrias de chá, café e até aplicações têxteis (SHARMA; RATHORE; SHARMA, 2012).

A atividade que obteve a menor performance geral em todos os mono e co-cultivos foi a atividade mananase (Figura 19, D). Para essa atividade, o co-cultivo de *T. reesei* RUT-C30 inoculado após 48h com *A. brasiliensis* se destacou novamente, obtendo valores próximos a 0.25 UI/mL. Dada a composição do bagaço de cana-de-açúcar, que já foi comentada em oportunidade anterior nesse trabalho, é razoável que as atividades pectinase e mananase tenham apresentado menores valores, já que seus substratos estão presentes em menores quantidades na PCV da cana-de-açúcar.

Considerando as atividades testadas em substratos sintéticos, os co-cultivos se destacaram nas atividades de β -glicosidase, β -xilosidase e β -galactosidase (Fig. 20, A, B e C respectivamente). O monocultivo de *T. reesei* apresentou a menor atividade de β -glicosidase (Fig. 20, A), algo já conhecido e amplamente relatado na literatura (OKEKE, 2014; RANA et al., 2014). O monocultivo de *A. brasiliensis* atingiu 57% mais atividade β -glicosidase do que *T. reesei* no último dia. Por sua capacidade de produzir tal enzima, *A. brasiliensis* tem potencial de ser uma alternativa não produtora de micotoxinas ao uso de *A. niger*, que é frequentemente utilizado como um parceiro de *T. reesei* a fim de aumentar a atividade β -glicosidase no coquetel resultante do co-cultivo (AHAMED; VERMETTE, 2008; GUTIÉRREZ-CORREA; VILLENA, 2012; JUHÁSZ et al., 2003; MAHESHWARI et al., 1994; ZHAO; DENG; FANG, 2018). O co-cultivo de maior potencial para incrementar a atividade β -glicosidase é a inoculação simultânea dos dois fungos, que atingiu patamar intermediário entre as atividades de *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30, sendo 38% superior às atividades do último fungo em monocultivo.

Ao comparar os resultados dos dois experimentos de *delays* de inoculação na atividade β -glicosidase, percebe-se que a quando *T. reesei* é o primeiro colonizador, isso resulta em impacto negativo na atividade dessa enzima (Fig. 20, A). Os experimentos com *A. brasiliensis* sendo inoculado com *delays* de 24h e 48h em relação a *T. reesei* mostraram quedas na atividade β -glicosidase no último dia de cultivo. O co-cultivo onde *T. reesei* é o primeiro colonizador, seguindo-se 24h depois por *A. brasiliensis*, apresentou um grande crescimento na atividade enzimática entre os dias 5 e 7, mas esse valor cai substancialmente no último dia. Talvez esse fato ocorra pela instabilidade natural de cada enzima ou devido à presença de proteases. Conclui-se que a inoculação simultânea dos dois fungos foi a melhor abordagem em ambos os experimentos quando o objetivo é o aumento da atividade β -glicosidase.

O monocultivo de *A. brasiliensis* obteve a maior atividade β -xilosidase e a capacidade de produzir tal enzima quando cultivado em substratos lignocelulósicos já foi previamente

demonstrada (MENEZES et al., 2018). Os co-cultivos de *A. brasiliensis* com *T. reesei* RUT-C30 inoculado 48h depois, alcançaram valores de β -xilosidase próximos do monocultivo de *A. brasiliensis*. O co-cultivo de inoculação simultânea (0h) obteve desempenho similar ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30, cerca de 0,25 UI/mL. Já o co-cultivo com *delays* de 48h supracitado obteve atividades β -xilosidase 696% superiores em relação ao cultivo simultâneo e o monocultivo de *T. reesei*. Uma das razões para aumento nessa atividade pode ser explicada ao se construir um paralelo entre *A. brasiliensis* e seu parente próximo, *A. niger*.

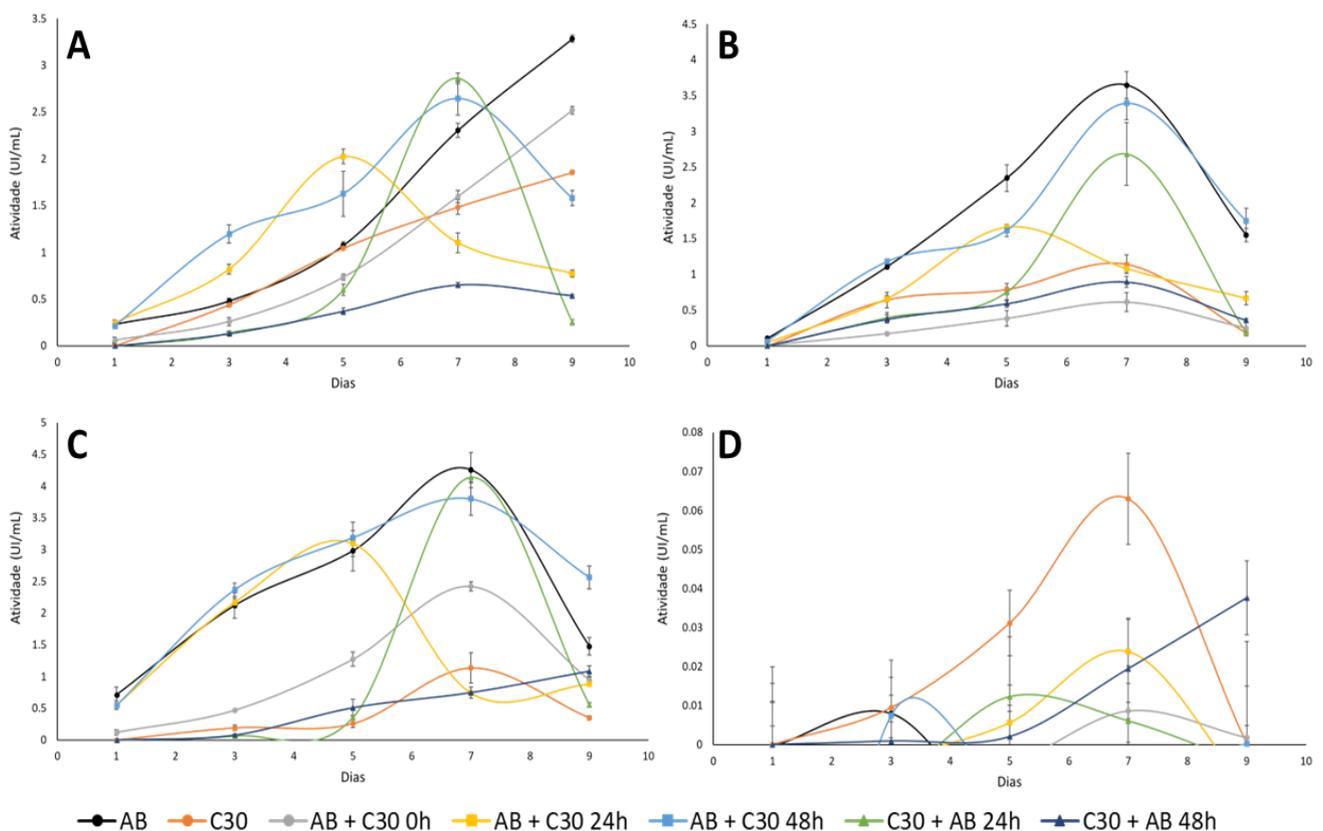


Figura 20 - Perfil das atividades enzimáticas (em UI/mL) testadas em substratos sintéticos, obtidas ao longo de 9 dias pelos mono e co-cultivos de *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 crescidos em meio líquido com bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono. A = Atividade de β -glicosidase, B = Atividade de β -xilosidase, C= Atividade de β -galactosidase, D = Atividade de β -manosidase. AB = *A. brasiliensis*, C30 = *T. reesei* RUT-C30, AB + C30 0h = *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 inoculados simultaneamente, AB + C30 24h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, AB + C30 48h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 48h após o primeiro, C30 + AB 24h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, C30 + AB 48h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 48h após o primeiro. As barras de erros representam o desvio padrão entre três replicatas biológicas. Todos os experimentos apresentaram $p < 0,05$ (ANOVA).

A. niger pode ser capaz de acidificar o meio para assegurar suas condições preferenciais de cultivo, na ausência de competição, nos primeiros dias. Apesar do pH não ter sido mensurado nesse trabalho, já existem relatos da capacidade de *A. niger* de acidificar o meio e a influência que isso pode causar nas atividades enzimáticas do extrato (MAHESHWARI et

al., 1994). Talvez *A. brasiliensis* possua a mesma capacidade, mas experimentos que façam o acompanhamento do pH no meio de cultivo seriam necessários para averiguar tal hipótese.

