Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G

Vanessa Alves Lima Rocha

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

Simon McQueen Mason, *PhD* (University of York/Inglaterra)

Rio de Janeiro

2014

Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G

Vanessa Alves Lima Rocha

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Ciências (*DSc.*).

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

Simon McQueen Mason, *PhD* (University of York/Inglaterra)

Rio de Janeiro

2014

Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G

Vanessa Alves Lima Rocha

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Ciências (*DSc.*).

Aprovada em 02 de abril de 2014.

_____

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* – EQ/UFRJ (Orientador – Presidente da banca)

_____

Denise Maria Guimarães Freire, DSc– IQ/UFRJ

_____

Fernando Araripe Gonçalves Torres, *PhD*– DBC-ICB/UNB

_____

Aline Machado de Castro, DSc– CENPES/PETROBRAS

_____

Maria Antonieta Peixoto G. Couto, DSc– EQ/UFRJ

_____

Priscila Filomena F. Amaral, DSc – EQ/UFRJ

CIP –Catalogação na publicação

Rocha, Vanessa Alves Lima
R672c Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G / Vanessa Alves Lima Rocha. -- Rio de Janeiro, 2014.
272 f.

Orientador: Nei Pereira Jr.
Coorientador: Simon McQueen Mason.
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Coordenação dos Programas de Pós-Graduação em Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2014.

1. *Trichoderma harzianum.* 2. caracterização proteômica. 3. bagaço de cana. 4. hidrólise enzimática. 5. Etanol 2G. I. Pereira Jr., Nei , orient. II. McQueen Mason, Simon, coorient. III. Título.

Esteja eu longe ou perto,

eles estão sempre presentes em minha vida.

Aos meus pais, Valdir e Vera,

e à minha irmã Viviane,

dedico esta tese.

'A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original'.

Albert Einstein

Agradecimentos

Com certeza, durante os anos de doutorado, muitas pessoas passam pela nossa vida e contribuem para o nosso crescimento, tanto profissional quanto pessoal. Portanto, quero registrar meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar a Deus, que está sempre comigo me dando força, e a vida – o bem mais preciso que o ser humano pode ter.

Aos meus pais, Valdir e Vera, e à minha irmã Viviane por estarem sempre presentes em minha vida, da maneira mais bela, com amor.

Ao professor Nei, grande pesquisador e mestre, homem de visão, grande exemplo de dedicação profissional, que nas suas 100 teses orientadas e publicações nacionais e internacionais, trouxe grande contribuição ao desenvolvimento da Ciência no Brasil. Professor, que por sua vasta experiência científica consegue enxergar longe, a quem agradeço os inúmeros ensinamentos, levando-me a enxergar os resultados obtidos de maneira mais profunda e mais bela. Agradeço também por todo o apoio para eu ir fazer doutorado sanduíche na Inglaterra, o que com certeza contribuiu enormemente para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Simon McQueen Mason, da University of York, por me receber excepcionalmente bem em seus laboratórios, por todo o seu apoio e acompanhamento durante o período de doutorado sanduíche na Inglaterra. Sua serenidade em meio a tantos compromissos e atribuições nacionais e internacionais foi um grande exemplo para mim.

Ao Dr. Leonardo Gomez, coordenador do grupo de pesquisa, que de igual modo me recebeu muito bem na University of York, a quem agradeço por todo apoio e conselhos durante o meu período em York.

Ao grande amigo Roberto Maeda, da UFRJ, pelos inúmeros ensinamentos em laboratório, por sua sincera amizade e momentos divertidos vividos no dia a dia.

À grande amiga Carolina Barcelos, da UFRJ, por sua amizade, risadas e momentos alegres que vivemos.

Ao grande amigo Marcelo Kern, da University of York, exemplo de profissionalismo, a quem tenho uma enorme gratidão por todos os ensinamentos em laboratório durante o doutorado sanduíche e por sua agradável amizade.

À Luisa Elias, exemplo de profissionalismo e de vida, por toda a ajuda, simpatia e ensinamentos no laboratório da University of York.

À Anna Szczepanska, Susannah Bird, Katrin Besser e William Eborall, da University of York, pelas dicas no laboratório.

Ao Gabriel Betancur, da UFRJ, pelos valiosos ensinamentos em laboratório.

Às minhas queridas amigas Cristiane Silva, Marina Bernardino, Liliane Farcha, Suellen Kso, Emili Martins, Ana Paula Oliveira e Katia Fernandes por todos os momentos preciosos durante esta caminhada.

Ao Elton Wagner, por todos os momentos preciosos vividos em família.

À Maria Budarina e sua família, por me acolherem e me hospedarem tão bem em York, pelos ótimos momentos que vivemos e pela amizade.

À Monica Bandeira e sua família por me receberem tão bem na minha chegada em York e pela hospitalidade.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos da UFRJ pela agradável convivência durante este período: Lys Mangia, Mariana Faber, Daiana Wrischall, Bia Marci, Felipe Oliveira, Paulo Iiboshi, Patrycia Garcia, Camylle Schelliga, Monica Gravina, Johanna Mendez, Mariana Mello, Danielle Silveira, Luis André e Tulio Menezes.

Aos estagiários que trabalharam comigo e muito se empenharam: Pedro Domingues, Mariana Fonseca, Ana Carolina Santana e Letícia Felix.

Aos amigos e colegas de laboratório da University of York: Lynda Santy, Dana Sabir, Rachael Simister, Maria Razalan, Giulia Paggiola, Joe Bennet, Nicola Oates, Kyriakos Kzafestas, Maggie Zhu, Poppy Marriott, Rafael Marques e Clare Steele-King pela agradável convivência.

Aos professores da pós-graduação da Escola de Química por sua contribuição em minha formação.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação da Escola de Química, Roselee e Julio, pelo grande profissionalismo e por todo o auxílio durante esses anos.

À CAPES pela bolsa de doutorado no Brasil.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche.

Ao governo brasileiro pela excelente iniciativa de realizar o Programa Ciência sem Fronteiras.

À PETROBRAS pelo apoio financeiro ao LADEBIO da UFRJ.

RESUMO

Rocha, Vanessa Alves Lima. **Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G.** Rio de Janeiro, 2014. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014. Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ) e Simon McQueen Mason, *PhD* (University of York/Inglaterra)

O Brasil tem avançado no desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol de segunda geração, contudo, um dos principais gargalos tecnológicos deste processo relaciona-se à dependência de empresas estrangeiras quanto à produção de enzimas necessárias à sacarificação da celulose. O objetivo deste estudo foi desenvolver um preparado celulásico por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 utilizando celulignina parcialmente deslignificada como fonte de celulose. Esta estirpe mostrou ser um potencial produtor de celulases quando cultivado em biorreator instrumentado sob condições ótimas, apresentando elevada produção enzimática e alta produtividade volumétrica (CMCase, 27.017,6 U/L; FPase, 1.225,9 U/L, β-glucosidase, 609,4 U/L, e avicelase 577,0 U/L em 42 horas), com 261,6 mg/L de proteínas totais. A caracterização proteômica através da técnica de LC/MS-MS revelou a presença de 117 proteínas constituintes do secretoma deste microrganismo, das quais 67% são glicosil hidrolases, um importante grupo de enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica; além de módulo de ligação ao carboidrato (CBM; 1%), proteínas de atividade acessória (AA9; 1%), swolenina (1%), carboidrato esterase (1%), protease (5%), lipase (1%), proteínas desconhecidas (10%), dentre outras. Em relação ao conteúdo total de proteínas, o grupo majoritário foi o de celulases (38%), enquanto que as hemicelulases também foram bem representativas (23%), e as demais proteínas constituíram 39% do proteoma. O extrato enzimático de *T. harzianum* foi concentrado, apresentando elevadas atividades enzimáticas [1.034.801,1 U/L (CMCase), 46.661,5 U/L (FPase), 23.750,7 U/L (β-glucosidase) e 21.200,5 U/L (avicelase)]. Este preparado celulásico foi aplicado na hidrólise enzimática de celuliginina de bagaço de cana, sendo eficiente na conversão de celulose em açúcares fermentáveis para a produção de etanol de segunda geração. O valor máximo de eficiência de hidrólise obtido neste estudo foi de 65%. Por fim, uma das proteínas identificadas no secretoma de *T. harzianum* e de relevante importância na etapa de amorfogênese da hidrólise enzimática, swolenina, foi produzida por expressão heteróloga em *Aspergillus niger*. A concentração da swolenina recombinante foi de 197,1 mg/L, o que equivaleu a 93 vezes a concentração desta proteína no preparado celulásico de *T. harzianum* obtido em condições nativas, sinalizando seu potencial de aplicação na amorfogênese de biomassas celulósicas e aprimoramento deste preparado enzimático.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, caracterização proteômica, bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise enzimática, swolenina, etanol 2G

ABSTRACT

Rocha, Vanessa Alves Lima. **Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G.** Rio de Janeiro, 2014. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014. Supervisors: Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ) and Simon McQueen Mason, *PhD* (University of York/Inglaterra)

Brazil has advanced on the development of technologies for the second generation ethanol production, however one of the main technological gaps in this process is related to the dependence on foreign companies regards to production of required enzymes to the cellulose saccharification. The aim of this study was to develop a celulasic preparation by *Trichoderma harzianum* IOC 3844 using partially delignified cellulignin as cellulose source. This strain showed to be a potential producer of cellulases when grown on instrumented bioreactor under optimal conditions, presenting high enzyme production and high volumetric productivity (CMCase, 27,017.6 U/L; FPase, 1225.9 U/L, β-glucosidase, 609.4 U/L, and avicelase 577.0 U/L in 42 hours), with 261,6 mg/L of total proteins. The proteomic characterisation through the technique LC/MS-MS showed the presence of 117 constituent proteins of this microorganism secretome, of which 67% are glycosyl hydrolases, an important group of enzymes involved in the degradation of lignocellulosic biomass, besides carbohydrate-binding module (CBM; 1%), acessory activity protein (AA9), swollenin (1%), carbohydrate esterase (1%), protease (5%), lipase (1%), unknown proteins (10%), among others. Regards to the total protein content, the major group was of cellulases (38%), while hemicellulases were also very representative (23%), and other proteins constitute 39% of the proteome. The enzymatic extract of *T. harzianum* was concentrated, presenting high enzymatic activities [1,034,801.1 U/L (CMCase), 46,661.5 U/L (FPase), 23,750.7 U/L (β-glucosidase) e 21,200.5 U/L (avicelase)]. This celulasic preparation was applied in the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse cellulignin, being efficient in converting cellulose into fermentable sugars for the second generation ethanol production. The maximum efficiency of hydrolysis obtained in this study was 65%. Finally, one of the identified proteins in the *T. harzianum* secretome which has relevant importance in amorphogenesis stage of enzymatic hydrolysis, swolenina, was produced by heterologous expression in *Aspergillus niger*. The recombinant swolenina concentration was 197.1 mg/L, which is equivalent to 93-fold the concentration of this protein in the *T. harzianum* celulasic preparation obtained under native conditions, highlighting the potential application of this protein in the amorphogenesis of cellulosic biomass and improvement of this enzyme preparation.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, proteomic characterisation, sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis, swollenin, 2G ethanol

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 8
2.1 Objetivo geral 9
2.2 Objetivos específicos 9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 11
3.1 A biomassa lignocelulósica 11
3.1.1 Celulose 12
3.1.2 Hemicelulose 13
3.1.3 Lignina 15
3.2 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica 15
3.3 Glicosil hidrolases 16
3.4 Celulases 20
3.4.1 Endoglucanases (EG) 21
3.4.2 Exoglucanases (ExG) 22
3.4.3 β-glucosidases (BG) 22
3.4.4 Sinergia do complexo celulásico 23
3.5 Etapas e vantagens da hidrólise enzimática da celulose 24
3.6 Amorfogênese da celulose 24
3.6.1 Expansinas 29
3.6.2 Swoleninas 31
3.7 Métodos para a produção de celulases 39
3.8 Metabolismo da produção de celulases: Regulação e indução 41
3.9 Microrganismos produtores de celulases 43
3.10 Classificação taxonômica de *Trichoderma harzianum* 44
3.11 Produção de celulases por *Trichoderma harzianum* 48
3.12 Breve sumário sobre hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica 51
3.13 Processos de produção de etanol de segunda geração 53

3.14 Panorama sobre fatores sócio-econômicos relacionados à produção de etanol e celulases 55
3.14.1 Matriz energética do Brasil e participação de combustíveis renováveis 55
3.14.2 Produção de cana-de-açúcar e etanol no Brasil 59
3.14.3 Produção de bagaço de cana-de-açúcar no Brasil 61
3.14.4 Produção de etanol de segunda geração no Brasil 63
3.14.5 Mercado nacional e internacional de celulases e perspectivas 64
3.14.6 Patentes nacionais e internacionais de celulases depositadas no Brasil 67
3.15 Considerações gerais sobre a revisão bibliográfica 69
4. MATERIAIS E MÉTODOS 70
4.1 Pré-tratamento do bagaço de cana 70
4.2 Microscopia eletrônica de varredura da fibra lignocelulósica de bagaço de cana nas diferentes etapas do pré-tratamento 73
4.3 Microrganismo utilizado 73
4.4 Produção de celulases 75
4.4.1 Otimização da produção de celulases em celulignina 75
4.4.2 Produção de celulases em biorreator instrumentado 77
4.4.3 Avaliação do efeito da aeração na produção de celulases 78
4.4.4 Concentração do extrato enzimático em membranas de fibras ocas 79
4.4.5 Determinação das atividades enzimáticas 80
4.4.5.1 Atividade FPase 80
4.4.5.2 Atividade CMCase 81
4.4.5.3 Atividade β-glucosidase 81
4.4.5.4 Atividade avicelase 82
4.4.5.5 Atividade xilanase 83
4.4.6 Teor proteico 84
4.5 Gel de Proteínas dos meios otimizado e não-otimizado 84

4.6 Zimogramas do secretoma de *T. harzianum* 85

4.7 Caracterização proteômica de *T. harzianum* 86

4.7.1 SDS-PAGE do secretoma de T. harzianum e Digestão tríptica em gel para espectrometria de massa: bandas 1D 86

4.7.2 Espectrometria de massa 88

4.7.3 Análise dos dados da Espectrometria de massa 88

4.8 Hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum* 89

4.8.1 Efeito do grau de deslignificação da celulignina 89

4.8.2 Comparação com um preparado celulásico comercial e efeito da adição de β-glucosidase 90

4.8.3 Avaliação de diferentes concentrações de substrato e diferentes cargas enzimáticas 90

4.8.4 Quantificação em HPLC dos açúcares produzidos 93

4.8.5 Quantificação dos açúcares redutores 93

4.9 Produção de swolenina recombinante 94

4.9.1 Sequência da swolenina 94

4.9.2 Clonagem do gene da swolenina de *T. harzianum* no plasmídeo 94

4.9.3 Clonagem do gene de swolenina de *T. harzianum* no vetor de expressão para *A. niger* 101

4.9.4 Transformação: Inserção do DNA de *T. harzianum* em *A. niger* 107

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 118

5.1 Composição do bagaço de cana e celulignina 118

5.2 Microscopia eletrônica de varredura da fibra lignocelulósica de bagaço de cana 119

5.3 Produção de celulases 122

5.3.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR) 122

5.3.2 Otimização da produção de celulases através da função Desirability e validação experimental 126

5.3.3 Perfil da produção de celulases em biorreator instrumentado 128

5.3.4 Avaliação do efeito da aeração na produção de celulases 132

5.3.5 Concentração do extrato enzimático em membranas de fibras ocas 133

5.4 Produção de xilanases..... 135

5.5 Gel de Proteínas dos meios otimizado e não-otimizado..... 136

5.6 Zimograma do secretoma de *T. harzianum* 138

5.7 Evolução da otimização do meio de produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 139

5.8 Caracterização proteômica de *T. harzianum* 142

5.9 Hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum* 161

5.9.1 Efeito do grau de deslignificação da celulignina 161

5.9.2 Comparação com um preparado celulásico comercial e efeito da adição de β-glucosidase 166

5.9.3 Avaliação de diferentes concentrações de substrato e diferentes cargas enzimáticas 168

5.9.4 Considerações gerais sobre a hidrólise enzimática 178

5.10 Produção de swolenina recombinante para futura aplicação na amorfogênese da celulose 180

5.10.1 Clonagem do gene de swolenina de *T. harzianum* 182

5.10.2 Clonagem do gene de swolenina de *T. harzianum* no vetor de expressão para *A. niger* 190

5.10.3 Transformação: Inserção do gene de swolenina de *T. harzianum* em *A. niger*..... 195

5.10.4 Avaliação de diferentes condições de cultivo de *A. niger* transformante em meio de fermentação 198

5.10.5 Purificação da swolenina recombinante 201

5.10.6 Considerações gerais sobre a produção de swolenina recombinante de *T. harzianum* 208

6. CONCLUSÕES 209
7. SUGESTÕES 214
8. REFERÊNCIAS 215
9. ANEXOS 235
ANEXO 1: Composição das soluções utilizadas 235
9.1 Soluções utilizadas nas análises de atividade enzimática 235
9.2 Soluções utilizadas na eletroforese SDS-PAGE 237
9.3 Soluções utilizadas na produção de swolenina recombinante 239
9.4 Soluções utilizadas na preparação do protoplasto e transformação de *A. niger* 240
9.5 Soluções utilizadas na avaliação da swolenina recombinante 245
ANEXO 2: Mapa da Swolenina 246
ANEXO 3: Primers utilizados 247

Lista de figuras

Capítulo 3

Figura 3.1. Esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica, indicando a organização de seus principais constituintes: celulose, hemicelulose e lignina. 12

Figura 3.2. (a) Arranjo da fibras, microfibrilas e celulose na parede celular vegetal. (b) Regiões cristalina e amorfa da celulose. 13

Figura 3.3. Estrutura típica da hemicelulose. 14

Figura 3.4. Estrurura modelo da lignina. 15

Figura 3.5. Tipos de enovelamento de glicosil hidrolases. Jelly roll barrel (A); β-hélice (B); (β/α)8 ou TIM barrel (C); α+β (D); somente β-hélice (E). 17

Figura 3.6: Exemplo de glicosil hidrolase: estrutura tridimensional da CBH II de *T. reesei*. 18

Figura 3.7. Mecanismo de ação das hidrolases por inversão. 19

Figura 3.8. Mecanismo de ação das hidrolases por retenção. 20

Figura 3.9: Exemplo de uma exoglucanase (CBH I) atuando sobre uma fibrila de celulose. 22

Figura 3.10: Ação sinérgica das celulases durante a hidrólise enzimática da celulose. NR: terminal não redutor. R: terminal redutor. 23

Figura 3.11. Representação esquemática simplificada da amorfogênese ocorrendo em três níveis de organização da biomassa. 27

Figura 3.12. Representação de como as moléculas de expansinas podem agir entre as microfibrilas de celulose e hemicelulose clivando as ligações de hidrogênio. 30

Figura 3.13. Estrutura básica da proteína swolenina. 31

Figura 3.14. Alinhamento da swolenina com duas α-expansinas, LeEx1 de tomate e CuExS2 de pepino. 32

Figura 3.15. Interação entre uma swolenina e cadeia de celulose. 34

Figura 3.16. Imagem de microscopia de força atômica da estrutura da parede celular *Valonia* (A), e por microscopia óptica de fragmentos da parede celular de *Valonia* após tratamento somente com tampão (B), swolenina (C), CBHI (D) e EGII (E). 36

Figura 3.17. Microscopia eletrônica de varredura de papel de filtro após 37

pré-tratamento com swolenina.