A relevância dos intervalos entre inoculações é destacada com esses resultados, pois os cultivos de *A. brasiliensis* que foram inoculados com *T. reesei* em intervalo menor (24h), apresentaram uma curva de indução de β -xilosidase totalmente distinta, com uma queda acentuada de atividade no nono dia de cultivo. Esses dados podem ser um indicador que algo ocorre no primeiro dia, caso *T. reesei* esteja presente, que resulta na diminuição da atividade β -xilosidase. O efeito negativo de *T. reesei* sobre a atividade β -xilosidase é confirmado com a outra configuração experimental onde *T. reesei* é o primeiro colonizador e *A. brasiliensis* é inoculado posteriormente (Fig. 20, B). Podemos ver que em todos os cultivos em que *T. reesei* RUT-C30 teve tempo adicional de cultivo em relação à *A. brasiliensis*, as atividades β -xilosidase são menores do que quando o oposto ocorre.

Infelizmente, a literatura relativa às atividades de β -xilosidase em co-cultivos fúngicos é escassa, tornando comparações com outros trabalhos superficiais. Um dos únicos estudos sobre co-cultivos que aborda β -xilosidases, é o trabalho de HU et al. (2011), onde o co-cultivo entre *A. niger* e *A. oryzae* resultou em uma diminuição de 55% na atividade em questão em comparação ao monocultivo de *A. niger*. Ao mesmo tempo que escassez de informações sobre essa atividade enzimática em co-cultivos inviabiliza comparações, ela também reforça a importância do presente estudo para o campo de co-cultivos.

No tocante à atividade de β -galactosidase (Figura 20, C), o co-cultivo de *A. brasiliensis* com *T. reesei* inoculado 48h depois apresentou as maiores atividades. Todas as outras configurações de cultivo apresentaram valores semelhantes e inferiores. Assim como ocorreu com as atividades de β -glicosidase e em menor grau com a β -xilosidase, também houve um pico de atividade no 7º dia de cultivo. Por questões logísticas, todas as caracterizações que ocupam os próximos tópicos deste trabalho foram realizadas com amostras relativas ao último dia, mesmo ele nem sempre sendo o de maior atividade, como ocorre no caso da β -galactosidase.

Não foi detectada nenhuma atividade significativa de β -manosidase (Figura 20, D), semelhante ao que ocorreu nos experimentos de monocultivo de *A. brasiliensis*.

Efeito da temperatura na atividade enzimática dos co-cultivos

O campo de co-cultivos, apesar de ainda pouco explorado e compreendido, vem ganhando cada vez mais publicações em tempos recentes. No entanto, a maioria dessas publicações se limita a analisar o potencial enzimático dos co-cultivos em uma única condição. Isso provavelmente ocorre pois experimentos de co-cultivo aumentam significativamente a demanda de trabalho, pois deve-se analisar os diferentes co-cultivos e seus respectivos monocultivos, sendo algo laborioso de se executar pela quantidade de amostras resultantes. Quando os fungos são crescidos em co-cultivos, fica claro pela seção anterior deste trabalho, que as atividades enzimáticas dos fungos podem sofrer alterações. Como trata-se de um extrato bruto complexo, que possui contribuições de dois fungos distintos, pode-se levantar a hipótese que os extratos de diferentes co-cultivos teriam comportamentos distintos sob as mesmas condições de temperatura ou pH. Porém, não existem muitas informações na literatura sobre como esses fatores (temperatura e pH) podem afetar a atividade enzimática de co-cultivos. Sob essa ótica, neste trabalho foi realizada a caracterização dos extratos, sob a seguinte hipótese: se as enzimas, proteínas e metabólitos secundários dos co-cultivos são – provavelmente – distintos de seus respectivos monocultivos constituintes, é possível que as enzimas presentes nos extratos brutos dos co-cultivos respondam de formas diferentes aos parâmetros de pH e temperatura. O conhecimento desses parâmetros é benéfico para elucidar possíveis aplicações industriais onde as enzimas estariam em condições próximas às aqui simuladas.

Devido às suas propriedades cinéticas, enzimas tem sua capacidade reativa afetada pela temperatura do ambiente em que se encontram. No caso de extratos brutos fúngicos, muitas vezes não se mede a atividade de apenas uma enzima, mas sim de um conjunto de enzimas atuando sobre o substrato. Quando essa abordagem é aplicada a um co-cultivo, essa característica amplia-se, pois o extrato bruto será composto de uma combinação de enzimas produzidas pelos dois fungos participantes. Sendo assim, o que se mede ao avaliar o efeito da temperatura é como esta interfere de forma global a atividade de um determinado grupo de enzimas. Averiguar tais parâmetros é importante do ponto de vista industrial, pois coquetéis enzimáticos comercialmente disponíveis não são enzimas purificadas, mas sim extratos brutos com uma possível adição de enzimas exógenas.

Dito isso, a Figura 21 mostra o efeito da temperatura na atividade enzimática dos co-cultivos. Foram testadas temperaturas entre 30 e 80 graus (em intervalos de 10 °C), para contemplar condições presentes em diferentes aplicações industriais.