Figura 3.18. Microscopia eletrônica de varredura do efeito da swolenina em fibra de algodão macerada. 39

Figura 3.19. Representação esquemática dos processos de produção de etanol de segunda geração. 55

Figura 3.20. Produção de Energia Primária no Brasil entre os anos de 1970 e 2012. 56

Figura 3.21. Consumo final de energia por fonte no Brasil no ano de 2012. 59

Figura 3.22. Produção de cana-de-açúcar e etanol no Brasil entre as safras de 1980/1981 e 2012/2013. 60

Figura 3.23. Produção de bagaço de cana-de-açúcar no Brasil entre as safras de 1980/1981 e 2012/2013. 62

Figura 3.24. Principais multinacionais produtoras de celulases no mercado mundial. 65

Figura 3.25. Principais empresas depositantes de patentes de celulases e respectivos números de aplicações no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil entre 1984 e 2012. 68

Figura 3.26. Principais países depositantes de patentes de celulases no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil entre 1984 e 2012. 69

Capítulo 4

Figura 4.1. Aspecto do bagaço de cana *in natura* (a), após o pré-tratamento ácido (b) e após os pré-tratamentos ácido e alcalino. 71

Figura 4.2. Aspecto macro e microscópico de *Trichoderma harzianum* IOC 3844. (a) esporos no cultivo em placa; (b) hifas (aumento de 40 x); (c) hifas (aumento de 20 x); (d) esporos (aumento de 40 x). 74

Figura 4.3. Biorreator contendo meio de fermentação para produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 em celulignina parcialmente deslignificada . 78

Figura 4.4. Equipamento de membranas de fibras ocas (*Hollow Fiber®*) utilizado para concentração do extrato bruto enzimático. (a) Microfiltração (0,2 µm); (b) Ultrafiltração (5 kDa); (c) Preparado celulásico Ladebio Th (após a concentração). 79

Figura 4.5. (a) Eletroforese de proteínas do secretoma de *T. harzianum* em gel SDS-PAGE; (b) corte do gel contendo secretoma de *T. harzianum* para digestão tríptica por espectrometria de massa. 87

Figura 4.6. Aspecto do bagaço de cana após a hidrólise enzimática utilizando o preparado enzimático de *T. harzianum*. 92

Figura 4.7. Mapa físico do plasmídeo pSC-B::SWO1. 94

Figura 4.8. Mapa físico do plasmídeo pIGF-pyrG-Gla SS. 101

Figura 4.9. Equipamento de FPLC (a) e coluna contendo amostra para purificação (b). 116

Capítulo 5

Figura 5.1. Composição do bagaço de cana e celulignina parcialmente deslignificada . 119

Figura 5.2. Microscopia eletrônica de varredura da fibra lignocelulósica de bagaço de cana *in natura*, após pré-tratamento ácido, e após pré-tratamentos ácido e alcalino. 121

Figura 5.3. Superfície de resposta da produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtida no Delineamento composto central rotacional (DCCR). 126

Figura 5.4. Perfil cinético da produção de celulases em biorreator instrumentado contendo meio otimizado. 128

Figura 5.5. Perfil cinético da produção de xilanases em biorreator instrumentado contendo meio otimizado. 136

Figura 5.6. Gel de Proteínas dos meios otimizado e não-otimizado. 137

Figura 5.7. Zimogramas do secretoma de *T. harzianum.* 139

Figura 5.8. Evolução da otimização do meio de produção de celulases por *T. harzianum* desde os planejamentos experimentais (Rocha, 2010) até a produção em biorreator contendo meio otimizado com celulignina parcialmente deslignificada (presente estudo). 140

Figura 5.9. Aumento da atividade das celulases de *T. harzianum* produzidas em biorreator antes e após concentração do preparado enzimático. 141

Figura 5.10. Caracterização proteômica de *T. harzianum.* (a) proporção de proteínas totais e (b) glicosil hidrolases de *T. harzianum* IOC 3844 144

calculadas por emPAI.

Figura 5.11. Proporções aproximadas do total de celulases e total de hemicelulases do proteoma de *T. harzianum* IOC 3844 (a). Proporções aproximadas dos grupos enzimáticos em relação ao total de celulases (b) e total de hemicelulases (c). 153

Figura 5.12. Glicose liberada durante a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) com diferentes graus de deslignificação utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum*. 162

Figura 5.13. Açúcares redutores liberados durante a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) com diferentes graus de deslignificação utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum*. 165

Figura 5.14. Glicose liberada durante a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) utilizando os preparados celulásicos *Ladebio Th* (de *Trichoderma harzianum*) e *Multifect*, ambos com adição de β-glucosidase comercial. 166

Figura 5.15. Glicose liberada durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado utilizando diferentes concentrações de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) e diferentes cargas enzimáticas de celulases de *T. harzianum*. 170

Figura 5.16. Celobiose liberada durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado utilizando diferentes concentrações de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) e diferentes cargas enzimáticas de celulases de *T. harzianum*. 171

Figura 5.17. Eficiência de hidrólise (em glicose) durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado utilizando diferentes concentrações de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) e diferentes cargas enzimáticas de celulases de *T. harzianum*. 172

Figura 5.18. Correlação entre a concentração de substrato inicial versus a concentração de glicose produzida e eficiência de hidrólise. 174

Figura 5.19. Gel com RNA de *T. harzianum* extraído a partir de diferentes concentrações de biomassa fúngica: 25, 50, 75 e 100 mg. 183

Figura 5.20. Gel da produção de cDNA de *T. harzianum* utilizando dois diferentes primers (UTR e ATG) e dois tampões de amostra (HF e GC). 184

Figura 5.21. Aspecto das colônias de *E. coli* obtidas após inserção de cDNA de *T. harzianum* e cultivo *overnight*. 185

Figura 5.22. (a) Gel com DNA de 8 colônias de *E.coli* selecionadas a partir 186

do cultivo em placa (primers SWO UTR e SWO ATG); (b) Gel com DNA das colônias de *E.coli* positivas após reação com enzima de restrição EcoRI.

Figura 5.23. Sequência do DNA plasmidial para expressão de swolenina (E. coli). 188

Figura 5.24. Gel com DNA da colônia positiva de *E.coli* após reação com as DNA polimerases *Phusion* e *Expand*. 190

Figura 5.25. Aspecto das colônias de *E. coli* contendo gen de swolenina de *T. harzianum* após ligação ao vetor de *A. niger* e cultivo *overnight*. 191

Figura 5.26. Gel com DNA da colônias positivas de *E.coli* após ligação ao vetor de *A. niger*. Gel com DNA da colônias positivas de *E.coli* após reação com enzimas de restrição Hpa I and Xba I. 192

Figura 5.27. Alinhamento das sequências primárias do DNA plasmidial para expressão de swolenina em *A. niger*. 194

Figura 5.28. Microscopia óptica da extração do protoplasto de *A. niger* durante diferentes tempos de digestão da membrana celular. 195

Figura 5.29. Aspecto dos esporos de *Aspergillus niger* transformante. 196

Figura 5.30. DNA (a), RNA (b) e cDNA (c) do *Aspergillus niger* transformante. 197

Figura 5.31. Aspecto de *Aspergillus niger* transformante no meio de fermentação. 198

Figura 5.32. *Dot blot* e *Western blot* dos 8 transformantes de *A. niger* (8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16), nos diferentes dias (1, 2, 3, 4) e temperaturas (30, 25 e 20°C). 199

Figura 5.33. Pico de purificação da swolenina no FPLC (em azul) através do gradiente de sais. 201

Figura 5.34. SDS-PAGE, Corante de Glicosilação, e *Western blot* testado com exposição à anti-his 30 s. 203

Figura 5.35. Similaridade da sequência da swolenina de *T. reesei* e *T. harzianum.* 206

Lista de tabelas

Capítulo 3

Tabela 3.1. Grupos das famílias glicosil hidrolases. 19

Tabela 3.2. Classificação das celulases de acordo com a IUBMB: códigos Enzyme Comission (E.C.), nomes oficiais, nomes alternativos e reações catalisadas. 21

Tabela 3.3. Proteínas disruptivas não-hidrolíticas e seus efeitos na biomassa. 29

Tabela 3.4. Diferenças entre fermentação submersa e fermentação no estado sólido. 41

Tabela 3.5. Exemplos de publicações sobre produção de celulases. 45

Tabela 3.6. Eficiência de hidrólise enzimática em diferentes estudos. 52

Capítulo 4

Tabela 4.1. Composição do meio Mandels & Weber (1969) para produção de celulases. 75

Tabela 4.2. Fatores e níveis utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização da produção de celulases. 76

Tabela 4.3. Concentrações de substrato (celulignina parcialmente deslignificada) e cargas enzimáticas (enzima de *T. harzianum*) utilizadas na hidrólise enzimática. 91

Capítulo 5

Tabela 5.1. Matriz do Delineamento composto central rotacional (DCCR) e resultados correspondentes das atividades das celulases. 123

Tabela 5.2. Análise de variância (ANOVA) para a atividade FPase. 124

Tabela 5.3. Análise de variância (ANOVA) para a atividade CMCase. 124

Tabela 5.4. Análise de variância (ANOVA) para a atividade beta-glucosidase. 124

Tabela 5.5. Atividades celulásicas previstas e obtidas experimentalmente na validação experimental. 127

Tabela 5.6. Composição ótima do meio de produção de celulases por *T. harzianum* IOC 3844. 127

Tabela 5.7. Atividade das celulases e produtividade volumétrica (Q_p) de *Trichoderma harzianum* em diferentes estudos. 131

Tabela 5.8. Atividade das celulases em biorreator instrumentado em fermentação submersa sob diferentes condições de saturação de oxigênio dissolvido. 133

Tabela 5.9. Atividade das celulases nas diferentes etapas de concentração do extrato enzimático de *T. harzianum* em membranas de fibras ocas. 134

Tabela 5.10. Atividade das celulases dos preparados *Ladebio Th* e *Multifect*®. 134

Tabela 5.11. Evolução da otimização do meio de produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 desde a produção inicial antes da otimização até o concentrado do biorreator contendo meio otimizado. 141

Tabela 5.12. Lista de proteínas do secretoma de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtidas a partir do cultivo em celulignina parcialmente deslignificada . 155

Tabela 5.13 Concentração de glicose, o rendimento da hidrólise e produtividade volumétrica de glicose durante a hidrólise enzimática de lignocelulose parcialmente deslignificada (PDC) usando a enzima *T. harzianum* em diferentes concentrações de PDC (25 g/L, 50 g/L ou 100 g/L) ou cargas diferentes de enzimas (25 FPU/g, 50 FPU/g ou 75 FPU/g) ao longo de 48 horas de hidrólise enzimática. 170

Tabela 5.14. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes cargas enzimáticas dentro de cada concentração de substrato. 172

Tabela 5.15. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes concentrações de substrato dentro de cada carga enzimática. 173

Tabela 5.16. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes tempos dentro de cada carga enzimática. 175

Tabela 5.17. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes tempos dentro de cada concentração de substrato. 176

Tabela 5.18. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes concentrações de substrato ou cargas enzimáticas dentro do tempo final de hidrólise (48 horas). 177

Tabela 5.19. Aumento da carga enzimática *versus* aumento da eficiência de hidrólise em termos percentuais. 178

Tabela 5.20. Aumento da concentração de swolenina do fungo recombinante em relação ao preparado celulásico de *T. harzianum* obtido em condições nativas. 204

Lista de abreviaturas

AA9: *accessory activity proteins* (proteínas de atividade acessória – família 9)

ANOVA: análise de variância

ATP: adenosina trifosfato

BPC: bioprocesso consolidado

BSA: albumina de soro bovino

CAZy: *Carbohydrate-Active Enzymes Data Base* (Banco de Dados de Enzimas Carboidrato-Ativas)

CBH I: celobiohidrolase I

CBH II: celobiohidrolase II

CBM: *carbohydrate-binding module* (módulo de ligação ao carboidrato)

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CMC: carboximetilcelulose

CMCase: carboximetilcelulase

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CPD: celulignina parcialmente deslignificada

CTBE: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

D: valor *Desirability*

DCCR: delineamento composto central rotacional

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DNS: ácido dinitro-salicílico

DTT: *Dithiothreitol* (Ditiotreitol)

EC: *Enzyme Comission* (Comissão de Enzimas)

EG: endoglucanase

EG II: endoglucanase II

EQ: Escola de Química

EUA: Estados Unidos da América

FES: fermentação no estado sólido

FPase: enzima com atividade em papel de filtro

FPLC: *fast performance liquid cromatography* (cromatografia líquida de rápida performance)

FPU: unidade de atividade enzimática em papel de filtro

FS: fermentação submersa

GH: glicosil hidrolases

HPLC: *high performance liquid cromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE)

HSF: hidrólise separada da fermentação

IEA: *International Energy Agency* (Agencia Internacional de Energia)

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

IUBMB: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)

kDa: quiloDalton

LADEBIO: Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos

LC-MS/MS: *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (cromatografia líquida acoplada a dois espectrofotômetros)

MDIC: Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior

MM: massa molecular

mRNA: *Messenger Ribonucleic Acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

Mtep: milhões de toneladas equivalentes de petróleo

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para Informação Biotecnológica - EUA)

NC-IUBMB: *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (Comite de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)

NREL: *National Renewable Energy Laboratory* (Laboratório Nacional de Energia Renovável dos EUA)

OD: oxigênio dissolvido

PDA: *potato dextrose agar* (batata dextrose ágar)

pH: Potencial hidrogeniônico

Q_p: produtividade volumétrica

rRNA: ribosomal ribonucleic acid (ácido ribonucleico ribossomal)

rpm: rotações por minuto

SDS: *sodium dodecil sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE: *poliacrilamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

SSCF: sacarificação simultânea à co-fermentação

SSF: sacarificação simultânea à fermentação

tRNA: transporter ribonucleic acid (ácido ribonucleico transportador)

tep: toneladas equivalentes de petróleo

U: unidade internacional

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

UPR: *unfolded protein response*

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

Há muitas décadas pesquisas vem sendo feitas com o intuito de aprimorar as condições para a produção de biocombustíveis em substituição ao petróleo. E mais recentemente, as pesquisas têm avançado no sentido de produzir bioetanol e outros produtos orgânicos a partir de resíduos agroindustriais. O Brasil é o principal produtor de cana de açúcar no mundo, produzindo cerca de 300 milhões de toneladas por ano. A produção de etanol a partir do caldo de cana (etanol de primeira geração) cresceu cerca de cinco vezes entre 1980 e 2010 no Brasil (UNICADATA, 2013). Esta é uma tecnologia madura e bem entendida e futuros alvos e investimentos sugerem que vai continuar crescendo (USDA, 2013).

No entanto, a partir do cultivo de cana de açúcar, é gerada uma grande quantidade de co-produto agroindustrial – aproximadamente 160 milhões de toneladas de bagaço de cana por ano em 2012 (UNICADATA, 2013) – o que pode constituir valiosa matéria-prima biotecnológica para a produção de etanol de segunda geração (etanol 2G ou etanol celulósico), enzimas e outros bioprodutos no contexto de biorrefinaria. Uma vez que estes resíduos estão disponíveis no campo próximo às usinas e destilarias, ou gerados nesses

próprios centros de processamento, é possível produzir estes bioprodutos a baixo custo, e sem requerimentos adicionais de terras agricultáveis e impactos sobre a alimentação (SIMS et al., 2008).

A produção de etanol de segunda geração está no centro das atenções das pesquisas em todo o mundo, e o objetivo é que seja logo comercializado em larga escala. No entanto, esta tecnologia é relativamente imatura. É possível fazer melhoramentos a baixo custo, visando aumentar o rendimento de etanol e a eficiência das enzimas à medida que mais conhecimento é adquirido.

O etanol de segunda geração pode ser produzido principalmente a partir da fração celulósica da biomassa através da hidrólise desse polissacarídeo e posterior fermentação de seu açúcar monomérico (glicose) (VASQUEZ et al., 2007; MAEDA et al., 2013). O Brasil tem avançado no desenvolvimento de tecnologias para a produção deste biocombustível (PETROBRAS, 2006; PETROBRAS, 2008), contudo, um dos principais gargalos econômicos deste processo relaciona-se à dependência de empresas estrangeiras quanto à produção de enzimas necessárias à sacarificação da fração celulósica dessas matérias-primas. O alto custo das enzimas ainda é um dos maiores obstáculos para o etanol de segunda geração ser comercializado. A produção de enzimas a partir de bagaço de cana dentro do contexto de biorrefinaria pode constituir uma alternativa economicamente atraente. Desta forma, as enzimas são produzidas a baixo custo a partir deste resíduo agroindustrial e os altos preços de importação destas enzimas são contornados. Indubitavelmente, melhorias no desenvolvimento de tecnologias economicamente viáveis de produção de enzimas sacarificantes são essenciais para potencializar as condições do processo produtivo na indústria nacional de biocombustíveis.

A tendência nas últimas décadas tem sido a hidrólise enzimática da celulose, uma vez que esta reação possui alta especificidade, ocorre em baixas temperaturas, demanda baixo consumo de energia, e não gera substâncias tóxicas ao processo como na hidrólise química. A conversão enzimática de celulose em glicose é realizada por celulases. Estas enzimas são hidrolases que catalisam sinergicamente a clivagem das ligações 1,4-β-glicosídicas entre as moléculas de glicose. Há três tipos principais de celulases descritos na literatura: endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidades. As endoglucanases catalisam randomicamente o rompimento das ligações internas da região amorfa da celulose, liberando oligossacarídeos com menor grau de polimerização que a fibra inicial, assim como oligossacarídeos solúveis. As exoglucanases são representadas pelas celobiohidrolases (CBH) e glucanohidrolases. Estas primeiras agem nos terminais redutores (CBH I) e não-redutores (CBH II) da fibra de celulose liberando celobiose. Já as últimas catalisam a hidrólise da glicose dos terminais da fibra. E por fim as β-glucosidades pertencem ao grupo que catalisa a hidrólise da celobiose em glicose.

Diversos microrganismos como fungos e bactérias são capazes de produzir celulases para a degradação da biomassa lignocelulósica. Como revisado por Lynd (2002), os fungos membros de Ascomycota, incluindo *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais estudados microrganismos produtores de celulases. Estudos prévios realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da UFRJ mostraram que o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* é capaz de produzir grandes quantidades destas enzimas a partir de bagaço de cana em fermentação submersa (CASTRO et al., 2010).

Nesse contexto, insere-se o presente estudo, que teve como alvo o uso de bagaço de cana de açúcar para a produção de um preparado celulásico por *T. harzianum*. A partir desse *pool* enzimático foram feitos os seguintes desdobramentos:

1. Análise proteômica do preparado celulásico produzido pelo fungo hiperceluloítico *T. harzianum*. Técnicas moleculares tais como eletroforese de gel gradiente desnaturante (DGGE) tem sido utilizadas para caracterizar diferentes proteínas que compõem o secretoma de fungos. No entanto, o uso desses métodos microbiológicos e bioquímicos tradicionais tem resultado no conhecimento limitado das enzimas lignocelulolíticas da comunidade microbiana. Técnicas mais modernas como *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) tem a extraordinária capacidade de elucidar mais detalhadamente a composição do *pool* proteômico microbiano e sua potencial função na utilização da biomassa. Dessa forma, dados de abundância de proteína podem ser muito úteis para a criação de um coquetel de enzimas que catalisam a hidrólise da lignocelulose. Além disso, pode fornecer uma acurada representação da dinâmica genotípica e fenotípica do distinto microrganismo (ADAV et al., 2010). Ao presente, pouco é conhecido sobre o *pool* enzimático produzido por fungos utilizando bagaço de cana como fonte de carbono através de técnicas de espectrofotometria de massa, que visem proporcionar um *insight* de quais são as proteínas constituintes do secretoma microbiano – o que foi uma das grandes motivações deste trabalho.

2. Hidrólise enzimática utilizando celulases de *T. harzianum*. Uma vez identificadas glicosil hidrolases, este trabalho avaliou o poder hidrolítico

do preparado enzimático de *T. harzianum*, usando diferentes concentrações de substrato e carga enzimática, e diferentes pré-tratamentos da biomassa.

3. Expressão heteróloga de uma importante proteína identificada no *pool* proteico de *T. harzianum*: swolenina. Esta proteína tem sido mostrada na literatura como de grande importância na etapa de amorfogênese (descristalização) da celulose.

Esta tese está estruturada da seguinte forma, no que concerne ao conteúdo de cada capítulo nela contido:

O *capítulo 1* contém a *Introdução* ao tema da tese. No *capítulo 2*, intitulado de *Justificativa e Objetivos*, é relatada a importância tecnológica e estão listados os objetivos geral e específicos deste trabalho. O *capítulo 3* apresenta a *Revisão Bibliográfica* dos aspectos relevantes desse trabalho, que sequencia as informações teóricas e técnicas necessárias à compreensão e ao embasamento do estudo. São descritas também as considerações gerais sobre a contextualização do trabalho. No *capítulo 4*, *Materiais e Métodos*, encontram-se descritas as metodologias empregadas para a obtenção dos objetivos propostos. O *capítulo 5*, *Resultados e Discussão*, apresenta os resultados de otimização do bioprocesso de produção de celulases a partir de celulignina parcialmente deslignificada , concentração do *pool* enzimático, hidrólise enzimática e produção de swolenina por expressão heteróloga. Este capítulo ainda contém a discussão de tais resultados em termos de inovação tecnológica e comparação com resultados de outros autores. As *Conclusões*, no *capítulo 6*, agrupam as principais considerações fornecidas pelos resultados. No

capítulo 7, são relatadas as *Sugestões para futuros estudos*. Por fim, o *capítulo 8* contém as *Referências* utilizadas no presente estudo.

Durante este doutoramento foi obtida a seguinte produção bibliográfica:

- Artigos completos publicados em periódicos:

Maeda, R. N.; Serpa, V. I.; **Rocha, V. A. L**.; Mesquita, R. A. A.; Santa Anna, L. M. M.; Castro, A. M.; Driemeier, C. E.; Pereira Jr., N.; Polikarpov, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. Process Biochemistry v. 46, p. 1196-1201. 2011.

Rocha, V. A. L.; Maeda, R. N.; Santa Anna, L. M. M.; Pereira Jr., N. Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium. Electronic Journal of Biotechnology, v. 16, No 5. 2013.

- Resumo publicado em anais de congresso internacional:

Rocha, V. A. L.; Maeda, R. N. & Pereira Jr., N. Effect of delignification in the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse cellulignin using cellulase from *Trichoderma harzianum*. 34th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. New Orleans, USA. 2012.

- Trabalhos completos publicados em anais de congressos nacionais:

Rocha, V.A.L.; Maeda, R.N. e Pereira Jr., N. Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando celulases de *Trichoderma harzianum* visando à produção de etanol de segunda geração. XVIII Congresso Nacional de Bioprocessos. 2010.

Rocha, V. A. L.; Maeda, R.; Pereira Jr., N. Produção de celulases por *Trichoderma harzianum* em biorreator utilizando meio de cultivo otimizado. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM. 2011.

Fonseca, M.; **Rocha, V. A. L.**; Santana, A. C.; Domingues, P.; Maeda, R.; Pereira Jr., N. Análise comparativa da produção de celulases por *Trichoderma harzianum* em celulignina parcialmente deslignificada e celulose microcristalina. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2011.

Bezerra, M. F.; Santana, A. C. O.; **Rocha, V. A. L.**; Maeda, R. N. & Pereira Jr., N. Aplicação de celulases de *Trichoderma harzianum* na hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada -de-açúcar. Jornada de Iniciação Científica, Artística e Cultural. 2011.

Mangia, L. H. R.; Silva, V. C. R.; **Rocha, V. A. L.**; Maeda, R. N. & Pereira Jr., N. Hidrólise de bagaço de cana pré-tratado e celulose microcristalina usando celulases de *Trichoderma harzianum*. XXXV Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural da UFRJ. 2013.

Capítulo 2

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Em função do seu vasto potencial no mercado global de biocombustíveis, o Brasil tem avançado no desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol de segunda geração. No entanto, para consolidação deste processo, faz-se necessário o uso de enzimas celulolíticas eficientes e produzidas nas próprias unidades industriais.

Embora, na natureza, a quantidade de celulases secretada pelos fungos atenda às necessidades de decomposição da biomassa celulósica e fornecimento de açúcares para o seu metabolismo, o uso de celulases em nível industrial demanda preparados enzimáticos com altos valores de atividade. Há poucos relatos na literatura sobre a produção de celulases obtidas a partir de resíduos lignocelulósicos no Brasil que lograram elevadas atividades celulásicas, e que apresentaram capacidade hidrolítica semelhante a de enzimas comerciais.

O país tem como desafio o desenvolvimento de seus próprios preparados celulásicos, reduzindo assim a dependência tecnológica quanto à produção destes biocatalisadores em relação às empresas estrangeiras. O grupo de pesquisas de Desenvolvimento de Bioprocessos da Escola de

Química/ UFRJ vem se destacando por sua experiência na produção de etanol, enzimas e produtos orgânicos a partir de biomassa lignocelulósica. Aplicando esta experiência pretende-se acrescentar grandes avanços no aprimoramento da tecnologia nacional de produção de celulases, prosseguindo em direção à viabilidade da produção de etanol de segunda geração no Brasil.

Neste contexto, este doutoramento teve como objetivos:

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o desempenho de um preparado celulásico de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 utilizando celulignina parcialmente deslignificada como fonte de celulose.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a celulignina parcialmente deslignificada em relação aos seus constituintes principais;
- Otimizar o meio de produção de celulases por *T. harzianum* IOC 3844 utilizando celulignina parcialmente deslignificada como fonte de celulose em fermentação submersa;
- Validar as condições otimizadas da produção de celulases em frascos e em biorreator instrumentado;
- Investigar o efeito da aeração na produção de celulases em biorreator instrumentado;
- Concentrar o preparado celulásico;
- Caracterizar o extrato bruto concentrado em termos de concentração de proteínas e atividades enzimáticas;

- Avaliar a hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum* sob diferentes aspectos: avaliação de diferentes cargas enzimáticas e concentrações de celulignina parcialmente deslignificada ; avaliação de diferentes níveis de deslignificação do substrato; avaliação da adição de β-glucosidase comercial; comparação com um preparado comercial.
- Caracterizar o proteoma de *T. harzianum* por LC-MS/MS através da identificação das proteínas constituintes do preparado enzimático;
- Produzir swolenina recombinante de *T. harzianum* por expressão heteróloga em *Aspergillus niger*, visando futura avaliação do seu efeito na hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada .
- Separar a swolenina recombinante utilizando FPLC (*Fast protein liquid chromatography*);
- Verificar o aumento da quantidade de swolenina produzida considerando a concentração gerada pelo fungo em condições nativas e pelo fungo recombinante.

Capítulo 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica possui estrutura fibrosa, composta por polissacarídeos como celulose (40 a 60%) e hemicelulose (20 a 40 %) envolvidas por uma estrutura macromolecular contendo substâncias aromáticas denominada de lignina (15 a 25%) (SUN & CHENG, 2002).

Esta biomassa é reconhecidamente uma matéria-prima renovável, abundante e barata. Suas valiosas moléculas polissacarídicas, formadas por glicídios, podem servir de blocos de construção para diversos bioprodutos (PEREIRA Jr. et al., 2008). Em sua composição podem também ser encontrados em menores proporções compostos nitrogenados, sais minerais (principalmente de cálcio, potássio e magnésio), resinas, taninos, fenóis e ácidos graxos (SUN & CHENG, 2002).

O uso da biomassa lignocelulósica tem ganhado bastante espaço no mercado energético mundial, em função da importância dos materiais renováveis e seus positivos impactos sobre o meio ambiente. Tanto é que em 2002, surgiu o conceito de “Biorrefinaria”, análogo à refinaria de petróleo, e

que se refere a uma unidade industrial de processamento sustentável de biomassa numa vasta gama de bio-produtos (alimentos, rações, químicos, materiais) e bioenergia (biocombustíveis, electricidade e/ou calor) (IEA, 2013).

A figura 3.1 mostra a representação da estrutura da biomassa lignocelulósica, e seu desdobramento em glicídios.

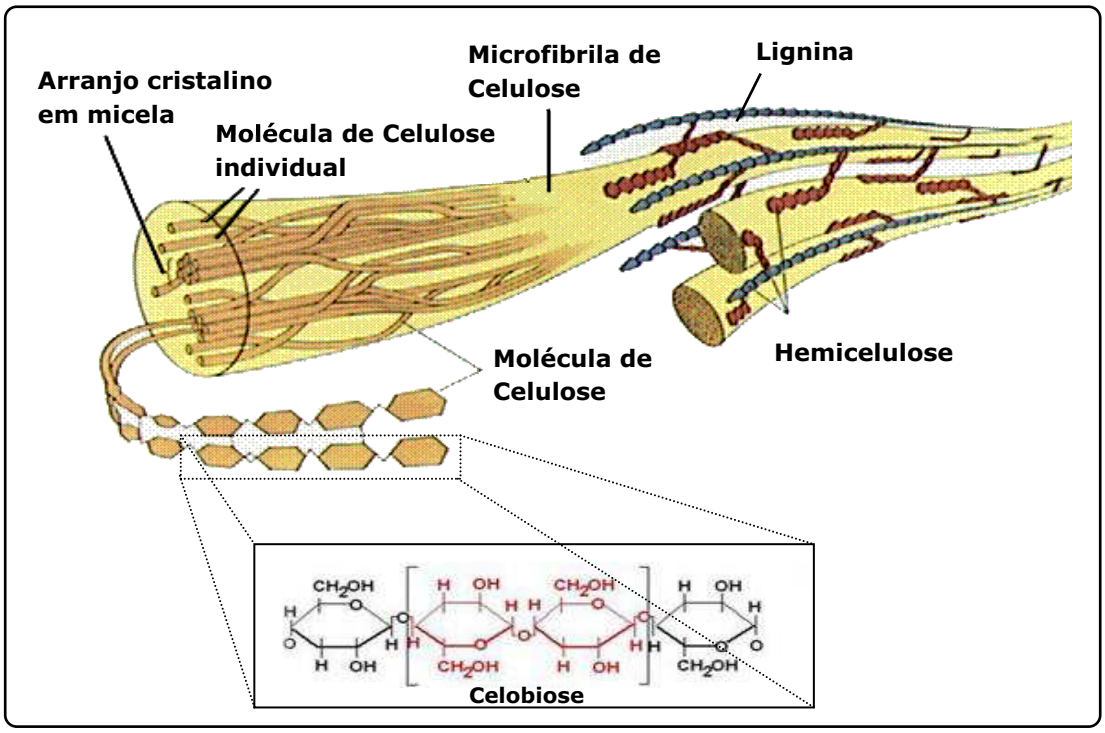


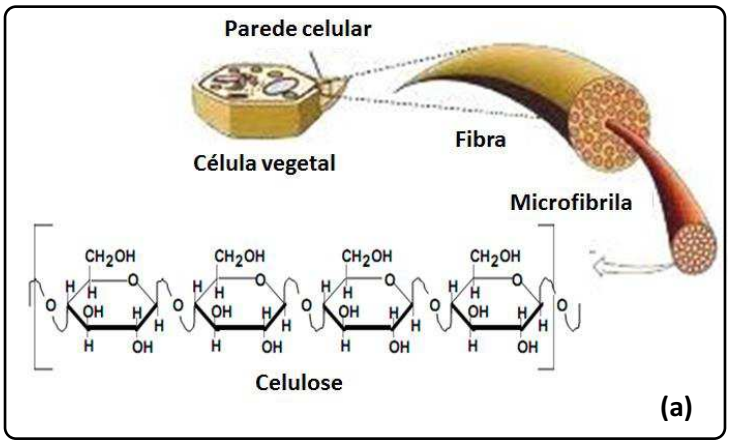
Figura 3.1. Esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica, indicando a organização de seus principais constituintes: celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: EMC (2010).

3.1.1 Celulose

Cerca de 100 bilhões de toneladas de celulose são produzidas por ano na biosfera através da fotossíntese, sendo este o mais abundante recurso natural renovável do planeta (LYND et al., 2002).

A celulose é um homopolissacarídeo que consiste de unidades de β-D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β(1-4) e por ligações de hidrogênio, formando uma cadeia polimérica linear (SUN & CHENG, 2002). O biopolímero

de celulose possui como unidade de repetição a celobiose. As ligações de hidrogênio intermoleculares nas cadeias lineares da celulose determinam a sua rigidez, enquanto que as ligações intramoleculares são responsáveis por formar a fibra vegetal. Deste modo, as moléculas de celulose se alinham em forma de microfibrilas ordenadas na fibra da celulose (figura 3.2a). Estas fibras, por sua vez, são constituídas de regiões cristalinas (moléculas altamente ordenadas) e amorfas (moléculas desordenadas), como ilustra a figura 3.2b. A estrutura cristalina da celulose se adere a outras cadeias por ligações de hidrogênio e força de *van der Waals*, formando uma estrutura altamente insolúvel. Cada microfibrila de celulose consiste de aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula (BRAGATTO, 2007).



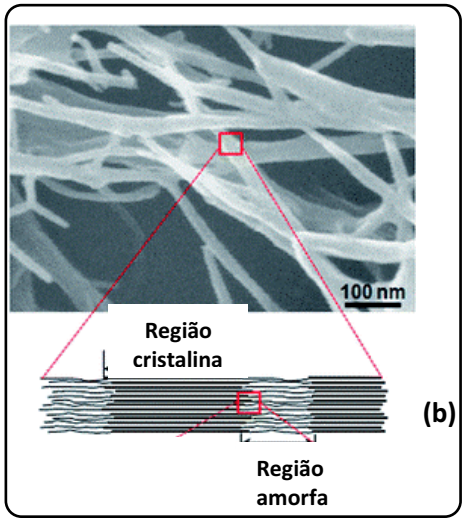


Figura 3 2. (a) Arranjo da fibras, microfibrilas e celulose na parede celular vegetal. Fonte: Adaptado de http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F08_2print.html. (b) Regiões cristalina e amorfa da celulose. Fonte: Adaptado de Chun et al. (2012).

3.1.2 Hemicelulose

Hemicelulose é uma macromolécula que contém proporções variadas de açúcares. Enquanto a celulose é estruturada somente por monômeros de glicose, a hemicelulose contém uma composição diversificada de açúcares: β-D-

xilose, β-D-glicose, β-D-manose, α-L-arabinose, α-D-galactose, ácido β-D-glucorônico, ácido β-galacturônico e ácido α-D-4-O-metilglucurônico. Isto confere à hemicelulose elevado nível de complexidade. O teor dos diferentes componentes presentes nas hemiceluloses varia consideravelmente entre as diferentes espécies de vegetais (LIMA, 2002).

A hemicelulose está intrinsecamente associada à celulose. A especificidade da interação hemicelulose-celulose existe em função da semelhança estrutural entre a cadeia principal destes polissacarídeos, de modo que as hemiceluloses contribuem com o alinhamento e organização das microfibrilas de celulose (SUN & CHENG, 2002). Estudos realizados por HAYASHI e MACLACHLAN (1984) evidenciaram que uma mesma cadeia de hemicelulose, devido ao seu comprimento, pode ligar-se a mais de uma microfibrila de celulose, fornecendo maior resistência à parede celular.

Xilana é o principal componente da fração hemicelulósica de muitos materiais lignocelulósicos e considerado o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Devido à estrutura complexa da fração hemicelulósica, torna-se necessário uma variedade de enzimas para sua degradação ou modificação (COLLINS et al., 2005). A figura 3.3 mostra a estrutura de uma hemicelulose, na qual a cadeia linear representa uma xilana.

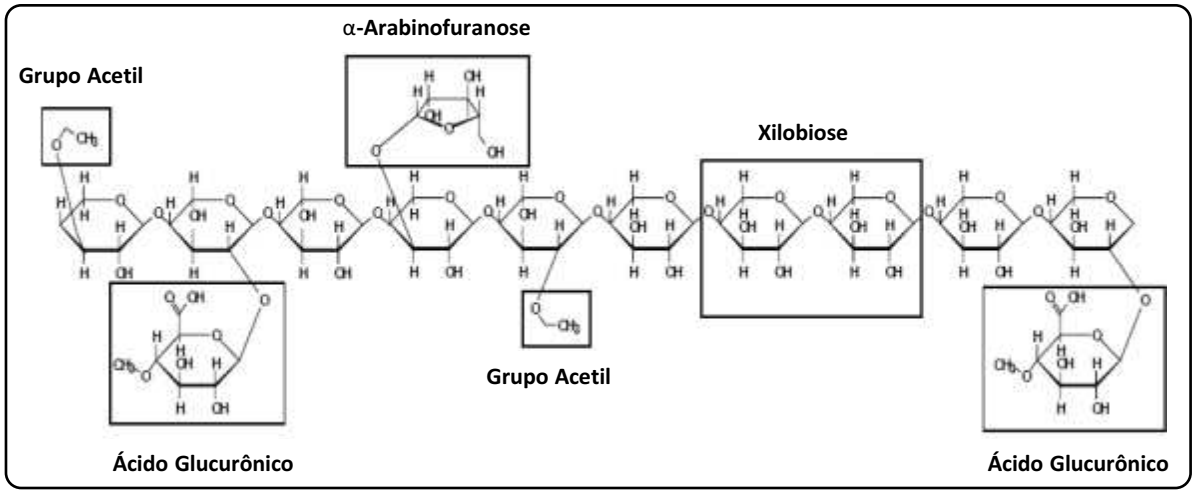


Figura 3.3. Estrutura típica da hemicelulose. Fonte: Mussato (2002).

3.1.3 Lignina

A lignina é composta basicamente de unidades fenilpropano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa (figura 3.4). O acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular ou repetitiva e é sintetizada a partir da reação de três álcoois aromáticos precursores, álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas (FENGEL & WEGENER, 1989).

Duas são as principais funções da lignina: tornar a parede resistente ao impacto mecânico e compressão, e dificultar ataques enzimáticos por microrganismos (CHEMICAL SCIENCES DIVISION, 2009). Este constituinte lignocelulósico é extremamente recalcitrante e difícil de dissociar (FENGEL & WEGENER, 1989).

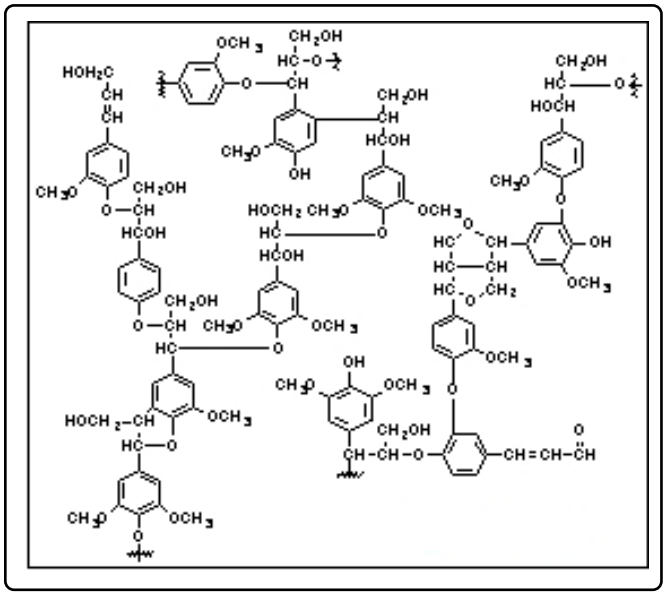


Figura 3.4. Estrutura modelo da lignina. Fonte: Chemical Sciences Division (2009).

3.2 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Devido à alta complexidade dos materiais lignocelulósicos, é recomendável a separação das distintas frações dessa biomassa para sua utilização. O objetivo do pré-tratamento é promover o fracionamento da

celulose, hemicelulose e lignina; aumentar a porosidade do material; além de aumentar a fração de celulose amorfa e reduzir o grau de cristalinidade da celulose (VASQUEZ et al., 2007). O aumento da área superficial acessível da celulose é considerado como um dos fatores mais influentes na eficiência da degradação enzimática (ARANTES & SADDLER, 2010).

Assim também, o pré-tratamento do material lignocelulósico é indicado quando se pretende realizar a produção de enzimas (OLOFSSON et al., 2008). Após a desorganização do complexo lignocelulósico, a celulose se torna mais acessível ao microrganismo, agindo como indutor da produção de celulases.

3.3 Glicosil hidrolases

As glicosil hidrolases (GH) são um conhecido grupo de enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma unidade de não-carboidrato. Estas enzimas são identificadas como EC 3.2.1 - segundo a *Enzyme Commission* (EC) da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB). A nomenclatura das glicosil hidrolases de acordo com a IUBMB baseia-se na sua especificidade ao substrato e, ocasionalmente, no seu mecanismo molecular. Tal classificação, no entanto, não reflete as características estruturais destas enzimas (IUBMB, 2013). Já a classificação das glicosil hidrolases em famílias pelo banco de dados *Carbohydrate-Active Enzymes* (CAZy) é baseada nas similaridades de sequência de aminoácidos, pois há uma relação direta entre sequência e enovelamento (HENRISSAT, 1991; CAZY, 2013). O banco de dados CAZy permite o acesso a uma classificação de famílias baseada na sequência, relacionando esta sequência à especificidade e estrutura 3D dessas enzimas que unem, modificam e desagregam oligo- e polissacarídeos (LOMBARD et al., 2013).

Até 2013 são conhecidas 133 famílias de glicosil hidrolases, cujas características estão detalhadas no banco de dados CAZy (CAZY, 2013). Algumas das famílias são agrupadas em clãs, de acordo com a semelhança de enovelamento das proteínas, que geralmente é mais bem conservado do que as sequências.