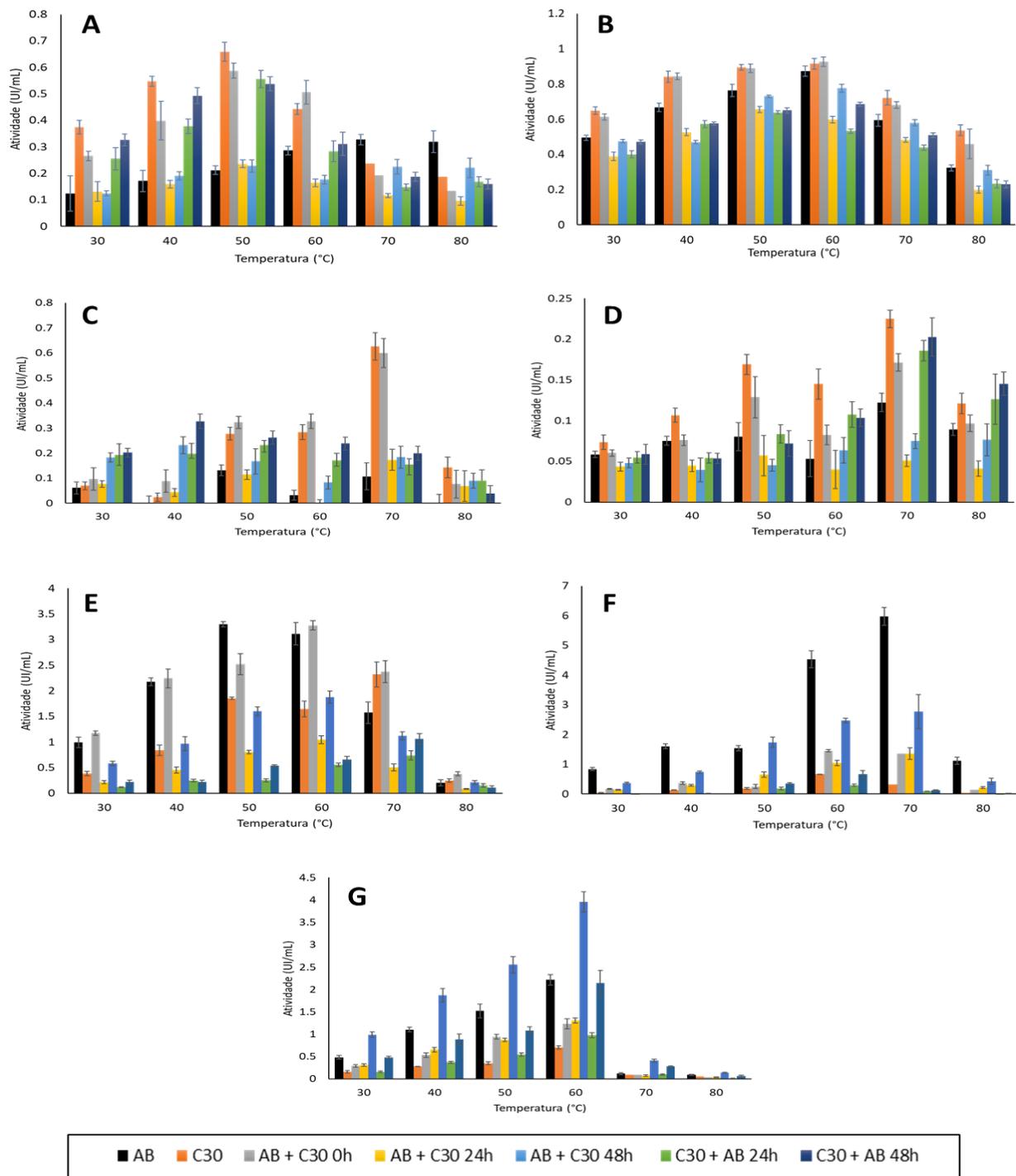


Figura 21 - Influência da temperatura sobre a atividade enzimática dos extratos brutos dos monocultivos de *A. brasiliensis*, *T. reesei* RUT-C30 e seus co-cultivos simultâneos e com diferentes tempos de inoculação. A = Atividade de CMCase, B = Atividade de xilanase, C = Atividade de pectinase, D = Atividade de mananase, E = atividade β -glicosidase, F = Atividade de β -xilosidase e G = atividade β -galactosidase. AB = *A. brasiliensis*, C30 = *T. reesei* RUT-C30, AB + C30 0h = *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 inoculados simultaneamente, AB + C30 24h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, AB + C30 48h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 48h após o primeiro, C30 + AB 24h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, C30 + AB 48h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 48h após o primeiro. As barras de erros representam o desvio padrão entre três replicatas biológicas. Todos os experimentos apresentaram $p < 0,05$ (ANOVA).

Quanto à atividade de CMCase (Figura 21, A), o monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 manteve, em média, a maior atividade entre 30 e 50 °C, sendo a maior atividade 0,65 UI/mL à 50 °C. Na temperatura de 60 °C, o co-cultivo simultâneo com *A. brasiliensis* demonstrou uma atividade que, devido aos desvios padrão, pode ser considerada idêntica ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30. A partir de 70 °C, as atividades de CMCase de *T. reesei* RUT-C30 diminuem e ocorre uma ascendência das atividades de *A. brasiliensis*, que superam as do primeiro fungo. Não foram encontrados na literatura dados considerando o efeito da temperatura sobre as CMCases de *A. brasiliensis*. O único trabalho encontrado que aborda essa atividade enzimática trata-se de uma otimização de produção de CMCases por *A. brasiliensis* em cultivo sólido usando casca de cupuaçu como substrato (DE SOUZA FALCÃO et al., 2022). No trabalho divulgado por de Souza Falcão e colaboradores (2022), os autores conseguiram otimizar a atividade CMCase, aumentando-a para 36 U/g (5 vezes mais que a atividade primeiramente encontrada). A unidade U/g é muito utilizada em cultivos sólidos, mas infelizmente dificulta comparações diretas com o trabalho aqui apresentado. Além disso, todos os ensaios realizados por de Souza Falcão e colaboradores (2022) foram executados à 50 °C, então não há dados sobre como essa enzima teria se comportado em diferentes temperaturas em seu trabalho.

Dentre as atividades enzimáticas testadas, a atividade de xilanase (Figura 21, B) foi a que, em média, sofreu menor variação de acordo com a temperatura em todos os cultivos testados. Esse resultado era esperado, considerando-se que já foram reportadas diversas xilanases ativas em altas temperaturas na literatura, sendo que a maioria delas atua na faixa entre 40-60 °C (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). A maior variação dessa atividade ocorreu no monocultivo de *A. niger*, onde a menor atividade (obtida em 80 °C) foi 36% menor que a maior atividade, obtida em 50 °C.

Quanto à atividade pectinase (Figura 21, C), os maiores valores foram obtidos por *T. reesei* RUT-C30 em monocultivo e seu co-cultivo simultâneo (0h) com *A. brasiliensis*, ambos em 70 °C. Ao considerar o desvio padrão, podemos dizer que as atividades são as mesmas. Essa atividade foi altamente influenciada pela temperatura. *T. reesei* atingiu valores tão baixos quanto 0,02 UI/mL em 40 °C, mas apresentou um aumento significativo de 3000% (atingindo 0,62 UI/mL) a 70 °C. Já aos 80 °C, *T. reesei* perde basicamente toda sua atividade pectinolítica. A atividade pectinolítica de *T. reesei* já é conhecida desde a década de 80, Haltmeier e colaboradores encontraram pectinases de *T. reesei* QM 9414 (uma versão mutante anterior ao advento de RUT-C30) que atingiam maiores atividades à 60 °C (HALTMEIER et al., 1983). Olsson e colaboradores (2003) também demonstraram que a produção de pectinase em *T. reesei*

RUT-C30 pode variar muito quando o fungo é crescido em diversos substratos, mas não foram feitos testes sobre o efeito de temperatura.

A Figura 21 (D) mostra a atividade de mananase. Para esta atividade, *T. reesei* RUT-C30 apresentou os maiores valores quando o ensaio ocorreu a 70 °C. Os co-cultivos onde *T. reesei* RUT-C30 foi inoculado 24 e 48h antes de *A. brasiliensis*, tiveram efeitos proporcionais ao seu monocultivo em todas as temperaturas estudadas. No entanto, as atividades de mananase obtidas em todas as formulações de mono e co-cultivos obtiveram atividades enzimáticas baixas, o que indica que o bagaço de cana-de-açúcar não é, pelo menos nas condições aqui apresentadas, um bom indutor de atividade mananase para os fungos aqui caracterizados.

A Figura 21 (E) representa a atividade de β -glicosidase. A prática de se utilizar um fungo capaz de produzir β -glicosidase como parceiro de *T. reesei* para suplementar sua deficiência em tal enzima é uma das principais práticas de co-cultivo e já foi empregada em diversos trabalhos, com diferentes graus de sucesso (FANG et al., 2013; RABELLO et al., 2014; ZHAO; DENG; FANG, 2018).

O fungo *A. brasiliensis* apresentou as maiores atividades β -glicolíticas nas temperaturas de 50 e 60 °C. A 60 °C, o co-cultivo simultâneo (0h) entre os dois fungos apresentou atividades semelhantes à *A. brasiliensis*. É interessante notar que a atividade de *A. brasiliensis* se mantém basicamente a mesma em 50 e 60 °C, mas a atividade do co-cultivo simultâneo (0h) é cerca de 30% maior em 60 °C do que a 50 °C. Esse fato, assim como várias outras situações aqui apresentadas, reforçam que os co-cultivos possuem características enzimáticas únicas, complexas e até o momento imprevisíveis, e que não são meramente médias entre as atividades dos fungos participantes, mas sim uma nova composição de coquetel enzimático.

Ainda sobre a atividade β -glicosidase, nota-se que todos os cultivos onde *T. reesei* RUT-C30 foi inoculado em intervalos de 24 e 48h antes de *A. brasiliensis*, resultaram em baixas atividades desta enzima. A inoculação antecipada de *T. reesei* deve induzir a produção de proteases ou metabolitos secundários que dificultam o desenvolvimento de *A. brasiliensis*, o fungo que mais contribui com a atividade β -glicosidase nesse contexto.

A atividade de β -xilosidase foi o maior destaque para o fungo *A. brasiliensis*. Seus monocultivos atingiram valores de aproximadamente 6 UI/mL à 70 °C, atividade muito superior a qualquer outra configuração de cultivo abordada neste trabalho. A segunda maior atividade de β -xilosidase foi apresentada pelo co-cultivo de *A. brasiliensis* inoculado 48h antes de *T. reesei* RUT-C30 nas temperaturas de 60 °C e 70 °C, ambas com valores muito similares quando se considera o desvio padrão. É possível que esse resultado tenha ocorrido, pois as 48 horas de crescimento em monocultivo antes da inoculação do segundo fungo podem ter

permitido um melhor domínio do meio e conseqüentemente uma maior indução enzimática. Como já citado em seção anterior, outros trabalhos já relataram a presença de β -xilosidases termofílicas em *A. brasiliensis* crescido em resíduos agroindustriais (PEDERSEN et al., 2007).