As seguintes características são observadas em cada um dos tipos de enovelamento (figura 3.5):

- *Jerry roll barrel*: estrutura complexa que consiste de quatro pares de folhas β-pregueadas antiparalelas na forma tridimensional de barril;
- β-*hélice*: caracterizada por quatro a oito folhas pregueadas em forma de lâmina, organizadas como uma volta em torno de um eixo central. Geralmente cada folha tem quatro configurações β anti-paralelas, de modo que a primeira e a quarta folha são perpendiculares uma a outra. O sítio ativo da enzima tipicamente é localizado no centro da hélice;
- *$(\beta/\alpha)_8$ ou TIM barrel*: formado por oito folhas β-pregueadas e oito folhas de α-hélice que se alternam na cadeia polipeptídica;
- *α+β*: a estrutura secundária é composta de α-hélice e folha β-pregueada;
- *Somente β*: o enovelamento é somente β, com folhas não arranjadas ao redor de um eixo central.

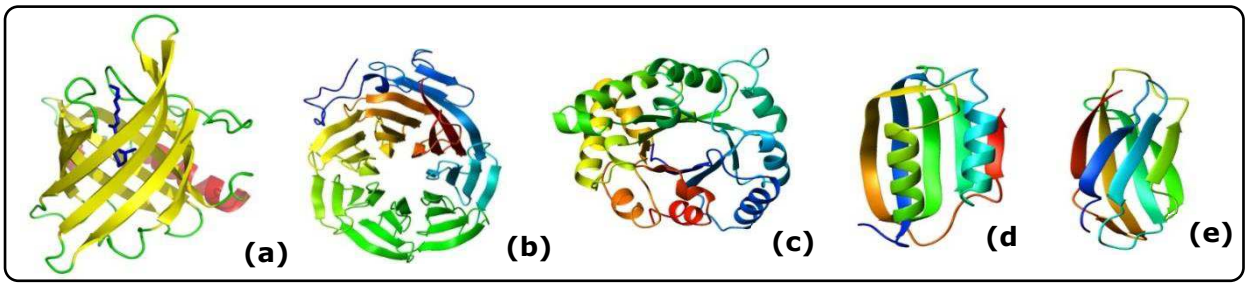


Figura 3.5. Tipos de enovelamento de glicosil hidrolases. Jelly roll barrel (A); β-hélice (B); (β/α)8 ou TIM barrel (C); α+β (D); somente β (E). Fonte: MacGregor (2005); CAZy (2013).

Como exemplo de glicosil hidrolase, a figura 3.6 apresenta a estrutura tridimensional da celobiohidrolase II (CBH II) de *Trichoderma reesei*. A CBH II

consiste de um domínio único, em que sete fitas β indicadas na figura estão arranjadas em estrutura de barril, sendo que as seis primeiras fitas são conectadas por α-hélices (ROUVINEN et al., 1990).

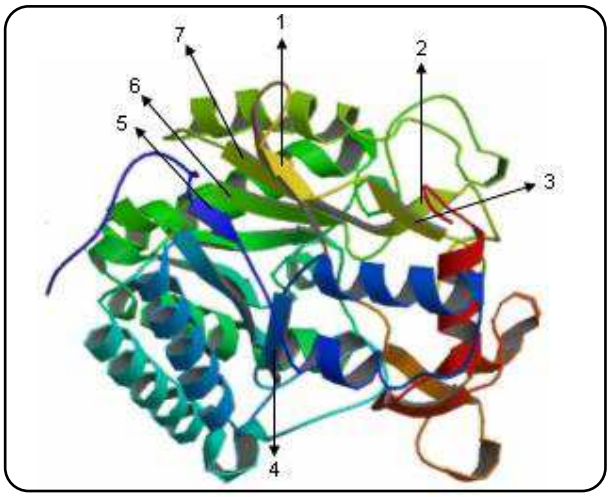


Figura 3.6. Exemplo de glicosil hidrolase: estrutura tridimensional da celobiohidrolase II (CBH II) de *T. reesei*. As sete fitas β indicadas na figura estão dispostas em estrutura de barril e as seis primeiras fitas são conectadas por α-hélices. Fonte: Rouvinen et al., 1990.

Como relatado anteriormente, a unidade básica de classificação das GH é a família. Contudo, devido ao aumento de informações sobre a estrutura terciária das proteínas, uma unidade maior foi definida – os chamados 'grupos'. Um grupo contém duas ou mais famílias com o mesmo tipo de enovelamento do domínio catalítico. Atualmente, são definidos quatorze grupos de glicosil hidrolases, nomeados como GH-A a GH-N, de acordo com o tipo de enovelamento, como apresentado na tabela 3.1.

É possível verificar que a configuração mais comum de enovelamento das GH é o tipo $(\beta/\alpha)_8$ representado majoritariamente pelo grupo GH-A, com dezenove famílias, além do grupo GH-D, com três famílias. Os demais grupos, com as configurações β-*jelly roll,* β-hélice 6-dobras, β-hélice 5-dobras, $(\alpha/\alpha)_6$, $(\beta/\alpha)_8$, α+β, $(\alpha/\alpha)_6$ e β-hélice, contêm de duas a quatro famílias cada.

Tabela 3.1. Grupos das famílias glicosil hidrolases.

Grupo	Tipo de Enovelamento	Famílias						
		1	2	5	10	17	26	30
GH-A	$(\beta/\alpha)_8$	35	39	42	50	51	53	59
		72	79	86	113	128		
GH-B	β-*jelly roll*	7	16					
GH-C	β-*jelly roll*	11	12					
GH-D	$(\beta/\alpha)_8$	27	31	36				
GH-E	β-hélice 6-dobras	33	34	83	93			
GH-F	β-hélice 5- dobras	43	62					
GH-G	$(\alpha/\alpha)_6$	37	63					
GH-H	$(\beta/\alpha)_8$	13	70	77				
GH-I	α+β	24	46	80				
GH-J	β-hélice 5- dobras	32	68					
GH-K	$(\beta/\alpha)_8$	18	20	85				
GH-L	$(\alpha/\alpha)_6$	15	65	125				
GH-M	$(\alpha/\alpha)_6$	8	48					
GH-N	β-hélice	28	49					

Fonte: CAZy (2013).

Em termos de mecanismo catalítico, na maioria dos casos, a hidrólise da ligação glicosídica pelas GH é catalisada por dois resíduos de aminoácidos da enzima: um ácido geral (doador de prótons) e um nucleófilo/base. Dependendo da posição espacial desses resíduos catalíticos, a hidrólise ocorre por meio de inversão total ou retenção total da configuração anomérica (figuras 3.7 e 3.8).

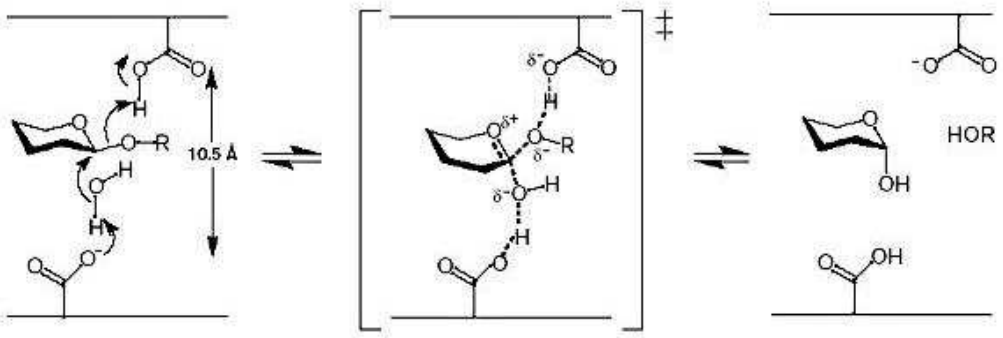


Figura 3.7. Mecanismo de ação das hidrolases por inversão. Fonte: Sinnott (1990).

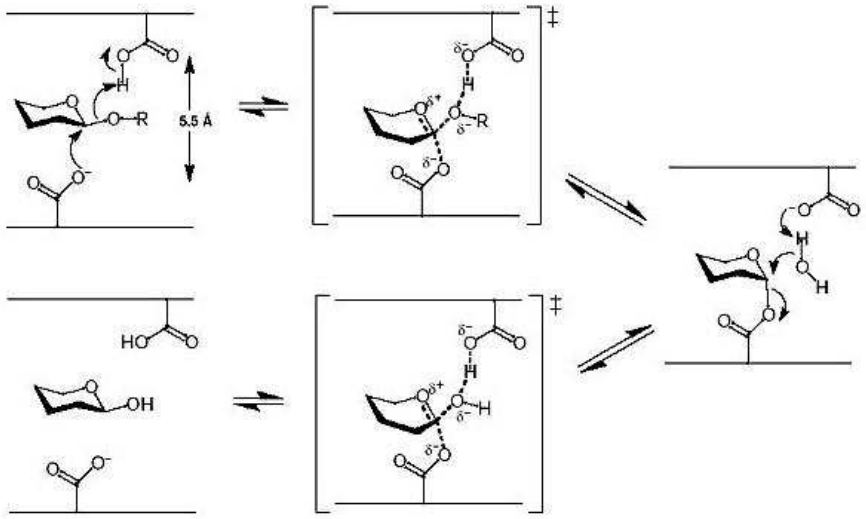


Figura 3.8. Mecanismo de ação das hidrolases por retenção. Fonte: Sinnott (1990).

3.4 Celulases

Celulases são glicosil hidrolases (EC 3.2.1 -) que catalisam a hidrólise das ligações β(1,4) da celulose e atuam sinergicamente na sua degradação disponibilizando açúcares fermentáveis (ZHANG & LYND, 2004). Na tabela 3.2 é apresentada a classificação das celulases de acordo com a IUBMB: códigos *Enzyme Comission* (E.C.), nomes oficiais, nomes alternativos e reações catalisadas (NC-IUBMB, 2013).

O consórcio enzimático de celulases é formado fundamentalmente por três grupos de enzimas que atuam em diferentes regiões do substrato celulósico: endoglucanases, que catalisam a hidrólise das ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases, que agem na região externa da celulose; e β-glucosidases, que catalisam a hidrólise de oligossacarídeos solúveis, convertendo-os à glicose (LYND et al., 2002).

Tabela 3.2. Classificação das celulases de acordo com a IUBMB: códigos Enzyme Comission (E.C.), nomes oficiais, nomes alternativos e reações catalisadas.

Código E.C	Nome oficial	Nomes alternativos	Reação catalisada
3.2.1.4	Celulase	Beta-1,4-endoglucan hidrolase; Beta-1,4-glucanase; Carboximetil celulase; Celodextrinase; Endo-1,4-β-D-glucanase; Endo-1,4-β-D-glucanohidrolase; Endo-1,4-β-glucanase; Endoglucanase.	Endohidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas da celulose e beta-glucanas.
3.2.1.21	β-glucosidase	Amigdalase; β-D-glucoside glucohidrolase; Celobiase; Gentobiase.	Hidrólise do terminal, β-1-4-D-glicosídeo com liberação de glicose
3.2.1.74	Glucan 1,4-β-glucosidase	1,4-β-D-glucan glucohidrolase; Exo-1,4-beta-D-glucosidase; Exo-1,4-beta-glucanase; Exo-1,4-beta-glucosidase.	Hidrólise de ligações 1-4 em β-D-glicanas com remoção sucessiva de unidades de glicose.
3.2.1.91	Celulose 1,4-β-celobiosidase.	1,4-β-celobiohidrolase; 1,4-β-D-glucan celobiohidrolase; Avicelase; Exo-1,4-β-D-glucanase; Exocelobiohidrolase; Exoglucanase.	Hidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas em celulose, celohexose e celotetraose, liberando celobiose

Fonte: NC-IUBMB (2013).

3.4.1 Endoglucanases (EG)

As endoglucanases, referenciadas como endo-1,4-β-D-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4) são responsáveis por catalisar o início da hidrólise da celulose. Estas enzimas clivam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, deixando livres oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e novos terminais, um redutor e um não redutor (LYND et al., 2002). Estas regiões amorfas da molécula de celulose são mais facilmente atacadas, pois não possuem tantas ligações de hidrogênio intermoleculares quanto as regiões cristalinas (MARTINS, 2005).

3.4.2 Exoglucanases (ExG)

Existem dois tipos de exoglucanases: celobiohidrolases (1,4-β-D-glucana-celobiohidrolases) (3.2.1.91) e glucanohidrolases (3.2.1.74). São relatados dois tipos de celobiohidrolases (CBHs): CBH tipo I, que catalisam a hidrólise dos terminais redutores, ao passo que as CBH tipo II atuam na hidrólise dos terminais não redutores. As celobiohidrolases podem ser inibidas por celobiose, que é seu produto de hidrólise (LYND et al., 2002). As glucanohidrolases (1,4-β-D-glucana-glucanohidrolases) (GHs) atuam liberando glicose diretamente dos terminais do polímero celulósico. A figura 3.9 mostra uma representação de uma exoglucanase (CBH I) atuando sobre uma fibrila de celulose.

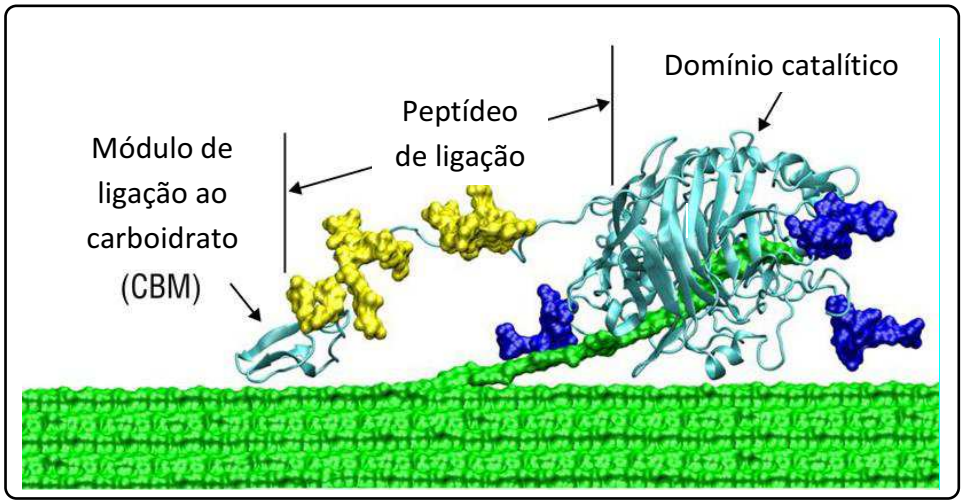


Figura 3.9. Exemplo de uma exoglucanase (CBH I) atuando sobre uma fibrila de celulose.
Fonte: adaptado de Himmel et al. (2000).

3.4.3 β-glucosidases (BG)

As β-glucosidases, sistematicamente conhecidas como β-glucosídeo glucohidrolases (EC 3.2.1.21) catalisam a hidrólise da celobiose e oligossacarídeos solúveis a glicose. Essas enzimas do complexo celulásico podem também sofrer inibição por seu produto de hidrólise, que neste caso é a glicose (LYND et al., 2002).

3.4.4 Sinergia do complexo celulásico

Atualmente, sabe-se que a sinergia das celulases ocorre de modo que um grupo de enzimas age gerando produto para atuação de outro grupo (figura 3.10). Isto promove um maior rendimento do complexo celulásico quando comparado à soma dos rendimentos individuais (LYND et al., 2002).

São descritos três tipos de sinergismo: Endo-exo: as endoglucanases agem na região amorfa da fibra, formando terminais redutores e não redutores para a posterior ação da CBH I e CBH II; Exo-exo: CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não-redutores disponibilizados pela ação das endoglucanases; Exo-BG: as celobiohidrolases liberam celobiose, que é o substrato para as β-glucosidases.

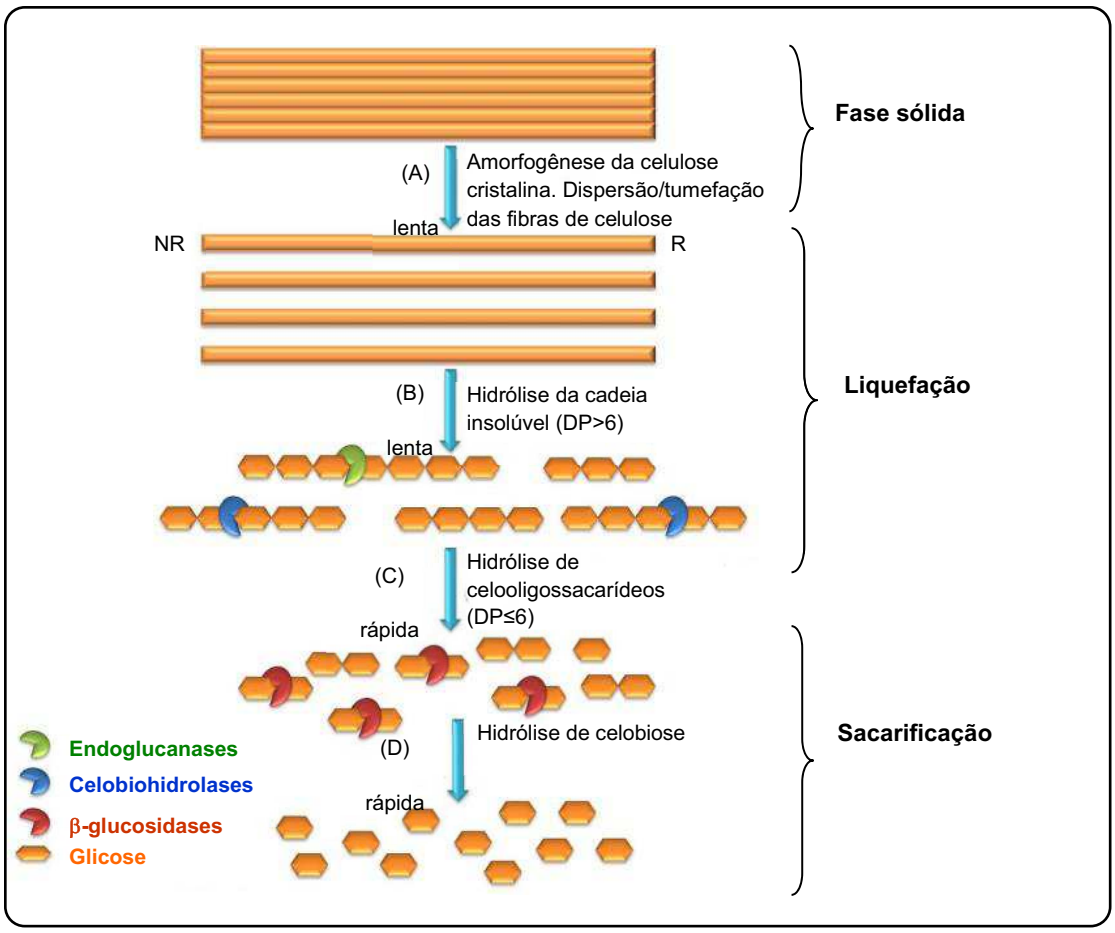


Figura 3.10. Ação sinérgica das celulases durante a hidrólise enzimática da celulose. NR: terminal não redutor. R: terminal redutor. Fonte: Arantes e Saddler (2010).

3.5 Etapas e vantagens da hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise da celulose catalisada pelas celulases ocorre de acordo com as seguintes etapas (ZHANG & LYND, 2004):

1. As enzimas do complexo celulásico são distribuídas por difusão para a região do substrato celulósico. Quando se trata de substrato insolúvel, a difusão acontece na direção do filme adjacente à partícula do substrato;
2. ocorre a adsorção da enzima pelo substrato celulósico, por meio do domínio de ligação à celulose;
3. forma-se um complexo ativo celulase-substrato;
4. as ligações glicosídicas do polímero celulósico são hidrolisadas;
5. os produtos de hidrólise do sítio ativo celulase-substrato distribuem-se pelo seio do fluido;
6. finalmente as enzimas do complexo celulásico são dessorvidas do substrato hidrolisado.

Como vantagens da hidrólise enzimática da celulose são descritos: condições brandas de reação (pressão, temperatura e pH); alta especificidade; não produz inibidores, gerando maior eficiência de hidrólise; e é "ambientalmente amigável". Quanto às desvantagens, são relatados tempo de reação longo e custo elevado de produção das enzimas (LI et al., 2005; BOLLÓK & RÉCZEY, 2000).

3.6 Amorfogênese da celulose

Estudos recentes têm relatado que existem proteínas acessórias que auxiliam a desagregação das fibras de celulose para posterior ação das celulases (ARANTES & SADDLER, 2010). A amorfogênese da celulose, descrita

como o "afrouxamento" não hidrolítico ou ruptura de um substrato celulósico, é cada vez mais reconhecida como uma das principais etapas da desconstrução enzimática da biomassa celulósica.