Para a atividade β -galactosidase (Figura 21, G), as maiores atividades foram desempenhadas pelo co-cultivo de *A. brasiliensis* co-cultivado com *T. reesei* RUT-C30 com atraso de 48h (AB + C30 48h). Nesse caso, pode-se observar um claro efeito sinérgico da interação entre os fungos nessa configuração de cultivo: a atividade alcançada pelo co-cultivo é maior do que a soma das atividades dos monocultivos. Por exemplo, na temperatura de 60 °C, onde ocorre a maior atividade, o co-cultivo AB + C30 48h apresentou atividade 46% superior à soma das atividades de *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30. O mesmo efeito sinérgico também ficou evidente, em menor grau, nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C. No entanto, em temperaturas superiores a 70 °C, a atividade β -galactosidase é próxima de zero. Provavelmente a enzima possui baixa estabilidade nessas temperaturas e acaba por desnaturar-se, perdendo sua atividade. Cardoso e colaboradores já reportaram outras espécies de *Aspergillus* (*Aspergillus laticoffeatus*) que também tiveram sua maior atividade entre os 50-60 °C (CARDOSO et al., 2017). No entanto, *A. laticoffeatus* produziu uma pequena quantidade de micotoxinas durante o cultivo (CARDOSO et al., 2017). Apesar do presente trabalho não avaliar a presença de micotoxinas, *A. brasiliensis* é considerado como um fungo não produtor de tais moléculas, algo positivo para futuras aplicações (VARGA et al., 2007). Do ponto de vista industrial, é interessante a presença de β -galactosidases atuantes a 30 °C ou que atuem em temperaturas mais baixas, por serem as condições aplicadas na indústria de laticínios onde essas enzimas são empregadas (SINGH; SAMBYAL, 2022).

O co-cultivo AB + C30 48h pode ser visto como uma potencial nova fonte de β -galactosidases, enzimas que essa que tem enorme potencial econômico na industrial alimentícia (MOVAHEDPOUR et al., 2022). É importante ressaltar que as condições de cultivo estabelecidas nesse trabalho estão longe de serem condições ótimas para a produção enzimática. O substrato utilizado estava em sua forma mais bruta, sendo altamente recalcitrante, dificultando assim a hidrólise e conseqüente liberação de açúcares aos fungos. Como uma perspectiva futura, seria relevante utilizar substratos pré-tratados e otimizar as condições de cultivo como tempo, temperatura e pH utilizando uma metodologia de superfície de resposta para mapear quais os parâmetros cruciais em cada caso (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010; KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010). Reforçando que as condições utilizadas neste trabalho foram intencionais e propunham estudar o comportamento dos fungos

em um ambiente similar ao solo e com um mínimo de custos adicionais do ponto de vista industrial.

Por fim, fica claro ao longo de diversas seções deste trabalho que comparações diretas com a literatura são um desafio em potencial. No melhor de meu conhecimento no momento da escrita deste trabalho, não foram encontradas publicações investigando o efeito de diferentes temperaturas e pHs na atividade enzimática de co-cultivos fúngicos como aqui realizado. Geralmente trabalhos semelhantes limitam-se a avaliar essas características em monocultivos e, como foi aqui demonstrado, os monocultivos não são uma previsão direta e linear do comportamento dos seus co-cultivos. Isso reforça novamente a importância de trabalhos prospectivos como este para melhorar o referencial informativo da área tanto das características de *A. brasiliensis* como de co-cultivos fúngicos no geral. Apenas com mais informações sobre co-cultivos e o efeito de diversos parâmetros na resposta enzimática, será possível fazer um desenho racional de aplicações reais dos co-cultivos na indústria. Nesse sentido, as aplicações ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) serão de fundamental importância em trabalhos futuros, por averiguar de forma mais detalhada as biomoléculas produzidas pelos fungos nos co-cultivos.

Efeito do pH na atividade enzimática dos co-cultivos

Foi averiguado o efeito do pH nas atividades de CMCase e xilanase dos cultivos. O pH do meio é um fator de grande influência na atividade enzimática e por esta razão, diversas reações enzimáticas são executadas em meio com uma solução tampão que potencialize a atividade da enzima. Neste trabalho foi testada a faixa de pH entre 3 e 10, com intervalos de uma unidade entre eles.

A Figura 22 mostra a influência do pH nas atividades de CMCase. Um primeiro ponto a ser destacado é que não se observa o mesmo comportamento nestas atividades enzimáticas como aquele encontrado no nono dia da Figura 19 (A). Isso ocorre pois nos testes representados pela Figura 19 não houve controle de pH, sendo este influenciado pela capacidade de cada fungo ou conjunto de fungos em acidificar ou alcalinizar seu meio. Como neste trabalho não foi medida a progressão do pH no meio de cultivo, não é possível saber em que faixa de pH as amostras da Figura 19 se encontram.

Contudo, quando as condições de pH estão controladas, o co-cultivo simultâneo (0h) entre *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 (AB + C30 0h) apresentou os maiores valores totais dentre os cultivos. O co-cultivo AB + C30 0h apresentou maior desempenho na faixa mais

ácida de pH, algo já esperado e bastante documentado sobre enzimas de fungos filamentosos (KUHAD et al., 2016; SINGHANIA et al., 2017).

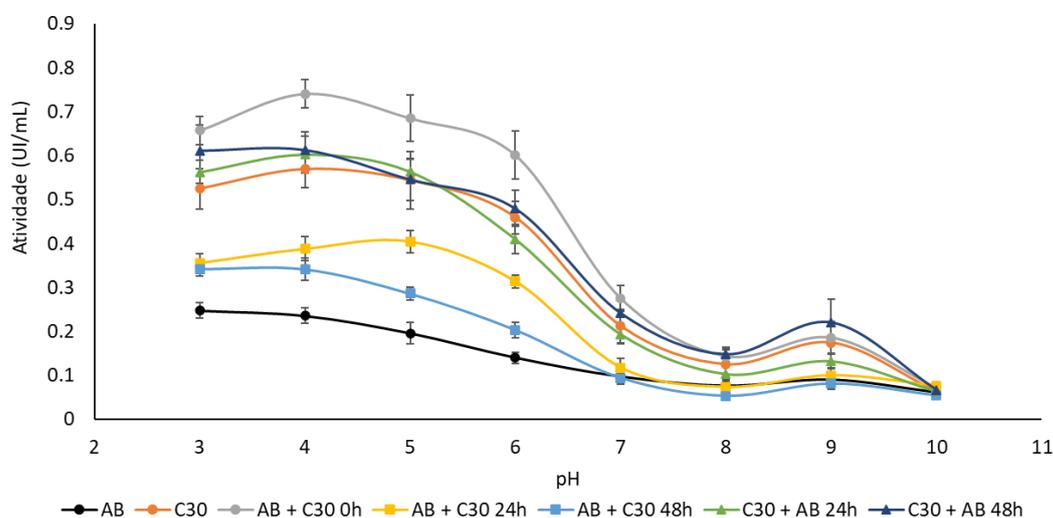


Figura 22 – Efeito do pH na atividade CMCase de diferentes mono e co-cultivos de *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30. AB = *A. brasiliensis*, C30 = *T. reesei* RUT-C30, AB + C30 0h = *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 inoculados simultaneamente, AB + C30 24h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, AB + C30 48h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 48h após o primeiro, C30 + AB 24h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, C30 + AB 48h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 48h após o primeiro. As barras de erros representam o desvio padrão entre três replicatas biológicas. Todos os experimentos apresentaram $p < 0,05$ (ANOVA).

A maior atividade desse cultivo foi atingida no pH 4, onde foi verificada atividade CMCase de 0.74 UI/mL, atividade essa 32% superior ao encontrado no monocultivo de *T. reesei* RUT-C30, fungo esse já consagrado por sua atividade de CMCase. Em toda faixa de pH ácida, ou seja pHs 3, 4, 5 e 6, o co-cultivo AB + C30 0h obteve atividades 25%, 32%, 25% e 33%, respectivamente, maiores do que o monocultivo de *T. reesei*. Situação diferente do que foi encontrado na Figura 19 (sem controle de pH), onde as atividades do monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 e de seus co-cultivos com intervalos de 24 e 48h de inoculação antecipada em relação à *A. brasiliensis* mostraram as maiores atividades dentre os cultivos e com valores muito semelhantes entre si. Essa característica onde o monocultivo de *T. reesei* e seus co-cultivos onde este fungo teve tempo adicional de crescimento de 24 e 48h resultarem em atividades de CMCase parecidas se repetiu. O co-cultivo AB + C30 0h pode ter apresentado maiores atividades devido ao sinergismo entre celulases dos dois fungos. Como já destacado anteriormente, *T. reesei* é uma cepa conhecida por sua baixa produção de β -glicosidases (RANA et al., 2014), enquanto *A. brasiliensis* mostrou-se um potencial produtor desta enzima. O cultivo simultâneo destes dois fungos pode ter criado uma situação de complementariedade enzimática resultando no – possível – sinergismo que aumentou a eficiência hidrolítica. O

sinergismo entre as diversas atividades de celulases como endocelulases (CMCases), celobiohidrolases e β -glicosidasas é crucial para a desconstrução do polímero de celulose (HENRISSAT et al., 1985; ZHANG; ZHANG, 2013). Logo, é possível que a β -glicosidase de *A. brasiliensis* tenha aliviado a inibição por produto causada pela celobiose em outras enzimas celulolíticas (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016), aumentando assim a eficiência da degradação da CMC neste experimento.