Muitos grupos de pesquisa têm se dedicado a determinar os papéis das proteínas hidrolíticas envolvidas na solubilização e despolimerização dos carbohidratos dentro da matriz da biomassa lignocelulósica. No seu estado nativo, as cadeias de celulose normalmente existem em pacotes hermeticamente embalados dentro de um revestimento complexo de hemiceluloses e lignina (ARANTES E SADLER, 2010). A fim de que as celulases catalisem a hidrólise das ligações glicosídicas dentro destas cadeias, elas devem primeiro ser capazes de difundir-se para esta densa e heterogênea matriz e acessar a celulose (ARANTES E SADLER, 2010).

Tem sido cada vez mais notório que a desconstrução enzimática da celulose ocorre através de dois distintos passos. Em primeiro lugar, uma ruptura inicial do substrato, a chamada fase "amorfogênese da celulose", é mediada, pelo menos em parte, por proteínas disruptivas não hidrolíticas. Esta etapa é necessária para melhorar a acessibilidade da celulose à mistura de celulases enquanto que, no passo seguinte, as celulases se difundem na celulose e catalisam a sua hidrólise. Embora as funções básicas e mecanismos das principais enzimas hidrolíticas tenham sido estudadas extensivamente, pouco se sabe sobre o papel das proteínas não-hidrolíticas que estão envolvidas na desorganização do substrato antes da hidrólise. Por meio de um melhor entendimento do papel que as proteínas não hidrolíticas desempenham no rompimento de materiais lignocelulósicos, deve ser possível desenvolver preparações de enzimas mais eficientes, trazendo-nos, assim, uma etapa mais próxima de alcançar uma eficaz biorrefinaria baseada na relação enzima-açúcar. Vários organismos celulolíticos têm mostrado produzir

proteínas não hidrolíticas capazes de catalisar o rompimento de substratos celulósicos e lignocelulósicos (ARANTES E SADLER, 2010; GOURLAY et al., 2012).

Embora os mecanismos exatos pelos quais estas proteínas rompem o substrato ainda têm de ser estudados, observações qualitativas e semiquantitativas sugeriram que este rompimento pode ser manifestado como uma delaminação, fibrilação, inchaço, afrouxamento, rugosidade, desgaste, enfraquecimento, ou descristalização de substratos celulósicos e lignocelulósicos. O termo amorfogênese tem sido sugerido como uma maneira de descrever qualquer combinação desses fenômenos induzidos por proteínas não hidrolíticas (ARANTES E SADLER, 2010).

Estudos têm sugerido que a acessibilidade ao nível macroscópico (fibra), microscópico (fibrila) e nanoscópico (microfibrilas) restringe efetiva hidrólise enzimática. Interessantemente, proteínas disruptivas não hidrolíticas mostraram romper o substrato em cada um desses três níveis organizacionais. Assim, é provável que estas proteínas desempenhem um papel-chave no aumento da eficácia da hidrólise enzimática. Por exemplo, a amorfogênese induzida por proteínas disruptivas não hidrolíticas tem sido observada em: 1) nível macroscópico através da dispersão das fibras adjacentes, 2) nível microscópico através do afrouxamento / rugosidade / inchaço das paredes das células vegetais, e 3) nível nanoscópico através do desgaste de microfibrilas e descristalização da celulose (Figura 3.11) (GOURLAY et al., 2012).

Recentemente, Arantes e Sadler (2010) sugeriram que proteínas disruptivas não hidrolíticas podem ser classificadas em dois grupos distintos. Aqueles com um mecanismo catalítico ainda desconhecido tais como swolenina, loosenina, expansinas e várias CBMs da Família 1 e Família 2, e aqueles que agem através de mecanismo catalítico oxidativo direto, tal como

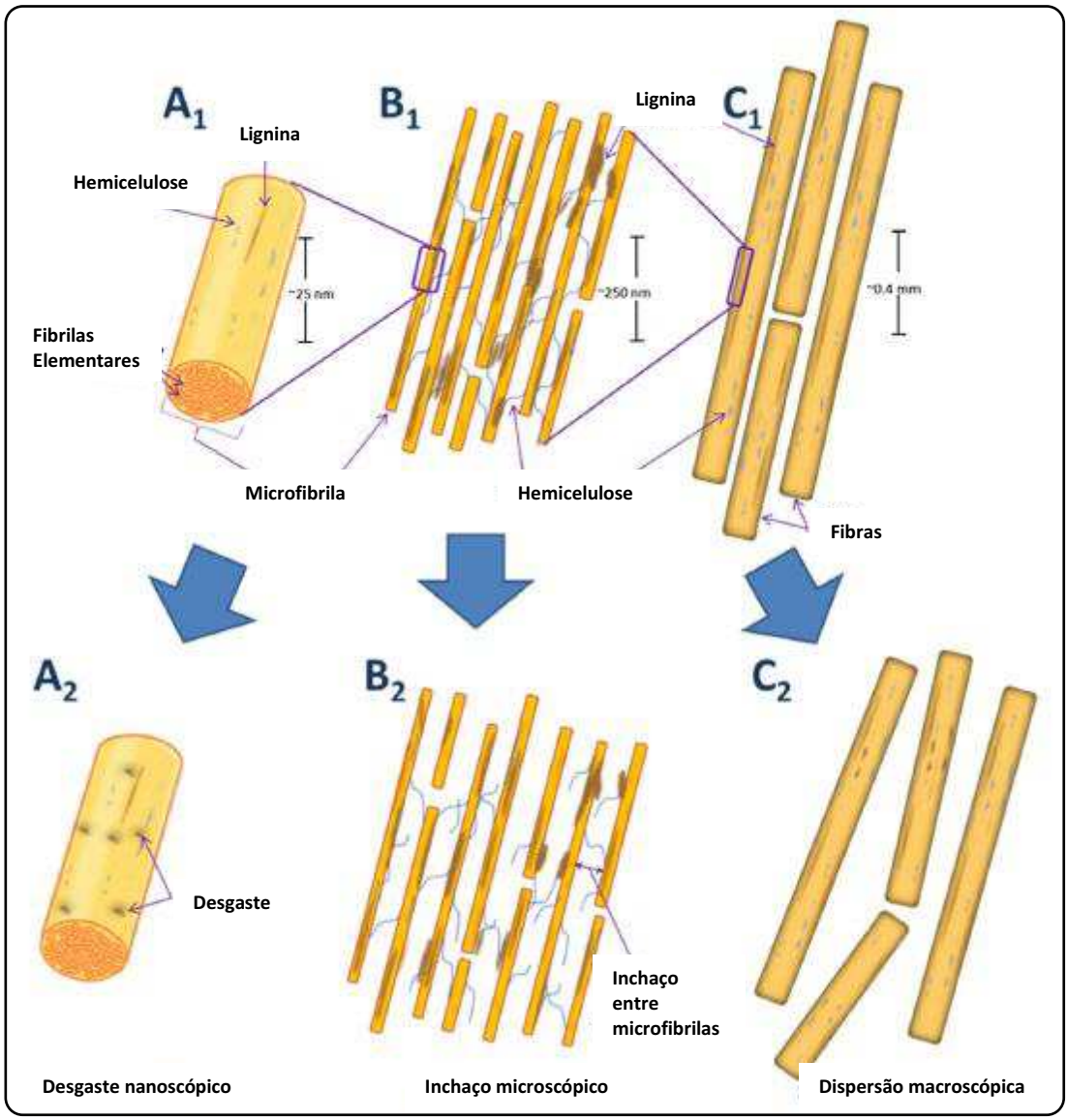


Figura 3.11. Representação esquemática simplificada da amorfogênese ocorrendo em três níveis de organização da biomassa. Material de planta nativa em níveis de organização nanoscópico (A1), microscópico (B1) e macroscópico (C1). Após amorfogênese induzida por proteínas disruptivas não hidrolíticas, desgaste nanoscópico (A2), inchaço/rugosidade microscópicos (B2), e dispersão macroscópica (C2) são observados. Tais efeitos ocorrem sem liberação significativa de açúcares a partir do substrato. Fonte: Gourlay et al. (2012).

monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs ou antigas GH61) e CBMs Família 33. Estes dois grupos de proteínas agem de maneiras distintas sobre o substrato. Por exemplo, várias das proteínas com função catalítica não caracterizada, como swolenina, expansina e loosenina, são conhecidas por

promover amorfogênese através da ruptura da rede de ligações de hidrogênio do substrato (isto é, sem clivagem direta das cadeias de carbohidratos). Em contraste, as proteínas oxidativas que atuam sobre o substrato fazem isto através de um mecanismo oxidativo catalítico direto, onde espécies radicais são geradas em estreita proximidade com a superfície da celulose, resultando na clivagem oxidativa direta das cadeias de celulose. Ambos os grupos de proteínas têm como tema comum a liberação de oligômeros solúveis do substrato. As beta-expansinas, por exemplo, mostraram solubilizar tanto hemicelulose quanto pectina de paredes celulares de milho nativo, enquanto que as proteínas oxidativas (LPMOs) e CBM33 promovem a liberação de celo-oligossacarídeos solúveis a partir de substratos celulósicos. Outra evidência apoiando o papel de proteínas não hidrolíticas na amorfogênese da celulose vem a partir de relatos de que as proteínas disruptivas com mecanismos catalíticos desconhecidos parecem melhorar a hidrólise enzimática de substratos nativos e pré-tratados (JÄGER et al., 2011).

Em adição a estas proteínas, o aumento da atividade da hidrólise foi também observado para proteínas disruptivas oxidativas. Em particular, LPMOs têm mostrado reduzir significativamente o total de proteína necessário para atingir 70-80% de eficiência de hidrólise de palha de milho pré-tratado (HARRIS et al., 2010). Estes resultados sugerem que proteínas não hidrolíticas podem agir dentro de uma escala de tempo similar que a da hidrólise enzimática e que são capazes de promover ainda mais amorfogênese em um substrato que já tenha sido rompido por um pré-tratamento físico-químico.

Atualmente, são conhecidas diversas proteínas disruptivas não hidrolíticas e seus efeitos sobre a biomassa, conforme descrito na tabela 3.3 (GOURLAY et al., 2012).

Tabela 3.3. Proteínas disruptivas não-hidrolíticas e seus efeitos na biomassa.

Proteínas com mecanismo catalítico desconhecido	**Função putativa**
CBMs famílias 1 e 2	Desgaste da fibra/rugosidade, liberação de partículas pequenas
Swolenina, Loosenina	Inchaço da fibra, dispersão da microfibrila, dispersão de agregados de celulose
Expansinas	Afrouxamento de paredes celulares de plantas, solubilização de açúcares oligoméricos
Proteínas como expansinas	Afrouxamento de papel de filtro, dispersão de agregados de celulose
Proteína formadora de fibrila	Liberação de fibrila de papel de filtro
Proteínas com mecanismo catalítico oxidativo putativo	**Função putativa**
GH61	Clivagem oxidativa de celulose cristalina
CBM33	Clivagem oxidativa de celulose cristalina

Fonte: Arantes & Sadler (2010); Gourlay et al. (2012).

3.6.1 Expansinas

Expansinas são proteínas derivadas de plantas, conhecidas principalmente por seu efeito de 'afrouxamento' da rede celulósica dentro das paredes celulares das plantas durante o crescimento (MCQUEEN-MASON et al., 1992; YENNAWAR, 2006). Atualmente, a maioria das evidências sugere que existe uma ação não-hidrolítica de expansinas que clivam ligações de hidrogênio dentro microfibrilas de celulose e entre outros polissacarídeos da parede celular ligados às microfibrilas, e assim ampliam cavidades da parede celular. Estudos indicam que expansinas agem como um dispositivo molecular que utiliza a energia de tensão armazenada em uma ligação celulósica tensionada para ajudar a dissociar a glicana a partir da superfície da celulose (COSGROVE, 2000; YENNAWAR, 2006).

Apesar da falta de atividade hidrolítica, alguns estudos demonstraram que as expansinas contribuem com o aumento da eficiência de hidrólise enzimática da celulose cristalina por celulases (FRY, 1994; KIM et al., 2009).

Neste modelo, acredita-se que as expansinas agem como um zíper abrindo as ligações cruzadas das microfibrilas de celulose pelo descolamento das cadeias que as unem, o que por sua vez aumenta a acessibilidade da celulose, portanto acelerando a ação das celulases. Por exemplo, BAKER et al. (2000) mostrou que adições de quantidades extremamente pequenas de expansinas juntamente com celulases de *T. reesei* foi suficiente para induzir um aumento de até 13% em conversão de celulose em comparação com o rendimento de açúcar obtido quando utilizou-se somente celulases.

A figura 3.12 mostra a representação de como as moléculas de expansinas podem agir entre as microfibrilas de celulose e hemicelulose clivando as ligações de hidrogênio, gerando o inchaço da célula na parede celular vegetal e consequentemente uma pressão de turgor. Como as microfibrilas adjacentes são gradualmente separadas, o trabalho realizado por esta força deve garantir que as ligações de hidrogênio clivadas não retornem facilmente depois da ação das moléculas de expansinas (FRY, 1994).

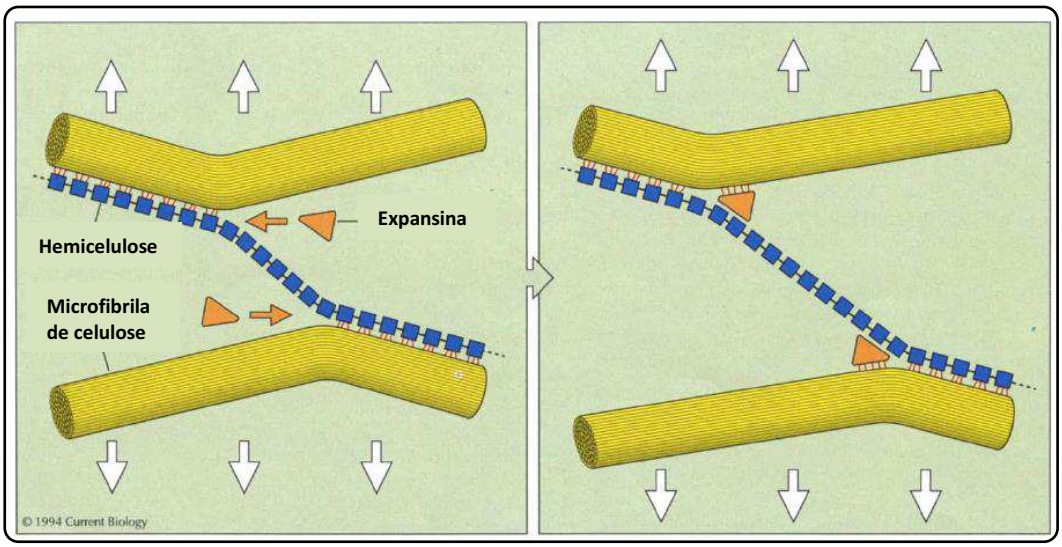


Figura 3.12. Representação de como as moléculas de expansinas podem agir entre as microfibrilas de celulose e hemicelulose clivando as ligações de hidrogênio (linhas vermelhas). As setas brancas representam a força exercida para fora (como a pressão de turgor) pelo inchaço da célula na sua parede. Fonte: FRY, 1994.

3.6.2 Swoleninas

As swoleninas foram inicialmente descritas em 2002 por um grupo de pesquisa da Finlândia. Saloheimo et al. (2002) relataram a descoberta de uma nova proteína fúngica, swolenina, uma proteína de *T. reesei* com a similaridade de sequência à expansina de plantas, que exibe atividade de rompimento em materiais celulósicos. A proteína foi nomeada swolenina devido à sua capacidade de inchar as fibras de algodão.

Como previamente descrito, proteínas da parede celular vegetal chamadas expansinas são conhecidas por romper a ligação de hidrogênio entre polissacarídeos da parede celular sem hidrolisá-los. De modo semelhante, swoleninas poderiam agir através da clivagem de ligações de hidrogênio na fibra de celulose. De acordo com Saloheimo et al. (2002) o gene de swolenina isolado a partir do fungo celulolítico *T. reesei* possui similaridade de sequência à expansina de plantas. Este estudo mostrou que swolenina tem um domínio fúngico N-terminal de ligação à celulose semelhante ao domínio de expansina. A figura 3.13 mostra a estrutura básica de swolenina, em que se observa um domínio de homologia à expansina.

Figura 3.13. Estrutura básica da swolenina. As setas verticais indicam as posições dos íntrons. SS, sequência sinal; CBM, módulo de ligação à celulose; QQ, duas glutaminas que podem formar o N-terminal da swolenina madura. A numeração refere-se às posições de aminoácidos na proteína madura. Fonte: Saloheimo et al. (2002).

Comparando-se o alinhamento da swolenina de *T. reesei* com duas expansinas de plantas (de tomate e de pepino), foram identificados

aminoácidos invariantes e substituições conservativas, confirmando a semelhança entre expansina e swolenina (Saloheimo et al., 2002). O alinhamentos das respectivas proteínas é apresentado na figura 3.14.

```
                    +       +           ↓
SWO1     EVHHVS--SNESWHYSRSTHFGL-----TSGGACGFGLYGLCTKG   190
LEEX1    EGRIPGVYSGGSWETAHATFYGGSDASGTMGGACGYG--NLYSQG    73
CUEXS2   F-LFVNAFTASGWAPAHATFYGESDASGTMGGACGYG--NLYQTG    70
              .  ....*  ...* .* ..   * *****.*   *   *

SWO1     SVTASWTDPMLGATCDAFCTAYPLLCKDPTGTTLRGNFAAPNGDY   235
LEEX1    YGVNT----------------------------------------    78
CUEXS2   YGTRT----------------------------------------    75
             .
                          ↓  ↓
SWO1     YTQFWSSLPGALDN-YLSCGECIELIQTKPDGTDYAVGEAGYTDP   279
LEEX1    -----AALSTALFNNGLSCGACFELK-------------------    89
CUEXS2   -----AALSTALFNDGASCGQCFKII-------------------    86
              ..*  ** *.  ***.*...
                 ↓       +↓                ↓
SWO1     ITLEIVDSCPCSANSKWCCGPGADHCGEIDFKYGCPLPADS----   320
LEEX1    --------CTNTPNWKWC-LPGNPSILITATNF-CPPNYALPNDN   124
CUEXS2   --------CDYKTDPRWC-IKGA-SVTITATNF-CPPNYALPNNN   120
                 * .  . .**.  *.          . **
                                              +    ↓
SWO1     --------IHLDLSDIAMGRLQGNGSLTNGVIPTRYRRVQCPKVG   357
LEEX1    GGWCNPPRPHFDLAMPMFLKL---AQYRAGIVPVTYRRIPCRKQG   166
CUEXS2   GGWCNPPLKHFDMAQPAWQKI---GIYRGGIIPVLYQRVPCKKRG   162
                  *.*..     ..       .*..*  *.*..* * *
                     ++                          +
SWO1     NAYIWLRNGGGPYYFALTAVNTNGPGSVTKIEIKGADTDNWVALV   402
LEEX1    G--IRFTINGFRYFNLVLITNVAGAGDIIKVWVKGTKT-NWIPLS   208
CUEXS2   G--VRFTVNGRDYFELVLITNVGGAGDIKSVSIKGSKSSNWTPMS   205
         .  . .   * .*.       * .*.* .  . .**. . ** ..
                      +
SWO1     HDPNYTSSRPQERYGSWVIPQGSGPFNLPVGIRLTSPTGEQIVNE   447
LEEX1    RN-------WGQNWQSNAVLTGQSLSFRVA-SDHRSSTSWNMVPS   246
CUEXS2   RN-------WGANWQSNSYLNGQSLSFKVTTSDGQVQVFNNVVPS   243
         .          .  . *   . * .                ..*

SWO1     QAIKTFTPPATGDPNFYYIDIGVQFSQN   475
LEEX1    HWQFGQTFIGKNFKI   261
CUEXS2   SWRFGQTFASKVQFS   258
             . *  .
```

Figura 3.14. Alinhamento da swolenina com duas α-expansinas, LeEx1 de tomate e CuExS2 de pepino. Aminoácidos invariantes são mostrados por asteriscos e substituições conservativas por pontos. As regiões mais conservadas entre α e β-expansinas são sublinhadas em CuExS2. As cisteínas conservadas são mostradas por setas e as posições com aminoácidos aromáticos conservados em todas as três sequências por +0. As regiões com homologia às repetições FnIII em titina estão em negrito em SwoI. Fonte: Saloheimo et al. (2002).