Para todos os cultivos testados, a atividade enzimática foi negativamente afetada por pHs neutros ou alcalinos. Nenhum dos co-cultivos apresentou incrementos significantes de atividade em relação aos seus monocultivos em pHs alcalinos. O resultado da Figura 22 é positivo do ponto de vista industrial onde controla-se o pH do meio onde a reação enzimática está ocorrendo. Nessas condições reacionais controladas, os co-cultivos simultâneos entre *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 se posicionam como uma alternativa digna de otimização dentro das peculiaridades de cada aplicação industrial.

Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pelos extratos brutos dos co-cultivos fúngicos

Foi realizado um experimento de sacarificação para avaliar a capacidade dos extratos brutos provenientes dos mono e co-cultivos de hidrolisarem a recalcitrante parede celular do bagaço de cana-de-açúcar. Os experimentos ocorreram em intervalos de 4, 8, 12 e 24h e os resultados podem ser vistos na Figura 23.

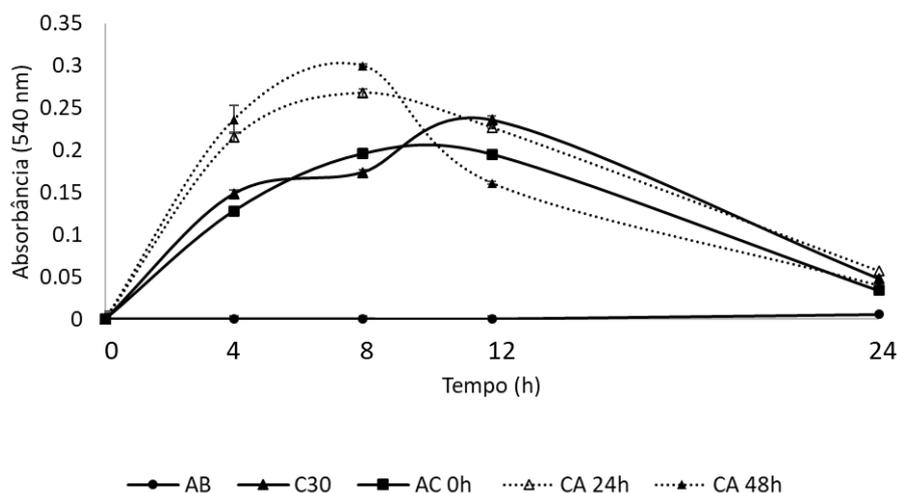


Figura 23 – Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar não pré-tratado por mono e co-cultivos de *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30. O eixo y mostra a absorvância em 540 nm, uma medida indireta da quantidade de açúcares redutores liberados de acordo com o método de Miller (1959). AB = *A. brasiliensis*, C30 = *T. reesei* RUT-C30, AC 0h = *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 inoculados simultaneamente, CA 24h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, CA 48h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 48h após o primeiro. As barras de erros representam o desvio padrão entre três replicatas biológicas. Todos os experimentos apresentaram $p < 0,05$ (ANOVA).

Nas primeiras 8 horas de hidrólise, todos os cultivos, com exceção do monocultivo de *A. brasiliensis*, apresentaram capacidade hidrolítica. Essa capacidade foi quantificada pela detecção do reagente de Miller na faixa de 540 nm pelo espectrofotômetro, sendo esse um indicador da presença de açúcares redutores no meio. Foram feitos controles para garantir que os açúcares redutores não adivinham do extrato bruto ou estavam sendo liberados espontaneamente pelo bagaço de cana-de-açúcar. A incapacidade de *A. brasiliensis* em hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar sob as condições aqui apresentadas foi discutida na seção dedicada ao monocultivo desse fungo. Os cultivos de *T. reesei* RUT-C30 inoculado 24 e 48h antes de *A. brasiliensis* performaram melhor que o monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 até o período de 8 horas. Estes cultivos obtiveram liberação de açúcares redutores 52% (para 24h) e 70% (para 48h) superiores às identificadas no monocultivo de *T. reesei*.

Como comentado previamente, os co-cultivos possuem o potencial de criar uma situação de sinergismo entre as atividades enzimáticas dos fungos participantes. Van Dyk e Pletschke (2012) analisaram diversos estudos de sinergismo e concluíram que em substratos mais recalcitrantes ou cristalinos (como o material lignocelulósico sem pré-tratamento aqui utilizado), a influência de sinergismo é mais importante, quando comparada a substratos mais acessíveis e menos resistentes à hidrólise. Com esses resultados, uma hipótese onde estejam ocorrendo complementariedades de atividades enzimáticas entre os fungos, criando uma situação de sinergismo durante a hidrólise, é fortalecida.

Como a hidrólise é realizada com extratos brutos enzimáticos, diversas atividades enzimáticas estão ali presentes. Além das celulasas, outras enzimas como as xilanases podem influenciar na hidrólise total do material lignocelulósico, atuando de forma sinérgica com as celulasas mesmo que tais enzimas atuem sobre polissacarídeos distintos (BAJAJ; MAHAJAN, 2019). A degradação de porções hemicelulósicas, como a xilana, permite maior acesso à celulose por parte das celulasas. É possível, também, que os co-cultivos forcem a expressão de enzimas auxiliares, que modificam a estrutura da celulose sem hidrolisá-la, facilitando assim o acesso e hidrólise para outras enzimas (KIM et al., 2014). Outros experimentos seriam necessários para confirmar tal hipótese.

Após as primeiras 8 horas de cultivo, a detecção de açúcares redutores começou a cair, algo que não era esperado. Não foi possível averiguar a fundo a razão desse comportamento, mas algumas hipóteses podem ser levantadas: primeiramente pode ter ocorrido algum tipo de contaminação dos tubos de hidrólise, seja pelo crescimento dos próprios fungos envolvidos, seja pelo aparecimento de bactérias. Não foi detectada nenhuma turbidez ou mal cheiro advindo dos tubos de hidrólise, ambas características gerais de contaminação bacteriana. Apesar de

ocorrer esterilização dos instrumentos utilizados e a filtração em membrana sintética de 0.22 µm para remover células dos extratos brutos contendo as enzimas, a possibilidade de contaminação não pode ser descartada.

Outra hipótese para a queda na concentração de açúcares redutores a partir do período de 8 horas pode ser dada pela ocorrência de reações de transglicosilação. Tais reações ocorrem quando, dada uma certa concentração de açúcares como glicose e celobiose no meio, as enzimas que geralmente hidrolisam ligações glicosídicas começam realizar o oposto, construindo sacarídeos maiores ao invés de hidrolisá-los. Estas reações não necessariamente são equivalentes idênticas à reação reversa da enzima e existem casos na literatura onde β-glicosidases produziram o dissacarídeo sofrorose via transglicosilação, por exemplo (VAHERI; LEISOLA; KAUPPINEN, 1979). Na publicação de Vaheri, Leisola e Kauppinen, celulases de *T. reesei* realizaram reações de transglicosilação. Todas as formulações aqui testadas possuíam a presença de *T. reesei*, com exceção do monocultivo de *A. brasiliensis*. Apesar de não terem sido encontrados trabalhos sobre transglicosilação em *A. brasiliensis*, este fenômeno já foi reportado anteriormente ocorrendo com enzimas do fungo *A. niger*, um parente próximo da cepa utilizada neste trabalho (BOHLIN et al., 2013).

O mesmo fenômeno também ocorreu por ocasião de outro experimento de sacarificação realizada anteriormente em nosso laboratório, onde o mesmo padrão de aumento na detecção de açúcares redutores seguido de sua queda após as primeiras 8 ou 12 horas. Nesta ocasião anterior, os experimentos foram repetidos 3 vezes, inclusive com as duas últimas repetições ocorrendo na presença de azida sódica, um importante inibidor de crescimento microbiano. Mesmo assim, o padrão na queda de detecção de açúcares redutores se manteve, o que reforça a hipótese da transglicosilação (SPERANDIO, 2018).

Não foram realizados experimentos com os co-cultivos de *A. brasiliensis* inoculado 24 e 48h antes de *T. reesei* RUT-C30. Isso ocorreu pois estes cultivos apresentaram baixa concentração de proteínas, e os tubos plásticos padronizados para a hidrólise não suportariam o volume necessário para a carga enzimática utilizada como padrão. Como perspectiva futura, é possível realizar a concentração desses extratos brutos, seguida da quantificação de proteínas e depois alocação da carga proteica necessária no experimento de hidrólise. Tal experimento não foi realizado por questões de tempo de finalização deste trabalho, mas poderão ser feitos em ocasião futura para publicação dos artigos finais.

Este efeito já foi observado em celulases 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.

Gel de eletroforese SDS-PAGE

A fim de se estabelecer uma comparação visual sobre o perfil proteico característico de cada formulação de monocultivo e co-cultivo, foi realizado um gel de eletroforese tipo SDS-PAGE. Essa técnica consiste em um gel desnaturante, que separa as proteínas de acordo com seu tamanho. Os resultados do perfil proteico para os cultivos avaliados encontram-se na Figura 24.

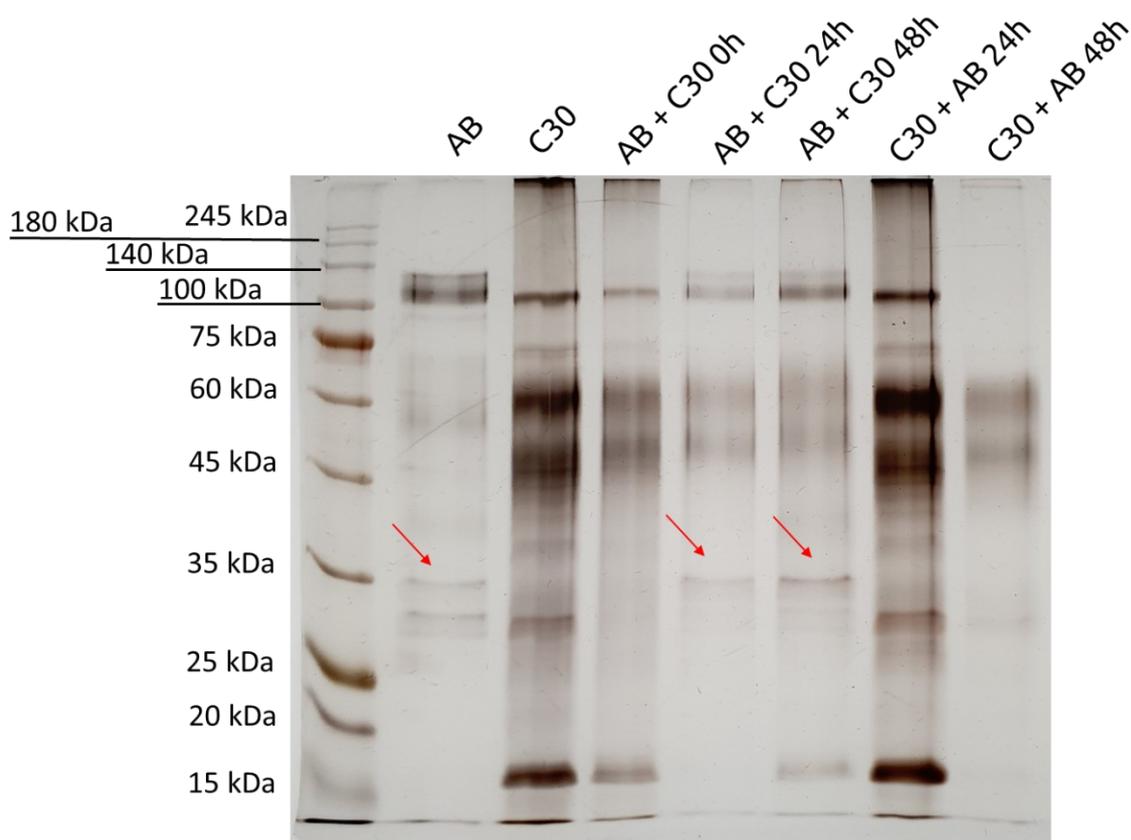


Figura 24 – Gel SDS-PAGE com os perfis proteicos dos monocultivos e co-cultivos entre *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30. Na primeira coluna encontra-se o marcador, com padrões definidos em kDa. AB = *A. brasiliensis*, C30 = *T. reesei* RUT-C30, AB + C30 0h = *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 inoculados simultaneamente, AB + C30 24h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, AB + C30 48h = *A. brasiliensis* + *T. reesei* RUT-C30 com o último sendo inoculado 48h após o primeiro, C30 + AB 24h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 24h após o primeiro, C30 + AB 48h = *T. reesei* RUT-C30 + *A. brasiliensis* com o último sendo inoculado 48h após o primeiro. As setas vermelhas destacam uma banda de 35 kDa característica de *A. brasiliensis* que está presente nos co-cultivos de AB + C30 24h e 48h, mas não visível em outras combinações.

Fica evidente pela Figura 24 que todos os cultivos que envolvem o fungo *T. reesei* RUT-C30 apresentam, visualmente, um perfil proteico semelhante ao encontrado no monocultivo

deste fungo. Algumas faixas encontradas no monocultivo de *T. reesei* RUT-C30 (entre 35 e 25 kDa) não são facilmente identificadas nos co-cultivos simultâneos e naqueles onde ocorre inoculação anterior por 24 ou 48h de *A. brasiliensis*. Pode-se ainda ressaltar que existe uma banda de aproximadamente 35 kDa presente no monocultivo de *A. brasiliensis* que também é encontrada nos cultivos onde *A. brasiliensis* é inoculado com 24 e 48h de antecedência em relação ao *T. reesei* RUT-C30 (Figura 24, setas vermelhas), mas a mesma faixa não é encontrada no co-cultivo simultâneo e nem nos co-cultivos onde *T. reesei* RUT-C30 é inoculado com qualquer antecedência.

Os resultados obtidos por este experimento servem para demonstrar o efeito que cada fungo possui na composição proteica de um extrato bruto quando em regime de co-cultivo. É marcante a forma como os co-cultivos se assemelham ao monocultivo de *T. reesei* RUT-C30, no entanto, diferentes tempos de inoculação antecipada para cada fungo resultaram em perfis com algumas diferenças visíveis.

Uma perspectiva futura para este experimento é a identificação, via espectrometria de massas, das proteínas presentes em bandas de interesse no gel. Entender quais proteínas estão presentes em cada banda e sua presença ou ausência em determinados cultivos pode ajudar a compreensão sobre como se dão as relações fúngicas em regime de co-cultivo dentro dos parâmetros aqui estabelecidos.

Perspectivas futuras e Conclusão

Neste trabalho foram realizadas as curvas de indução enzimática, que demonstraram o desenvolvimento das atividades enzimáticas ao longo de nove dias em regimes de mono e co-cultivo, bem como o efeito de diferentes tempos de inoculação nessas mesmas atividades. Também foi realizada análise dos efeitos da temperatura sobre as sete atividades enzimáticas estudadas e a caracterização quanto ao efeito do pH na atividade CMCase.

Para que fosse possível avaliar o impacto dos co-cultivos foi preciso primeiro caracterizar os monocultivos. Ao realizar tal tarefa, este trabalho contribuiu para a caracterização de um fungo muito pouco estudado: *A. brasiliensis*. Fungo este isolado diretamente de amostras de solo do Cerrado brasileiro e que mostrou potencial para produção de diversas enzimas de valor industrial, como a β -xilosidase e a β -galactosidase.

Também foi avaliado o efeito que intervalos de inoculação entre os fungos causariam no cultivo. Foi percebido que diferentes tempos de inoculação nos co-cultivos produziram perfis totalmente diversos, mostrando a importância de averiguar-se esse parâmetro ao desenhar experimentos de co-cultivo. Os diferentes padrões de produção enzimática

provavelmente devem-se a influência que cada fungo emana para o meio de cultivo, seja na forma de mudanças de pH, na secreção de moléculas inibidoras e até mesmo na alteração de sua expressão gênica.

Foi demonstrado que os co-cultivos tem o potencial de aumentar atividades enzimáticas nos extratos brutos de fungos filamentosos, sendo assim uma tecnologia vantajosa e de fácil implementação na indústria de produção enzimática. Apenas como exemplo, pode-se destacar o desempenho 32% superior dos co-cultivos simultâneos entre *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 em relação ao monocultivo do último fungo na atividade de CMC_{Case} em pH 4. Também pode-se revisitar o desempenho dos co-cultivos simultâneos entre *A. brasiliensis* e *T. reesei* RUT-C30 com intervalos de 24 e 48h de inoculação, que liberaram de 50 a 70% mais açúcares redutores durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. O trabalho demonstrou a eficiência dos co-cultivos no desempenho de certas atividades enzimáticas, mas também mostrou que para outros casos, a prática de co-cultivos pode não ser vantajosa e até diminuir certas atividades enzimáticas, sendo que cada formulação de cultivo deve ser testada e pensada para uma aplicação específica.