Wang et al. (2011) propuseram uma estrutura modelada simples de swolenina e a possível interação entre as moléculas de swolenina e uma cadeia de celulose (Figura 3.15). Estes autores produziram swolenina de *Trichoderma asperellum* em *Escherichia coli*, e de acordo com este estudo foram identificados aminoácidos aromáticos no domínio CBM que poderiam interagir com os anéis dos glicídios da celulose. A identificação foi feita pelo alinhamento de sequências com dois CBMs homólogos. Para esta swolenina foram observados três resíduos aromáticos (Y26, Y52 e Y53) conservados no CBM da swolenina, e os seus três anéis aromáticos podem se empilhar sobre os anéis de glicose da celulose. Assim, é provável que os resíduos aromáticos Y26, Y52 e Y53 do CBM de swolenina interajam com a celulose (Figura 3.15f/área A). Estes autores levantaram a hipótese que resíduos de tirosina e triptofano da superfície da proteína podem formar plataformas planas para interagir com celulose pela interação dos anéis aromáticos e anéis de glicose, como sugerido por Kerff et al. (2008). Foram mostradas as posições destes resíduos de tirosina e triptofano na superfície da molécula de proteína. Vários resíduos aromáticos foram expostos e concentrados em duas áreas superficiais. Em uma área, os resíduos podem formar uma superfície estendida plana que se alinha com as três resíduos aromáticos do domínio CBM (Fig. 7c-F). Por fim, foi definida a localização da cadeia de celulose.

Em termos de aplicação sobre a celulose, swolenina demonstrou romper a estrutura das fibras de algodão e da parede celular da planta *Valonia*, e enfraquecer as ligações de papel de filtro. Foi evidenciado que esta capacidade de desagregar substratos sólidos não é resultado da atividade hidrolítica, visto que não foram detectados açúcares redutores no estudo feito por Saloheimo et al. (2002). Estes pesquisadores avaliaram o papel biológico de SWO I. O gene de swolenina foi expresso em levedura e *A. niger* var. *awamori*. Ensaios de

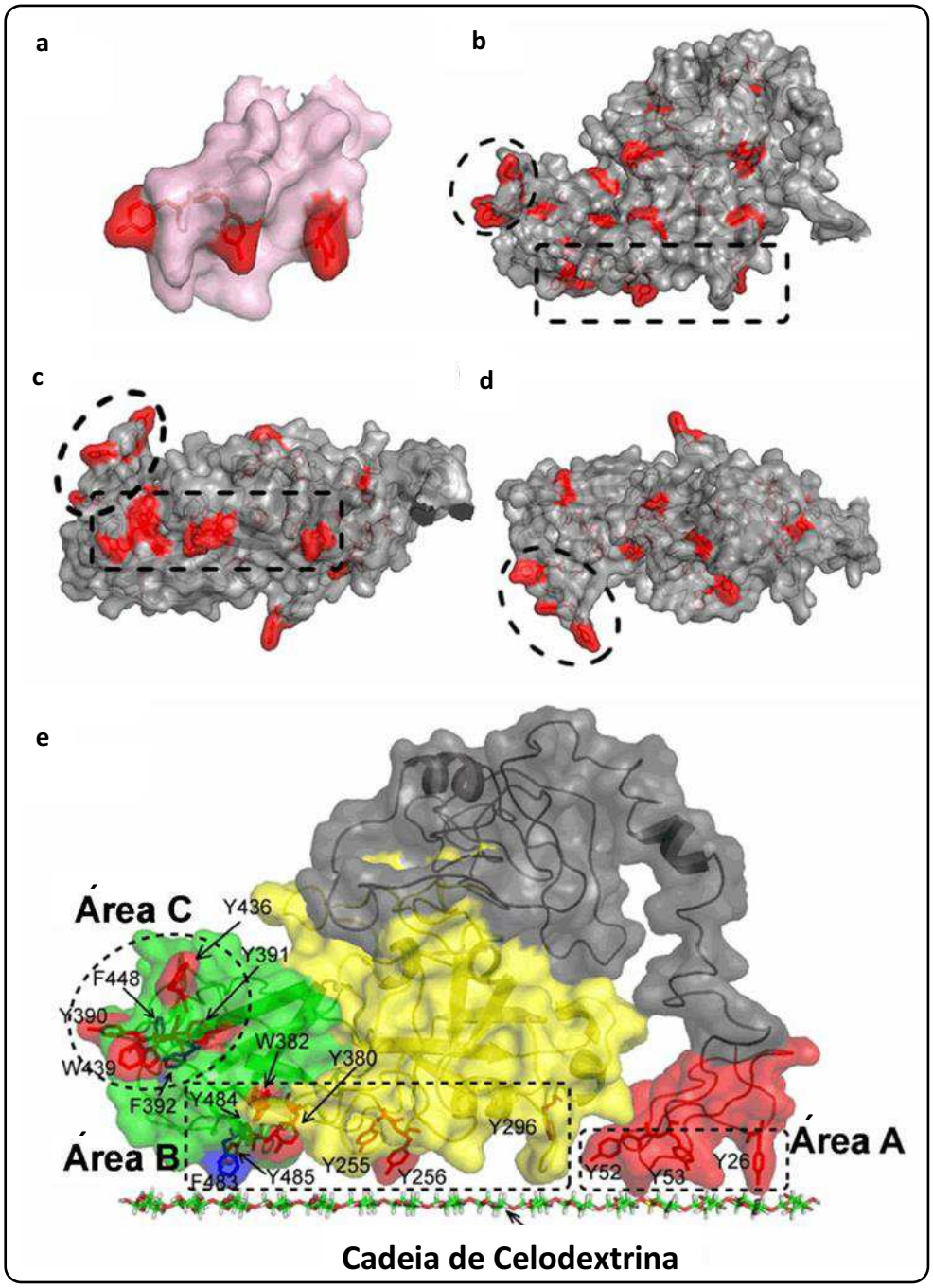


Figura 3.15. Interação entre uma swolenina e cadeia de celulose. Excluindo o peptídeo sinal, a molécula de swolenina (TasSWO) pode conter quatro regiões/domínios, mostrados em vermelho, cinza, amarelo e verde (e). Estrutura modelada de domínio CBM da swolenina (a). Três posições prováveis de interação com celulose são mostrados em vermelho. Vista lateral (b), vista inferior (c), e vista de cima (d) da estrutura modelada de três outros domínios. As superfícies externas formadas por tirosina e resíduos de triptofano na superfície da molécula de proteína são destacadas em vermelho. Quadrados com linhas quebradas marcam área B, círculo com linhas quebradas marcam área C. (e): Região vermelha é o CBM. Região cinza é uma região incerta, sua estrutura e função são desconhecidas. Regiões amarelas e verdes são homólogas ao domínio 1 e domínio 2 de expansina, respectivamente. Três áreas de superfície (área A, B e C) com resíduos aromáticos expostos e concentrados podem interagir diretamente com cadeias de celulose. As áreas A e B podem alinhar no mesmo plano e interagir com a mesma cadeia de celulose. Área C poderia interagir com outra cadeia de celulose ou de ter uma função diferente. Fonte: Wang et al. (2011).

atividade sobre o algodão e fibras de papel de filtro foram realizados com sobrenadante concentrado de levedura contendo swolenina. Os resultados mostraram que a swolenina rompeu a estrutura das fibras de algodão sem formação detectável de açúcares redutores. Adicionalmente, a proteína SWOI foi purificada a partir do sobrenadante da cultura de *A. niger* var. *awamori* e usada num ensaio de atividade com paredes celulares de *Valonia*. Swolenina rompeu a estrutura das paredes celulares sem produzir quantidades detectáveis de açúcares redutores. Isto aponta que estas proteínas de origem fúngica são inativas contra as ligações β-1,4-glicosídicas em celulose e que podem partilhar um papel semelhante às expansinas no inchaço da rede celulósica dentro das paredes celulares. Tais proteínas contêm um módulo de ligação celulósica amino-terminal homólogo ao módulo das expansinas de plantas, e são capazes de se desdobrar e redobrar facilmente. Esta capacidade pode ser importante para as swoleninas se a sua função é permitir o afrouxamento de microfibrilas de celulose em paredes celulares de plantas, tal como sugerido para expansinas (BAKER et al., 2000). Interessantemente, tem sido demonstrado que além de afrouxar e romper as paredes celulares das plantas, na natureza, swoleninas de *Trichoderma* podem aumentar a colonização da raiz da planta (BROTMAN et al. 2008).

Desta forma, Saloheimo et al. (2002) relataram que as swoleninas são componentes importantes na mistura enzimática requerida para a degradação da biomassa lignocelulósica. De fato, foi comprovado que as swoleninas aumentam o acesso das celulases às cadeias de celulose por promover a dispersão de agregações de celulose, expondo cadeias individuais de celulose para as interações com celulases. Além disso, se evidenciou de que os genes de swoleninas são regulados de uma maneira semelhante à dos genes de celulases de *T. reesei*, de modo que baixos níveis de expressão ocorrem na presença de

glicose e níveis elevados de expressão ocorrem na presença de celulose. Os autores concluíram que swolenina, através de seu modo de ação, rompendo a fibra de materiais celulósicos, contribui sinergicamente para a hidrólise eficaz de polissacarídeos vegetais. A figura 3.16 mostra a imagem de microscopia da estrutura da parede celular da planta *Valonia* (*in natura)* e após tratamento com tampão, swolenina, ou celulases.

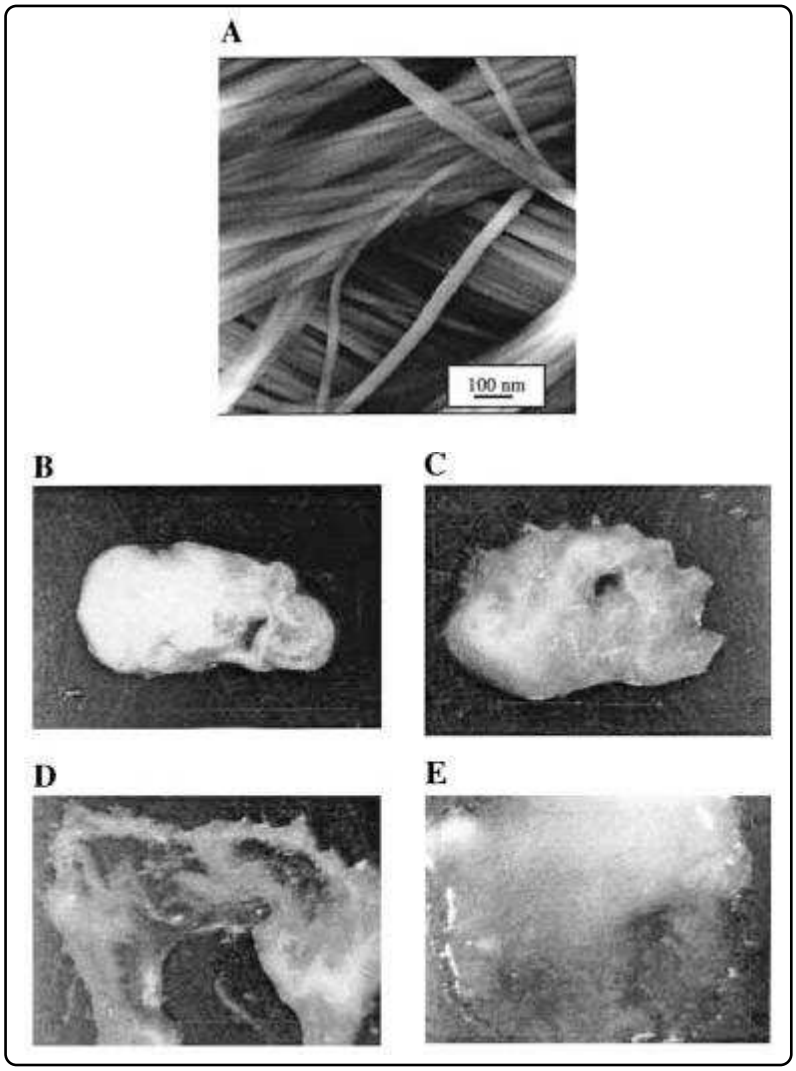


Figura 3.16. Imagem de microscopia de força atômica da estrutura da parede celular *Valonia* (A), e por microscopia óptica de fragmentos da parede celular de *Valonia* após tratamento somente com tampão (B), swolenina (C), CBHI (D) e EGII (E). Fonte: Saloheimo et al. (2002).

Jäger et al. (2011) expressaram swolenina de *T. reesei* em *Kluyveromyces lactis*. A swolenina purificada foi aplicada em substratos celulósicos insolúveis.

A avaliação microscópica revelou que swolenina causou a desagregação de aglomerados de celulose, como também a dispersão de microfibrilas de celulose (amorfogênese). Foram quantificados o efeito da swolenina no tamanho da partícula de celulose, adsorção máxima de celulase e cristalinidade da celulose. O pré-tratamento com swolenina resultou em um significante decréscimo no tamanho de partícula dos substratos celulósicos, como também da sua cristalinidade, e aumentou substancialmente a adsorção máxima de celulase nesses substratos. Subsequentemente, os substratos celulósicos pré-tratados com swolenina foram hidrolisados com celulases. Os resultados evidenciaram que o pré-tratamento com swolenina aumentou significativamente a eficiência de hidrólise, e que este aumento esteve diretamente relacionado à redução do tamanho de partícula e cristalinidade gerada pelo pré-tratamento.

Na figura 3.17 pode ser observado o efeito da swolenina na fibra de celulose (papel de filtro).

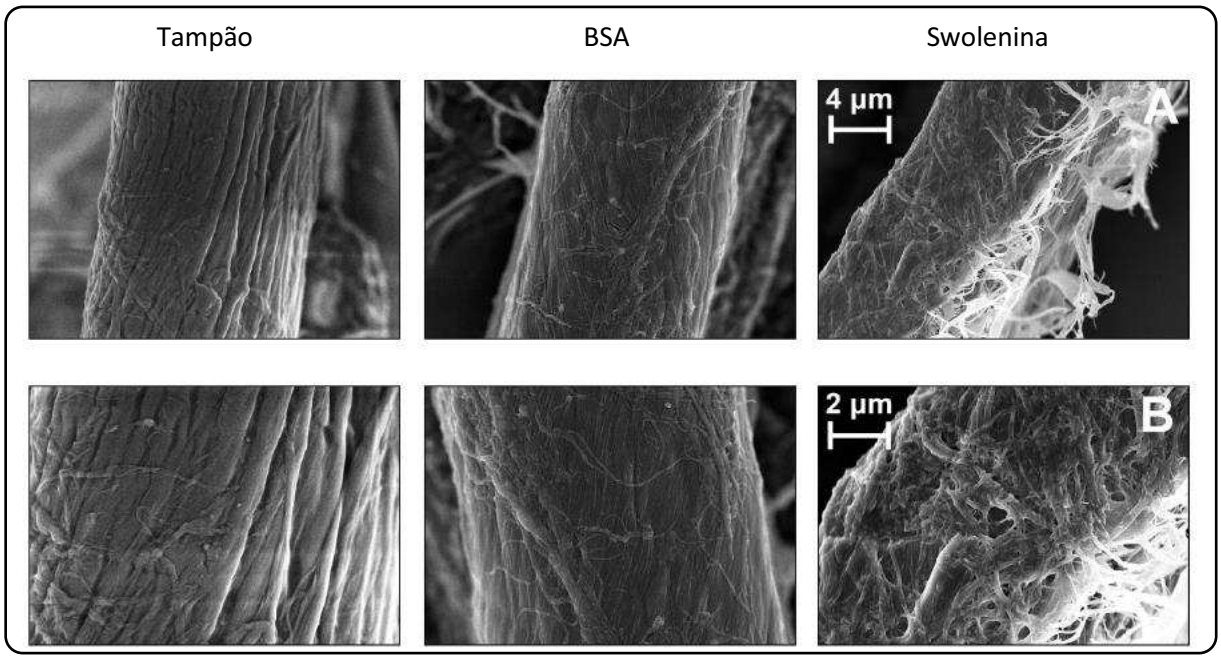


Figura 3.17. Microscopia eletrônica de varredura de papel de filtro após pré-tratamento com swolenina. Fonte: Jäger et al. (2011).

Gourlay et al. (2012) quantificaram mudanças na acessibilidade da celulose e morfologia da superfície de fibras de algodão maceradas tratadas com swolenina, examinando o grau de adsorção de CBMs específicos às fibras tratadas. Após incubação com swolenina, a ligação de CBMs cristalino e amorfo-específicos nas fibras de algodão maceradas aumentou. Os autores avaliaram dois tipos de CBM. O aumento na ligação foi mais pronunciado para o CBM2a que para o CBM44 após o tratamento com swolenina, sinalizando que o aumento da acessibilidade não era simplesmente devido à descristalização da celulose mediada pela swolenina na superfície das microfibrilas. Isto sugeriu que swolenina possa atuar promovendo a delaminação ou fibrilação do substrato, ou promovendo a "divisão" de microfibrilas, expondo novas regiões cristalinas de celulose aos CBMs. Micrografias de fibras de algodão maceradas tratadas com swolenina mostraram que os tratamentos com swolenina resultaram numa suavização das manchas rugosas produzidas durante a maceração (Figura 3.18). Este efeito de suavização foi oposto nas fibras de algodão maceradas tratadas com tampão e BSA, que mantiveram a sua superfície rugosa. Depois do tratamento com swolenina, as manchas rugosas na superfície das fibras pareceram ter sido removidas, revelando a superfície lisa, bem ordenada da fibra de algodão subjacente. Embora não era evidente através de qual mecanismo específico swolenina gera o efeito de "suavização" da fibra de celulose, é possível que swolenina atue de um modo semelhante à família de proteínas de expansinas, que mostraram enfraquecer paredes das células vegetais através do rompimento da rede de ligação de hidrogênio entre os polímeros da parede celular das plantas.

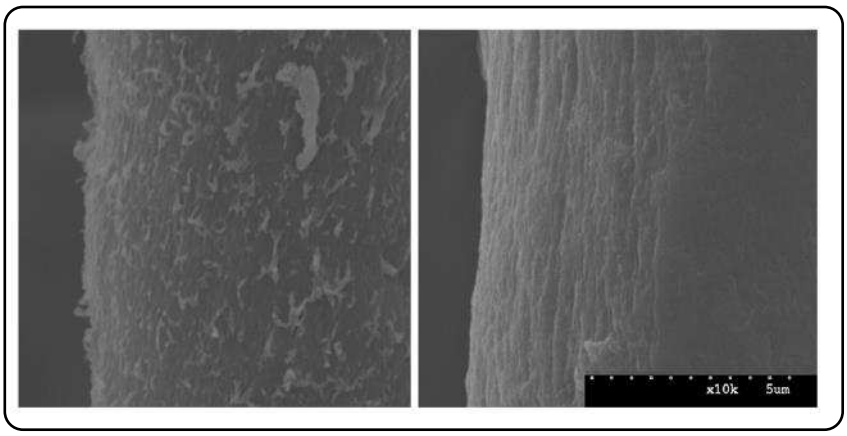


Figura 3.18. Microscopia eletrônica de varredura do efeito da swolenina em fibra de algodão macerada. A superfície da fibra de algodão (à esquerda) aparece enrugada devido ao tratamento de maceração. As rugas na superfície da fibra de algodão macerada parecem terem sido suavizadas pela ação das swoleninas (à direita).

3.7 Métodos para a produção de celulases

As celulases são produzidas essencialmente por fermentação. Distinguem-se dois tipos: fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS), que diferem em relação às condições ambientais e formas de condução (Tabela 3.4). Certamente, o teor de água no meio reacional é o fator que torna distintos estes processos. Em um bioprocesso, a água possui importantes funções, como a difusão de nutrientes no meio reacional, facilitando a absorção por agentes microbianos e a remoção de metabólitos; mantém a estabilidade de proteínas, nucleotídeos, carboidratos e estrutura lamelar, assim como conserva a permeabilidade da membrana plasmática. Tratando-se de fungos filamentosos, a limitação de água pode ocasionar a desnaturação de enzimas-chave no metabolismo celular, e influênciar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, além de diminuir a taxa de crescimento microbiano e tornar mais longo o período de aclimatação das células (GERVAIS & MOLIN, 2003).