Ao longo de todos os experimentos aqui realizados, fica claro um determinado padrão quando se trabalha com co-cultivos: não existe padrão. Os experimentos de co-cultivos fúngicos são altamente imprevisíveis no sentido que ainda não existe informação suficiente na literatura para entender como os fungos irão interagir sob as condições de cultivo. Logo, é desafiador prever como a interação afetará o desempenho da meta desejada, seja a produção de uma enzima ou um metabólito específico.

O desenvolvimento de novos estudos que avaliem os co-cultivos sob a lente das análises ômicas será fundamental para que este campo de estudo deixar de ser executado por vias de “tentativa e erro” e possa ter um desenho racional e maior previsibilidade de seus resultados. Essa situação foi discutida em publicação anterior (SPERANDIO; FILHO, 2019), onde conclui-se que além das análises ômicas, a literatura também é carente de trabalhos como este, que averiguem o efeito de diferentes fatores como temperatura e pH nos co-cultivos. Além disso, os perfis enzimáticos em co-cultivos são altamente variáveis na literatura. Seja por variações nas condições de cultivo ou variações na forma de calcular e reportar atividades enzimáticas, é sempre um desafio fazer paralelos seguros entre publicações. Ambas as situações contribuem para uma grande barreira ao tentar comparar resultados obtidos neste trabalho com publicações anteriores.

Com isso, conclui-se que o presente trabalho, baseado nos resultados obtidos e publicados até agora, é de importante contribuição para o campo de co-cultivos fúngicos por

abordar parâmetros de caracterização enzimática que ainda são escassos na literatura internacional e por utilizar um fungo pouco caracterizado como *A. brasiliensis*.

ANEXO I

(Clique duas vezes na imagem da página abaixo para abrir o mini-review)

Applied Microbiology and Biotechnology (2021) 105:3019–3025
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11261-7>

MINI-REVIEW



An overview of *Trichoderma reesei* co-cultures for the production of lignocellulolytic enzymes

Guilherme Bento Sperandio¹ · Edivaldo Ximenes Ferreira Filho¹

Received: 9 February 2021 / Revised: 19 March 2021 / Accepted: 30 March 2021 / Published online: 7 April 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Biorefineries are core facilities for implementing a sustainable circular bioeconomy. These facilities rely on microbial enzymes to hydrolyze lignocellulosic substrates into fermentable sugars. Fungal co-cultures mimic the process of natural biodegradation and have been shown to increase certain enzyme activities. *Trichoderma reesei* and its many mutant strains are major cellulase producers and are heavily utilized as a source of carbohydrate-active enzymes. Several reports have demonstrated that *T. reesei* co-cultures present higher enzyme activities compared with its monocultures, especially in the context of β -glucosidase activity. The performance of *T. reesei* during co-culturing has been assessed with several fungal partners, including *Aspergillus niger*, one of the most recurrent partners. Various aspects of co-cultivation still need further investigation, especially regarding the molecular interactions between fungi in controlled environments and the optimization of the resulting enzyme cocktails. Since plenty of genetic and physiological data on *T. reesei* is available, the species is an outstanding candidate for future co-culture investigations. Co-cultures are still a developing field for industrial enzyme production, and many aspects of the technique need further improvement before real applications.

Key points

- *T. reesei* co-cultures are an alternative for producing lignocellulolytic enzymes.
- Several reports suggest an increase in certain enzyme activities in co-cultures.
- More in-depth investigations of co-cultures are necessary for advancing this field.

Keywords Co-culture · *Trichoderma reesei* · Lignocellulose · Lignocellulolytic enzymes

Introduction

As awareness of environmental problems caused by the linear fossil-based economy grows, society is slowly moving towards a more circular bioeconomy. Lignocellulosic biorefineries are core facilities for this new model, utilizing lignocellulosic residues to produce new biotechnological products in a sustainable manner (Silva et al. 2017). Biorefineries rely on enzymes to decompose plant residues into fermentable sugars. Such enzymes generally come from microbial sources, such as bacteria and fungi (Adrio and Demain 2014). The fungus *Trichoderma reesei* is a major

workhorse in the carbohydrate-active enzyme industry. The industrial strain *T. reesei* RUT-C30 is utilized for its outstanding production of cellulases, sometimes yielding approximately 100 g L⁻¹ of protein in submerged cultures (Bischof et al. 2016).

Cellulases are a generic denomination for enzymes specialized in deconstructing cellulose, the major component of plant cell walls, and thus, the major component of lignocellulosic feedstocks (LCFs). These lignocellulosic materials are the most suitable substitutes for fossil fuels because of their versatility and sustainability. A great challenge in the new bioeconomy is the conversion of lignocellulosic biomass into fermentable sugars, which in turn can be converted into biofuels and other bioproducts. This objective is, however, often hindered by the cost of the enzymes.

Not even *T. reesei* and its many mutant strains are perfect cellulose degraders. It is well known that the production of β -glucosidase, the enzyme responsible for hydrolyzing

Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
eximenes@unb.br

¹ Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil



ANEXO II

(clique duas vezes na imagem para abrir o arquivo em uma nova janela)

International Biodeterioration & Biodegradation 142 (2019) 109–123

Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibid

Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review

Guilherme Bento Sperandio, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho*

Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Co-cultures
Fungi
Interactions
Biorefineries
Bio-ecoenery
Lignocellulosic ethanol

ABSTRACT

Lowering the price of enzymes is one of the key challenges to establish the full potential of lignocellulosic biorefineries. Lignocellulosolytic enzymes are used to deconstruct the complex plant cell wall, releasing fermentable sugars that can be further used in the production of lignocellulosic ethanol. Countries like Brazil, India, and China are already blending or considering blending ethanol in different proportions to gasoline, to be used in combustion engines. Fungal co-cultures are an alternative way of producing lignocellulosolytic enzymes. In this review, we discuss the use of fungal co-cultures as an alternative for the on-site production of lignocellulosolytic enzymes. The basic concepts and applications of fungal co-cultures are presented, covering most used strains, systems, advances achieved and challenges ahead. Co-cultures are an alternative technique to produce carbohydrate-active enzymes, and several studies highlighted here demonstrate their potential to contribute to the expansion of lignocellulosic biorefineries. However, there are still several aspects of fungal co-cultures that are not understood and need to be addressed to enable fungal co-cultures for commercial enzyme production. The necessity for more detailed studies, especially regarding the molecular interactions between participant fungi, are stressed in the article.

1. Introduction

The world's population is continuously growing, demanding massive amounts of energy, fuels, and chemicals to supply its lifestyle. Not only that, but the current conjuncture of our society can rely no more on non-renewable and high pollutant sources of energy. The establishment of a new circular economic model is highly necessary to reduce our overall footprint on the planet, especially in the light of rising anthropogenic climate change (Liguori and Faraco, 2016). Therefore, the use of alternative renewable sources of energy is a major scientific-industrial challenge and social demand.

In this context, the use of lignocellulosic biomass as a raw material to be used in biorefineries for the production of bioenergy, chemicals, and enzymes has gained strength in recent years (Liguori and Faraco, 2016). Lignocellulosic feedstocks may come from a broad range of different sources such as wood, sugarcane bagasse, corn straw, corn cobs, wheat bran and straw, fruit peels and wastes, and even from office paper waste and newspapers (Ferreira et al., 2016; Guerfali et al., 2015).

The biorefinery (more specifically the sugar platform biorefinery or lignocellulosic feedstock biorefinery) is defined as a facility that is capable of converting lignocellulosic materials such as those aforementioned into bioenergy, and chemicals of potential industrial significance (Reithauer and Studer, 2015; Kamm and Kamm, 2004).

The biorefinery relies on different strategies to deconstruct the recalcitrant plant cell wall of the lignocellulosic materials and its main components (cellulose, hemicellulose, and lignin) into fermentable sugars. One of these strategies is to employ an arsenal of cell wall active enzymes from microorganisms, such as filamentous fungi (Gupta et al., 2016). However, a single organism (either natural or engineered) can hardly harbor the whole variety of enzymes needed for the total deconstruction of cell wall components. As an example, strains of *Trichoderma* genus (one of the dominant genus used in industrial enzyme production) are relatively low in β -glucosidase activity (Oksa, 2014) and most ascomycetes lack the ability to deconstruct and metabolize lignin (Ferreira et al., 2016), being the white-rot basidiomycetes more suitable organisms for the latter task (Higuchi, 2004; Maciel et al., 2010).