Na fermentação no estado sólido (FES) há ausência ou quase ausência de água livre (PANDEY, 2003). A água forma um complexo com a matriz sólida de

substrato ou uma fina camada adsorvida na superfície das partículas. A FES deve possuir umidade suficiente para fornecer suporte ao crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do microrganismo (HÖLKER & LENZ, 2005). Já a fermentação submersa (FS) é caracterizada essencialmente pelo alto teor de água que facilita a distribuição de nutrientes e homogeneidade do sistema. Apesar de ter maior risco de contaminação, a FS evita limitações no teor de água quando o objetivo é formar produtos em maior escala, como em biorreatores. Neste tipo de fermentação a água constitui cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado (MITCHELL, 2000; PEREIRA Jr. et al. 2008b).

Uma característica que muito difere nos dois processos é a troca gasosa. Geralmente aplica-se a aeração forçada em FES agindo nos espaços interpartículas. Contudo, neste tipo de aeração podem ocorrer caminhos preferenciais, dificultando a dispersão homogênea de O_2, CO_2 e calor no meio. Na FS a aeração tende a ser facilitada pelo uso de agitação, mas também aeração forçada é aplicada (GIBBS et al., 2000; PEREIRA Jr. et al. 2008b).

Ambos os processos (FES e FS) podem ser afetados pela agitação. Quando submetida à agitação, a FES apresenta melhorias na dispersão de O_2, CO_2, calor e umidade. Mas antagonicamente, pode romper hifas de fungos filamentosos, reduzindo a produção. A FS adequa-se bem à agitação em temos de homogeneidade do sistema, porém, em escala maior pode formar aglomerados de micélio fúngico aderidas à parede do biorreator (MITCHELL, 2000; HÖLKER & LENZ, 2005).

O controle do pH na FS é feito diretamente pela adição de ácido ou base ao meio fermentativo. Para amenizar a variação de pH na FES são utilizados substratos de proveitosa capacidade tamponante ou acrescenta-se soluções tampão na etapa de umidificação do substrato (GIBBS et al., 2000).

Tabela 3.4. Diferenças entre fermentação submersa e fermentação no estado sólido.

Fator	Fermentação submersa	Fermentação em estado sólido
Água	Grandes volumes utilizados e descartados	Baixo consumo, pouco descarte
Nutrientes	Distribuição homogênea	Distribuição heterogênea
Produtos	Diluídos no meio	Concentrados no meio
Meios de cultivo	Solúveis em água, quimicamente definidos	Matrizes insolúveis, meios complexos
Aeração	São requeridos grandes volumes de ar, devido à baixa solubilidade do O_2 em água	Dificuldade de dispersão homogênea de O_2, CO_2 e calor no meio
Agitação mecânica	Homogeneidade do meio	Condições estáticas (de acordo com o reator)
Contaminação	Grande risco, geralmente por bactérias	Baixo risco, geralmente por fungos
Crescimento dos microrganismos	Crescem uniformemente distribuídos no meio	Crescem aderidos ao meio sólido
Calor metabólico	Fácil controle da temperatura, pela homogeneidade do meio	Baixa capacidade de transferência de calor do meio

Fonte: Adaptado de MITCHELL, 2000 e PEREIRA Jr. et al. 2008b.

3.8 Metabolismo da produção de celulases: Regulação e indução

As celulases constituem um sistema enzimático que pode ser induzido por diferentes sacarídeos. A celulose é considerada a melhor fonte de carbono para a produção de celulases por diversos microrganismos (LYND et al., 2002). Celobiose, lactose, soforose e gentiobiose também são conhecidas por facilitar a produção do sistema celulásico por alguns microrganismos. Suto e Tomita (2001) mostraram que a soforose teve poder de indução de 2500 vezes maior que a celobiose em *T. reesei* e que a gentiobiose induziu 50 vezes mais a produção de celulases em *Penicillium purpurogenum* que a celobiose. No caso

da indução por celulose, alguns estudos evidenciaram que ocorre a partir de baixos níveis de celulases produzidas constitutivamente pelo microrganismo, que primeiro hidrolisam a celulose a açúcares solúveis. Esses açúcares são convertidos em verdadeiros indutores, que entram na célula e, direta ou indiretamente, influênciam o DNA a promover a expressão dos genes de celulases (SALOHEIMO et al. 2004).

A síntese de celulases é regulada pelo processo de transcrição, então, quanto maior a concentração de indutor no meio, mais elevada é a síntese de DNA polimerases que se ligam e transcrevem os trechos de DNA referentes às celulases. Certamente que acima da concentração limite de substrato ocorre uma pausa no efeito dos indutores. Em alguns casos, como quando há excesso de celobiose, este glicídio pode inibir a síntese de celulases (LYND et al., 2002).

A via de excreção das celulases tem sido amplamente estudada (CONESSA et al., 2001; SALOHEIMO et al. 2004). A excreção dessas proteínas se inicia com a transcrição no núcleo da célula, quando então o mRNA se desloca para o citoplasma transferindo informações. Em seguida, as proteínas são sintetizadas no ribossomo. Contudo, os aminoácidos encontram-se ligados somente por ligações peptídicas. As celulases são posteriormente levadas ao retículo endoplasmático rugoso onde são realizadas modificações pós-traducionais. Tais modificações incluem o ajuste da proteína à sua estrutura tridimensional nativa (enovelamento); glicosilação; formação de ligações dissulfeto; fosforilação; clivagens proteolíticas específicas; e montagem das subunidades. O enovelamento no retículo endoplasmático está diretamente relacionado ao rendimento de proteínas secretadas. O mecanismo *unfolded protein response* (UPR) identifica a presença de estrutura proteica linear no retículo endoplasmático e induz a síntese de enzimas responsáveis pelo

enovelamento, chamadas foldases. Chaperones do retículo endoplamático e as foldases auxiliam na secreção dessas proteínas. A glicosilação constitui uma etapa pós-traducional de grande importância porque aumenta a estabilidade das celulases e a resistência sobre ataques proteolíticos. Entretanto, uma desvantagem do processo de glicosilação de proteínas é a redução de sua mobilidade, podendo influênciar sua atuação catalítica. As proteínas então são enviadas para o complexo de Golgi onde algumas destas etapas podem se repetir (LODISH et al., 2004).

Finalmente, após a passagem pelo complexo de Golgi, as proteínas são direcionadas para a membrana plasmática, por onde são secretadas para o exterior da célula por exocitose (KRUSZEWSKA et al., 1999; LODISH et al., 2004).

3.9 Microrganismos produtores de celulases

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma grande variedade de bactérias, fungos filamentosos e algumas leveduras. Entretanto, poucos microrganimos produzem altos níveis de celulases extracelulares capazes de solubilizar eficientemente a celulose (LYND et al., 2002). A maioria das celulases comerciais é produzida pelos fungos filamentosos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*.

Na tabela 3.5 estão apresentados alguns exemplos de publicações sobre produção de celulases, onde são detalhados os microrganismos utilizados, fontes celulósicas, condições experimentais, tempo de processo e máximas atividades celulásicas obtidas.

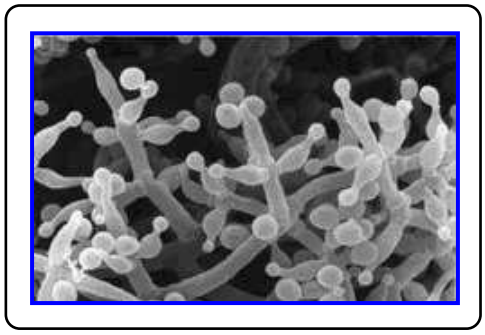
Nota-se que os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são reconhecidos bons produtores de celulases. Na maioria dos estudos utilizam-se

os microrganismos individualmente, mas alguns trabalhos propõe a produção de enzimas através de cultivo misto. Geralmente temperaturas em torno de 30°C e pH entre 4 e 6 são utilizados. Diversos substratos têm sido estudados para a a produção de celulases, tanto celulose comercial quanto materiais lignocelulósicos *in natura* ou pré-tratados. Alguns exemplos de celulose comercial mais utilizados são Avicel e carboximetilcelulose (CMC). Quanto à biomassa lignocelulósica, alguns dos materiais mais utilizados são bagaço de cana, sabugo de milho, farelo de trigo, dentre outros. Em alguns casos, o tempo de processo pode estender-se até 10 dias. Contudo, em condições otimizadas, o tempo pode ser reduzido e elevadas atividades enzimáticas podem ser alcançadas (ROCHA, 2010; MAEDA et al., 2013).

3.10 Classificação taxonômica de *Trichoderma harzianum*

O fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*, utilizado neste estudo, pertence a seguinte classificação taxonômica:

Reino: Fungi
Divisão: Ascomycota
Subdivisão: Pezizomycotina
Classe: Sordariomycetes
Ordem: Hypocreales
Família: Hypocreaceae
Gênero: *Trichoderma*
Espécie: *Trichoderma harzianum*



Sinônimo: *Hypocrea lixii*

Tabela 3.5. Exemplos de publicações sobre produção de celulases.

Microrganismo	Fonte celulósica	Condições de cultivo: forma de operação; temperatura (°C); pH	Máximas atividades	Tempo de processo	Referência
Trichoderma reesei Rut C30	Salgueiro pré-tratado a vapor[1]	FS; 30; 5,5-6,0	1390 FPU/L; 1450 BG U /L	4 dias	Bollók e Réczey (2000)
Trichoderma reesei Rut C30	Fibra de milho pré-tratada[1]	FS; 28; 4,8	350 FPU/L; 9350 U EG/L; 730 U BG/L	8 dias	Li et al. (2005)
Trichoderma harzianum	Avicel[2]	FS; 30°C; 5,0	1.052 FPU/L; 18.496 U EG/L; 400 U BG/L	84 h	Rocha (2010)
Penicillium funiculosum	Celulignina parcialmente deslignificada	FS; 30°C; 5,0	250 FPU/L; 1800 U EG/L; 800 U BG/L	120 h	Castro (2006)
Penicillium funiculosum	Avicel[2]	FS; 30°C; 5,0	508 FPU/L; 9.204 U EG/L; 2.395 U BG/L	120 h	Carvalho (2007)
Trichoderma reesei Rut C30	Solka Floc[2]	FS; 30; 5,0	1300 FPU/L	50 horas	Jhuász et al. (2004)
Penicillium brasilianum IBT 20888	Solka Floc[2]	FS; 30; 5,0	750 FPU/L	229 horas	JØrgensen et al. (2005)
Trichoderma reesei Rut C30	Solka Floc[1]	FS; 28; 5,8	1200 FPU/L; 1350 U BG/L	6 dias; 7 dias	Juhász et al. (2005)
Trichoderma reesei Rut C30	Carvalho pré-tratado a vapor[2]	FS; 30; 5,0	4250 FPU/L; 45000 U EG/L; 140U BG/L	9 dias	Shin et al., 2000
Aspergillus niger ATCC 6275	Torta de palmeira[1]	FES; 35; 6,1	26,8 U/g	12 dias	Prasertsan et al. (1997)
Aspergillus terreus	Bagaço de cana[1]	FS; 35; 4,0	110 FPU/L; 1200 U EG/L	7 dias; 7 dias	El-Nawwi e El-Kader (1996)

[1] Experimentos conduzidos em frascos cônicos; [2] Experimentos conduzidos em biorreator. FS: fermentação submersa; FES: fermentação no estado sólido.

Tabela 3.5. Exemplos de publicações sobre produção de celulases (continuação).

Microrganismo	Fonte celulósica	Condições de cultivo: forma de operação; temperatura (°C); pH	Máximas atividades	Tempo de processo	Referência
Penicillium pinophilum IBT 4186	Solka Floc[2]	FS; 30; 5,0	280 FPU/L	221 horas	JØrgensen et al. (2005)
Penicillium persicinum IBT 13226	Solka Floc[2]	FS; 25; 5,0	800 FPU/L	236 horas	JØrgensen et al. (2005)
Thermoascus aurantiacus IMI 216529	Palha de Trigo[2]	FES; 49; 4,0	5,5 FPU/g; 79 U BG/g; 1709 U EG/g; 4 U CBH/g	–	Kalogeris et al. (2003)
Trichoderma reesei ZU-02	Sabugo de milho[2]	FS; 30; 4,8	5000 FPU/L; 240 U BG/L	4 dias	Liming e Xueliang (2004)
Trichoderma reesei ZU-02	Sabugo de milho e farelo de trigo[2]	FES; 30; 4,5	130 FPU/g	6 dias	Xia & Cen, 1999
Penicillium decumbens 1	Palha e farelo de trigo[2]	FES; 30; NR	15,2 FPU/g; 50,6 U BG/g	4 dias; 4 dias	Mo et al. (2004)
Trichoderma reesei Rut C30	Solka Floc[2]	FS; 28; 4,8	4250 FPU/L	7 dias	Velkovska et al. (1997)
Chaetomium globosum	Cacho de palmeira[2]	FS; 30; 5,5	2500 FPU/L; 60000 U EG/L; 16000 U BG/L	96 horas; 120 horas; 192 horas	Umikalsom et al. (1998)
Trichoderma reesei QM 9414	Bagaço[2]	FS; 30; 4,8	85 FPU /L;	68 horas	Aiello et al. (1996)
Trichoderma reesei QM 9414	Avicel[2]	FS; 30; 4,8	163 FPU /L;	68 horas	Aiello et al. (1996)

[1] Experimentos conduzidos em frascos cônicos; [2] Experimentos conduzidos em biorreator. FS: fermentação submersa; FES: fermentação no estado sólido.

Tabela 3.5. Exemplos de publicações sobre produção de celulases (continuação).

Microrganismo	Fonte celulósica	Condições de cultivo: forma de operação; temperatura (°C); pH	Máximas atividades	Tempo de processo	Referência
Cultura mista de *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Aspergillus terreus* SUK-1	Bagaço de cana[1]	FES; 30; 5,5	600 FPU/L; 40 U BG/L	7 dias; 6 dias	Massadeh et al. (2001)
Cultura mista *Trichoderma reesei* LM-UC4 e *Aspergillus phoenicis* QM 329	Bagaço de cana[1]	FES; 30; NR	14 FPU/g; 80 U EG/g; 17 U BG/g	120 horas	Gutierrez-Correa e Tengerdy (1999)
Cultura mista de *Trichoderma reesei* Rut C30 e *Aspergillus Phoenicis* QM 329	Esterco[1]	FS; 27; 5,5	1540 FPU/L; 640 U BG/L	10 dias; 9 dias	Wen et al. (2005)
Cultura mista de *B. pumilus* selvagem e mutante CRI 6	CMC[1] Celobiose[1]	FS; 37; 6,0	2250 U EG/L 1660 UI BG/L	24 horas 24 horas	Kotchoni et al. (2003)

[1] Experimentos conduzidos em frascos cônicos; [2] Experimentos conduzidos em biorreator. FS: fermentação submersa; FES: fermentação no estado sólido.

3.11 Produção de celulases por *Trichoderma harzianum*

Celulases produzidas por *Trichoderma harzianum* constituem um eficiente sistema enzimático para a hidrólise completa dos substratos celulósicos em seu açúcar monomérico fermentável, a glicose (AHMED et al., 2009).

Estudos iniciais da produção de celulases por *Trichoderma harzianum* registrados na literatura científica datam da década de 80. ROUSSOS & RAIMBAULT (1982), por exemplo, avaliaram a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* por fermentação em meio líquido contendo celulose microcristalina (celulose Avicel). Este substrato induziu a produção de celulases, gerando as seguintes atividades após 50 horas: 3.000 U/L de atividade CMCásica e 400 U/L de FPásica. Estes mesmos autores, em outro estudo (ROUSSOS & RAIMBAULT, 1982b), fizeram o rastreio de estirpes celulolíticas a partir de 30 linhagens de fungos celulolíticos, com o objetivo de produzir celulases por fermentação submersa de substratos lignocelulósicos. Dentre todas as linhagens avaliadas, foi selecionado o fungo filamentoso *T. harzianum*, pois exibiu maiores atividades celulásicas nas condições dos experimentos. A atividade CMCásica máxima foi de 1.310 U/L e FPásica de 80 U/L. Anos depois, ROUSSOS et al. (1991) avaliaram os níveis de produção de celulases por *T. harzianum* em uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo sob fermentação no estado sólido. A combinação de esterilização e de tratamento prévio do substrato gerou um completo controle da contaminação durante todo o processo de fermentação, e um aumento na produção de enzimas celulolíticas. A cultura produziu 204,4 U/g e 16,1 U/g de substrato (em

matéria seca) de atividade CMCásica e FPásica, respectivamente, sob condições padronizadas.

O potencial de produção de celulases por *Trichoderma harzianum* 39.1, *T. harzianum* 1051 e *Trichoderma* sp. TVC em fermentação submersa foi analisado por DE MARCO et al. (2003). O cultivo foi realizado em pH ajustado a 5,5 e temperatura de 28°C. As maiores atividades foram encontradas nos tempos de 72 a 120 horas de crescimento. Os níveis mais elevados de FPases e CMCases foram encontrados na cepa *T. harzianum* 1051. Igualmente, a mais alta atividade β-glucosidásica foi produzida por *T. harzianum* 1051 (2.800 U/L). Os valores máximos de β-glucosidase em *T. harzianum* 39.1 e *Trichoderma* sp. TVC foram, respectivamente, 1.270 U/L e 380 U/L.

IKRAM-UL-HAQ et al. (2006) investigaram a síntese de celulases por *Trichoderma harzianum* para a exploração de subprodutos agrícolas através de fermentação em estado sólido. Vinte diferentes cepas de *T. harzianum* foram isoladas, e de todas as cepas avaliadas, a codificada por KM07 teve a máxima produção de celulases. Diferentes subprodutos agrícolas tais como farelo de trigo, palha de trigo, farelo de arroz, casca de arroz e farelo de soja foram testados, havendo maior produção enzimática em farelo de trigo. A produção celulásica foi significativamente aumentada quando ao farelo de trigo foi adicionada uma solução de CMC com sais minerais (proporção 1:1). As melhores condições de cultivo foram temperatura 28°C e pH 6,5.

KOCHER et al. (2008) otimizaram a produção de celulases por fermentação submersa por *Trichoderma harzianum* MTCC 8230 em palha de arroz. A produção destas enzimas usando palha de arroz foi mais eficiente que em carboximetilcelulose (CMC). As condições ótimas para a produção de celulases foram 0,5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ como fonte de nitrogênio, pH 5,0,

temperatura de 28 °C e inóculo de 10^8 esporos/mL. O acréscimo de *Tween* 80 (0,1%) melhorou a produção global de celulases sob estas condições otimizadas.

DELABONA et al. (2012) avaliaram a produção de celulases e xilanases utilizando uma cepa de *Trichoderma harzianum*, isolada da floresta amazônica e cultivada sob diferentes condições. A influência da fonte de carbono foi investigada utilizando culturas em frascos agitados. Fontes de carbono selecionadas foram, em seguida, estudadas sob diferentes condições de pH, utilizando um biorreator de tanque agitado. Atividades enzimáticas até 121 U/g, 8000 U/g, e 1730 U/g de bagaço deslignificado + sacarose foram alcançados para celulase (FPase), xilanase e β-glucosidase, respectivamente. Este complexo enzimático foi utilizado para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. A avaliação comparativa, utilizando um extrato enzimático de *Trichoderma reesei* RUTC30, indicou desempenho similar do complexo enzimático de *T. harzianum*, sendo um candidato potencial para a produção dessas enzimas.

AHMED et al. (2009) avaliaram a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* em meio de Vogel's com diferentes fontes de carbono, como glicose 1%, carboximetilcelulose (CMC), sabugo de milho, madeira de bétula e farelo de trigo. Foram determinados os valores ótimos de temperatura, pH e tempo de incubação para a produção de celulases. A temperatura ótima foi de 28°C, e o melhor valor de pH foi de 5,5. Verificou-se que o aumento da temperatura resultou em diminuição na produção enzimática. O tempo ótimo para produção destas enzimas foi de 120 h de incubação. Após este período ocorreu a diminuição das atividades celulásicas. Neste estudo, observou-se que CMC agiu como indutor da produção de celulases quando utilizada como fonte de

carbono, gerando altas atividades enzimáticas. Já quando a glicose foi usada como fonte de carbono, ocorreu repressão catabólica, havendo baixa atividade das celulases. Por exemplo, dentre todas as fontes de carbono testadas, a atividade CMCásica mínima foi de 20 U/L em glicose e máxima de 790 U/L em CMC. O valor mais reduzido de atividade β-glucosidásica foi de 50 U/L em glicose, e já em CMC foi encontrada a mais alta atividade BG, 920 U/L.