To overcome this issue, some research has been done in the field that will be referred to here as 'co-culture.' The basic idea is to use two or more distinct microorganisms in the same culture to obtain a synergistic (or at least an additive) effect that will influence the outcome. The desired goal can be an improvement in the deconstruction of the plant cell wall, a more diverse and efficient enzymatic cocktail or even

Abbreviations: BG, β -glucosidase; Cxymes, carbohydrate-active enzymes; GH, cellulohydrolyase; EG, exoglucanase; Ssf, Submerged Fermentation; Ssf, Solid state fermentation

* Corresponding author.
E-mail address: eximenes@unb.br (E.X. Ferreira Filho).

<https://doi.org/10.1016/j.ibid.2019.05.014>
Received 7 December 2018; Received in revised form 14 May 2019; Accepted 14 May 2019
0964-8305/© 2019 Published by Elsevier Ltd.

Referências Bibliográficas

- 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>>.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 1, p. 41–46, 2008.
- ALVES, E. et al. Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1097–1101, 2010.
- 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.
- BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21–22, p. 8711–8724, 2019.
- BARAC, A. et al. Chronic pulmonary aspergillosis update: A year in review. **Medical Mycology**, v. 57, p. S104–S109, 2019.
- BAZAFKAN, H.; TISCH, D.; SCHMOLL, M. Regulation of Glycoside Hydrolase Expression in *Trichoderma*. In: GUPTA, V. K. et al. (Eds.). . **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 291–308.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.
- 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.
- 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.
- 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.

BORIN, G. P. et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–20, 2015.

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.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120–128, 2010.

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.

BUDENKOVA, E. et al. Improvement of Enzymatic Saccharification of Cellulose-Containing Raw Materials Using *Aspergillus niger*. **Processes**, v. 9, n. 8, p. 1360, 3 ago. 2021.

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

CARDOSO, B. B. et al. β -galactosidase from *Aspergillus laticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 67–74, 2017.

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.

CATANZARO, R.; SCIUTO, M.; MAROTTA, F. Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Nutrition Research**, v. 89, p. 23–34, 2021.

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. **Scientific African**, v. 8, p. e00398, 2020.

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, D. A. L. **CARACTERIZAÇÃO DE MANANASES PRODUZIDAS POR *Clonostachys byssicola* QUANDO CRESCIDO EM CASCA DE GRÃO DA SOJA.** [s.l.] Universidade de Brasília - UnB, 2013.
- 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.
- 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 FALCÃO, L. et al. Improvement of endoglucanase production by *Aspergillus brasiliensis* in solid-state fermentation using cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) residue as substrate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 4, p. 2859–2869, 2022.
- 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.
- DUFF, S. J. B.; COOPER, D. G.; FULLER, O. M. Cellulase and beta-glucosidase production by mixed culture of *Trichoderma reesei* RUTC30 and *Aspergillus phoenicis*. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 3, p. 185–190, 1985.
- ELLILÄ, S. et al. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.
- 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.].
- 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.
- FAO, F. AND A. O. OF THE U. N. **Production of Sugar cane: top 10 producers.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/beta/en/>>.
- FERREIRA, J. A. et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334–345, 2016.

FLOUDAS, D. et al. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1715–1719, 29 jun. 2012.

GOURLAY, K. et al. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 498–503, 2013.

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.

GUTIÉRREZ-CORREA, M.; VILLENA, G. K. Batch and repeated batch cellulase production by mixed cultures of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* or *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 6, p. 929–935, 2012.

HALTMEIER, T. et al. Pectinase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 6, p. 1685–1690, jun. 1983.

HATTI-KAUL, R. Biorefineries - a path to sustainability? **Crop Science**, v. 50, n. April, 2010.

HENRISSAT, B. et al. Synergism of cellulases from *trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. **Bio/Technology**, v. 3, n. 8, p. 722–726, 1985.

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.

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.

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.

KHURI, A. I.; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 2, p. 128–149, 2010.

KIM, I. J. et al. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8469–8480, 2014.

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

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.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 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.

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**, v. 215, p. 13–20, 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.

MAHESHWARI, D. K. et al. Paper-Mill Sludge as a Potential Source for Cellulase Production by *Trichoderma-Reesei* Qm-9123 and *Aspergillus-Niger* Using Mixed Cultivation. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, n. 3, p. 161–163, 1994.

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.

MENEZES, B. DA S. et al. Comparative production of xylanase and the liberation of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass by *Aspergillus brasiliensis* BLf1 and recombinant *Aspergillus nidulans* XynC A773. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 2110–2118, 2018.

MENEZES, B. DA S.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 0, 2017.

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

MONCLARO, A. V.; FILHO, E. X. F. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases 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 monooxygenase family. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 471–481, 2014.

MOVAHEDPOUR, A. et al. β -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 612–628, 2022.

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.

NORDBERG KARLSSON, E. et al. Endo-xylanases as tools for production of substituted

xylooligosaccharides with prebiotic properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 21, p. 9081–9088, 2018.

NOVACANA. **Usinas no Brasil**. Disponível em: <https://www.novacana.com/usinas_brasil>. Acesso em: 25 abr. 2020.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119–124, 2016.

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 β -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1581–1598, 2014.

OLSSON, L. et al. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 612–619, 2003.

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.

PAVLENKO, N. Failure to Launch: Why Advanced Biorefineries Are So Slow to Ramp Up Production. **International Council on Clean Transportation**, p. 2, 2018.

PEDERSEN, M. et al. Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 743–748, 2007.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - Thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 58–68, 2012.

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.

QIAO, F.; QIAO, N. Circular Economy: An Ethical and Sustainable Economic Development Model. **Prakseologia**, n. 154, p. 253–272, 2013.

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.

RAÍZEN. **Relatório Anual 2018/2019**. [s.l: s.n.].

RANA, V. et al. On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 282–289, 2014.

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.

SALOHEIMO, M. et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4202–4211, 2002.

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.

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

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.

SILVA, C. D. O. G. Tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar como ferramenta para aumentar a produção de holocelulases por *Aspergillus niger*. p. 192, 2018.

SILVA, C. DE 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. DE O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, p.

1–13, 2017.

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.

SINGH, R. V.; SAMBYAL, K. β -Galactosidase as an Industrial Enzyme: Production and Potential. **Chemical Papers**, v. 2, n. Husain 2010, 2022.

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.

SØRENSEN, A. et al. Fungal beta-glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 612–631, 2013.

SPERANDIO, G. B. **Estudos dos perfis enzimáticos de Trichoderma reesei RUT-C30 e 9414 em co-culturas com fungos do gênero Aspergillus e Phanerochaete**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2018.

SPERANDIO, G. B.; FILHO, E. X. F. Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 142, n. December 2018, p. 109–123, 2019.

SPERANDIO, G. B.; FILHO, E. X. F. An overview of Trichoderma reesei co-cultures for the production of lignocellulolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 8, p. 3019–3025, 2021.

SULYMAN, A. O.; IGUNNU, A.; MALOMO, S. O. Isolation, purification and characterization of cellulase produced by Aspergillus niger cultured on Arachis hypogaea shells. **Heliyon**, v. 6, n. 12, p. e05668, 2020.

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

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

UNICA, U. DA I. DE C.-A. **Produção de Etanol Total safra 2018/2019**. Disponível em: <<https://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e->

moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>.

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.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

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

VARGA, J. et al. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1925–1932, 2007.

VAZ, P. R. Estudos de imobilização de pectinase de *Aspergillus terreus*. p. 1–155, 2019.

VESTH, T. C. et al. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section *Nigri*. **Nature Genetics**, v. 50, n. 12, p. 1688–1695, 2018.

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

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87–112, 1988.

ZAMIL, M. S.; GEITMANN, A. The middle lamella - More than a glue. **Physical Biology**, v. 14, n. 1, 2017.

ZHANG, X.-Z.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In: YANG, S.-T.; EL-ENSHASY, H. A.; THONGCHUL, N. (Eds.). . **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2013. p. 131–146.

ZHAO, C.; DENG, L.; FANG, H. Mixed culture of recombinant *Trichoderma reesei* and

Aspergillus niger for cellulase production to increase the cellulose degrading capability.
Biomass and Bioenergy, v. 112, n. March, p. 93–98, 2018.