ROCHA (2010) verificou que as atividades das celulases de *T. harzianum* IOC 3844 utilizando celulose microcristalina como fonte de carbono nas condições do meio de Mandels & Weber (1969) foram em média: 138,0 U/L (FPase), 5.230,6 U/L (CMCase) e 201,3 U/L (β-glucosidase) em 72 horas de cultivo. Em condições otimizadas durante a produção em biorreator as atividades chegaram a 1.052 U/L (FPásica), 18.496 U/L (CMCásica) e 400 U/L (β-glucosidásica) em 84 horas.

CASTRO et al. (2010) avaliaram a produção de celulases por *T. harzianum* a partir de celulignina parcialmente deslignificada de açúcar. As atividades máximas das celulases produzidas foram: FPase 165,23 U/L (31 h), CMCase 6.365,52 U/L (72 h) e β-glucosidase 633,08 U/L (98 h) em cultivo em meio de Mandels e Weber (1969) modificado. Este trabalho mostrou um destaque na produção de endoglucanases por *T. harzianum*.

3.12 Breve sumário sobre hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Na maioria dos estudos de hidrólise enzimática utiliza-se concentrações de substrato de aproximadamente 20 g/L. Quanto ao tempo de hidrólise, a maioria dos trabalhos emprega 24 horas, em alguns casos podendo chegar a 48 ou 72 horas. Algumas das biomassas mais comumente hidrolisadas são: bagaço de cana, sabugo de milho e polpa de papel, como mostra a tabela 3.6.

Tabela 3.6. Eficiência de hidrólise enzimática em diferentes estudos.

Enzima	Substrato	Celulose (g/L)	Tempo de hidrólise (h)	Carga enzimática (FPU/g)	Eficiência de hidrólise (%)	Referência
Celuclast 1.5	Polpa de papel branqueado	20	24	10	32	Martins *et al.*, 2008
Celuclast + Novozym 188	Polpa de papel branqueado	20	24	10	46	Martins *et al.*, 2008
T. reesei Rut C30	Sabugo de milho pré-tratado	20	24	15	59	Juhász *et al.*, 2005
T. reesei Rut C30	Solka floc (celulose cristalina)	20	24	15	31	Juhász *et al.*, 2005
T. reesei Rut C30	Abeto	20	24	15	23	Juhász *et al.*, 2005
Celuclast	Sabugo de milho pré-tratado	20	24	15	41	Juhász *et al.*, 2005
Celuclast	Abeto	22	24	25	14	Jorgensen *et al.*, 2005
Celuclast + Novozym 188	Abeto	22	24	25	59	Jorgensen *et al.*, 2005
Celuclast + Novozym 188	Sabugo de milho pré-tratado	20	72	15	82	Yang & Wyman, 2006
T. reesei + *A. niger*	Bagaço de cana pré-tratado	20	24	80 (+ 10 BG/g)	4	Sukumaran *et al.*, 2009
T. reesei + *A. niger*	Bagaço de cana pré-trat.	20	48	50 (+ 5 BG/g)	18	Sukumaran *et al.*, 2009
Multifect®	Bagaço de cana pré-trat.	40	24	25	50	Rocha, 2010
T. harzianum	Bagaço de cana pré-trat.	40	24	25	50	Rocha, 2010

3.13 Processos de produção de etanol de segunda geração

A produção de etanol celulósico pode ser realizada através de quatro processos: hidrólise separada da fermentação (HSF); sacarificação simultânea à fermentação (SSF); sacarificação simultânea à cofermentação (SSCF); e bioprocesso consolidado (BPC), como mostra a figura 3.19.

No processo de **hidrólise separada da fermentação (HSF),** o material lignocelulósico pré-tratado é hidrolisado a glicose e fermentado separadamente. A vantagem deste processo está na possibilidade de ambas as etapas, de hidrólise e de fermentação, serem conduzidas em suas condições ótimas. As celulases comumente apresentam melhor atividade catalítica em temperaturas acima de 50°C, enquanto que a temperatura ideal para a etapa fermentativa é de 30 a 37°C. Outra característica proveitosa é o fato de, como não há matéria-prima em suspensão durante a fermentação, as células podem ser recicladas no sistema (TAHERZADEH & KARIMI, 2007). A HSF apresenta como desvantagens: possibilidade de inibição das enzimas pelos produtos, como celobiose e glicose; maior risco de contaminação, devido ao prolongamento do tempo de processo, relacionado à separação das etapas de hidrólise e fermentação (CASTRO & PEREIRA Jr., 2010).

A idéia de realizar a hidrólise e fermentação simultâneas foi proposta por GAUSS et al. (1976) em uma patente. Os autores afirmavam que o rendimento de glicose em hidrólise enzimática separado era baixo, possivelmente devido à inibição pelos produtos glicose e celobiose. No entanto, mostraram que foi possível obter altos rendimentos de etanol quando se fazia uso do processo de **sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)**, e atribuíram esse bom rendimento à remoção de glicose e celobiose no processo fermentativo

associado. O processo SSF contribui com menor complexidade da instalação industrial e menor custo de investimento, visto que nele são agrupadas duas etapas em um mesmo vaso reacional. Nessa forma de operação (SSF), a glicose liberada é imediatamente consumida e fermentada a etanol, minimizando a inibição das celulases. A manutenção de uma baixa concentração de glicose no meio também favorece o equilíbrio das demais reações de hidrólise, no sentido de formação de mais produto, além de reduzir riscos de contaminação no sistema devido à presença de etanol no meio, bem como a redução do tempo de processo e do número de reatores (TAHERZADEH & KARIMI, 2007; PEREIRA Jr. et al., 2008). Neste processo, contudo, as enzimas não atuam em condições ótimas, o que torna a hidrólise enzimática mais lenta.

No processo de **sacarificação simultânea à co-fermentação (SSCF)**, a sacarificação da celulose e hemicelulose, assim como as fermentações das hexoses, oriundas da fração celulósica e das pentoses, provenientes da fração hemicelulósica, ocorrem simultaneamente. Esta tecnologia tem como objetivo fermentar as hexoses e pentoses por um único microrganismo, com auxílio da biologia molecular, e tem como vantagem a utilização de apenas um reator para a fermentação de ambos os açúcares (TAHERZADEH & KARIMI, 2007).

Por fim, na forma mais integrada de condução das etapas de conversão, nomeada **bioprocesso consolidado (BPC)**, a produção enzimática, hidrólise da celulose e hemicelulose e a fermentação da glicose e xilose, acontecem em um mesmo equipamento, utilizando o mesmo microrganismo (PEREIRA Jr. et al., 2008). Esta tecnologia é atraente no que diz respeito ao número de biorreatores, devido à simplificação das operações e a redução dos custos. As desvantagens são: baixos rendimentos de produção causados pela formação de co-produtos; e baixa tolerância dos microrganismos ao etanol (BALAT, 2011).

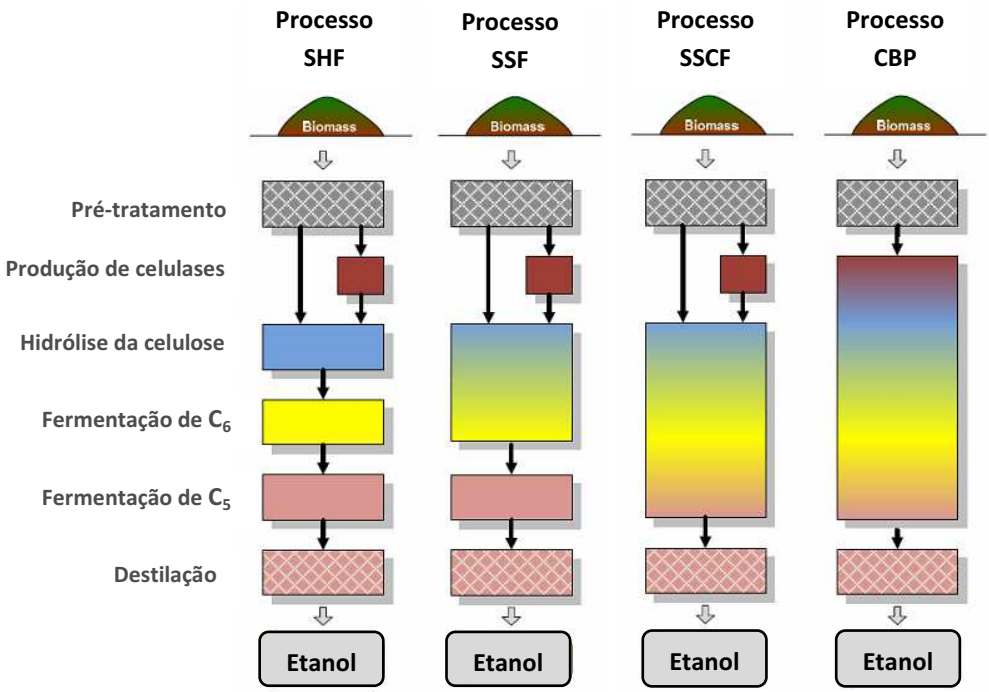


Figura 3.19. Representação esquemática dos processos de produção de etanol de segunda geração. Fonte: adaptado de Pereira Jr. et al. (2008).

3.14 Panorama sobre fatores sócio-econômicos relacionados à produção de etanol e celulases

3.14.1 Matriz energética do Brasil e participação de combustíveis renováveis

Segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE) do Ministério de Minas e Energia, as principais fontes energéticas do Brasil são: petróleo, gás natural, energia elétrica, carvão mineral, energia eólica, biodiesel e produtos da cana (EPE, 2013). Os dados do Relatório Final do Balanço Energético Nacional têm mostrado que, ao longo das útimas décadas, a produção de energia primária no Brasil tem aumentado consideravelmente. Em 1970 a produção total de energia primária no Brasil era de 50.000.000 toneladas equivalentes de

petróleo (tep), ao passo que em 2013 esta produção atingiu um patamar de 250.000.000 tep, o que representa um aumento de 5 vezes ao longo de 4 décadas. O estudo mostra que, dentre as fontes não renováveis há um destaque para a produção de petróleo, enquanto dentre as fontes renováveis, observa-se uma significativa participação da produção de cana-de-açúcar (Figura 3.20).

A matriz energética no Brasil é caracterizada pela manutenção dos derivados de petróleo no setor de transportes, como resultado da necessidade de rápida expansão da estrutura de oferta para atender ao elevado crescimento da demanda verificado nas últimas décadas. Vale ressaltar, no entanto, a forte penetração do álcool e do biodiesel, e da própria penetração dos carros híbridos (MME, 2007).

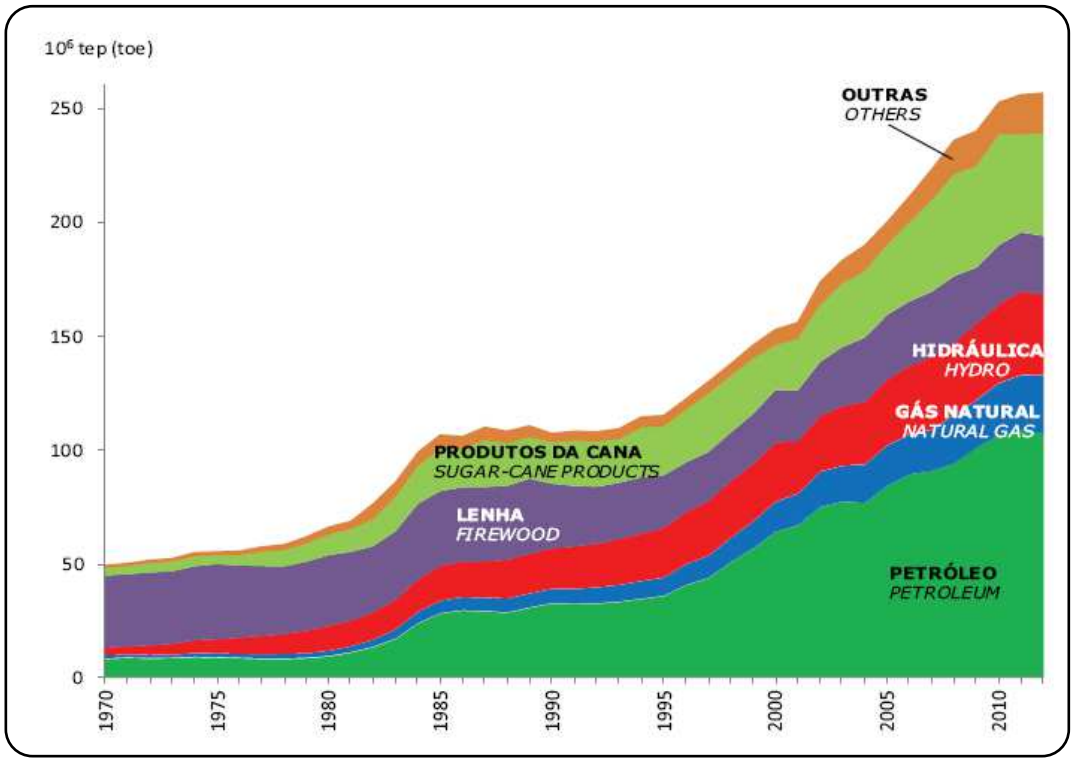


Figura 3.20. Produção de Energia Primária no Brasil entre os anos de 1970 e 2012. Fonte: EPE (2013). *tep: toneladas equivalentes de petróleo.

O Brasil é considerado uma referência mundial na questão da biomassa, graças ao sucesso do programa Proálcool lançado na década de 70 para diminuir a dependência externa do petróleo. Atualmente, o país é o maior produtor mundial de cana de açúcar, o que se deve às condições propícias de solo e clima. A expansão da participação dos biocombustíveis na matriz energética brasileira é favorecida pelo aproveitamento das vantagens competitivas naturais do agronegócio brasileiro. Em 2005, a participação dos biocombustíveis no consumo do setor de transportes foi de 13%. Em 2030, estima-se que essa participação atingirá 24% do consumo total, revelando um aumento expressivo da sua importância para o setor (MME, 2007).

O etanol brasileiro ostenta uma enorme capacidade de aumentar sua produção nacional, à medida que a fonte deste combustível passa a ser não somente do caldo de cana, mas também do bagaço – o etanol de segunda geração ou "etanol celulósico". O bagaço de cana é o mais abundante resíduo agrícola gerado no Brasil (aproximadamente 159 milhões de toneladas por ano em 2012) e é uma biomassa rica em polissacarídeos hidrolisáveis, gerada nas unidades industriais (UNICA, 2012). Estima-se que com a implementação deste processo de aproveitamento do bagaço, a produção de etanol no Brasil possa ser duplicada, sem que haja necessidade de ampliação das áreas de cultivo (BETANCUR & PEREIRA Jr., 2010). A utilização de materiais lignocelulósicos, principalmente sob a forma de resíduo para produção de combustível, enzimas e outros bioprodutos permite a redução dos custos do processo produtivo, a agregação de valor econômico a estes materiais, além de mitigar os impactos ambientais (PEREIRA Jr. et al., 2008).

Os biocombustíveis podem ser um grande aliado da indústria do petróleo tendo em vista a duração limitada das reservas mundiais de hidrocarbonetos. O

uso dos biocombustíveis, necessariamente, implicará no desenvolvimento de tecnologias renováveis e de reutilização de materiais residuais. Sabe-se, também, a indústria do petróleo é impactada pelas flutuações no mercado internacional e pela demanda, assim como pela manipulação da produção de combustíveis fósseis pelos países produtores. Esses aspectos apresentados interligados criam uma complexa indústria petrolífera, o que confirma a importância da produção simultânea de biocombustíveis na matriz energética mundial.

Dentre os objetivos do milênio estabelecidos pela ONU, um deles relaciona-se diretamente com o uso energético da biomassa: assegurar o desenvolvimento sustentável (MME, 2007). Neste contexto, a bioenergia é uma das opções-chave, porque está diretamente relacionda à mitigação dos impactos gerados pelas emissões de gases de efeito estufa na atmosfera e na substituição dos combustíveis fósseis.

A oferta interna de energia (total de energia demandada no país) aumentou 11,3 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep) no ano de 2012, anotando uma taxa de crescimento de 4,1% e atingindo 283,6 Mtep. Essa expansão torna-se ainda mais significativa se considerada a evolução do PIB nacional no mesmo período, de apenas 0,9% segundo as estimativas do IBGE. Gás natural, petróleo e derivados responderam por 97% desta demanda.

A proporção de renováveis na matriz energética manteve-se em patamar muito elevado, de 46%, significativamente acima da média mundial, calculada em 13,2% pela Agência Internacional de Energia (EPE, 2013). Contudo, dentre as fontes renováveis, ainda há no Brasil pouco aproveitamento do bagaço de cana, que é o principal resíduo agroindustrial produzido no Brasil (11,2%) (Figura 3.21).

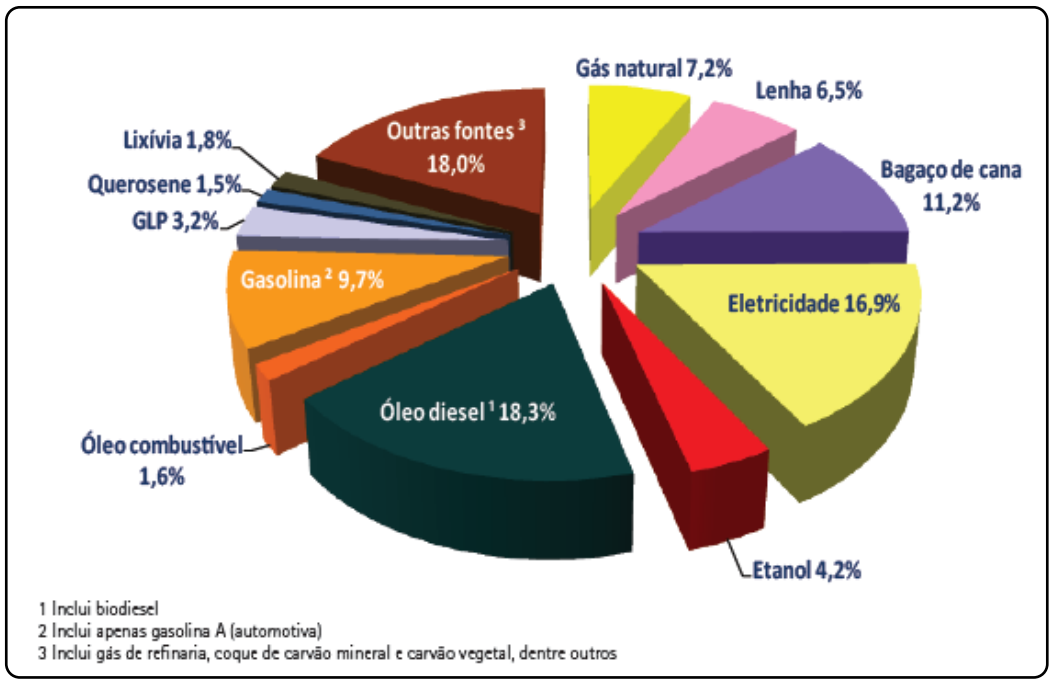


Figura 3.21. Consumo final de energia por fonte no Brasil no ano de 2012. Fonte: EPE (2013).

3.14.2 Produção de cana-de-açúcar e etanol no Brasil

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a produção de cana-de-açúcar deve chegar a 653,81 milhões de toneladas na safra 2013/2014, o que representa um aumento de 11% superior à produção obtida na temporada anterior (MAPA, 2013). O balanço estima o volume da safra 2013/14 de cana-de-açúcar nas Regiões Centro-Sul, Norte e Nordeste. Segundo o MAPA, o crescimento da produção e a expansão dos canaviais são resultados de programas de financiamento do Governo Federal e das influências climáticas. Houve aumento de 1,5% da área nacional de produção sucroalcooleira 2012/13, isto é, crescimento de 123 mil hectares em relação à safra anterior. A área total cultivada foi de 8.485 mil hectares, distribuídas em todos os estados produtores. A produtividade média brasileira ficou estimada

em 69,4 toneladas por hectares, 3,5% maior em relação à safra 2011/12, que foi de 67t/ha (MAPA, 2013).

A figura 3.22 mostra a evolução da produção da cana-de-açúcar no Brasil entre as safras de 1980/1981 e 2012/2013. Em 1980/1981 a produção de cana no Brasil era de 123,68 milhões de toneladas por ano. Esta produção tem crescido consideravelmente (cerca de 5 vezes de 1980 à 2013), atingindo uma produção máxima de 620,41 milhões de toneladas em 2010/2011, mantendo-se em 588,48 milhões de toneladas na safra de 2012/2013 (UNICADATA, 2013).

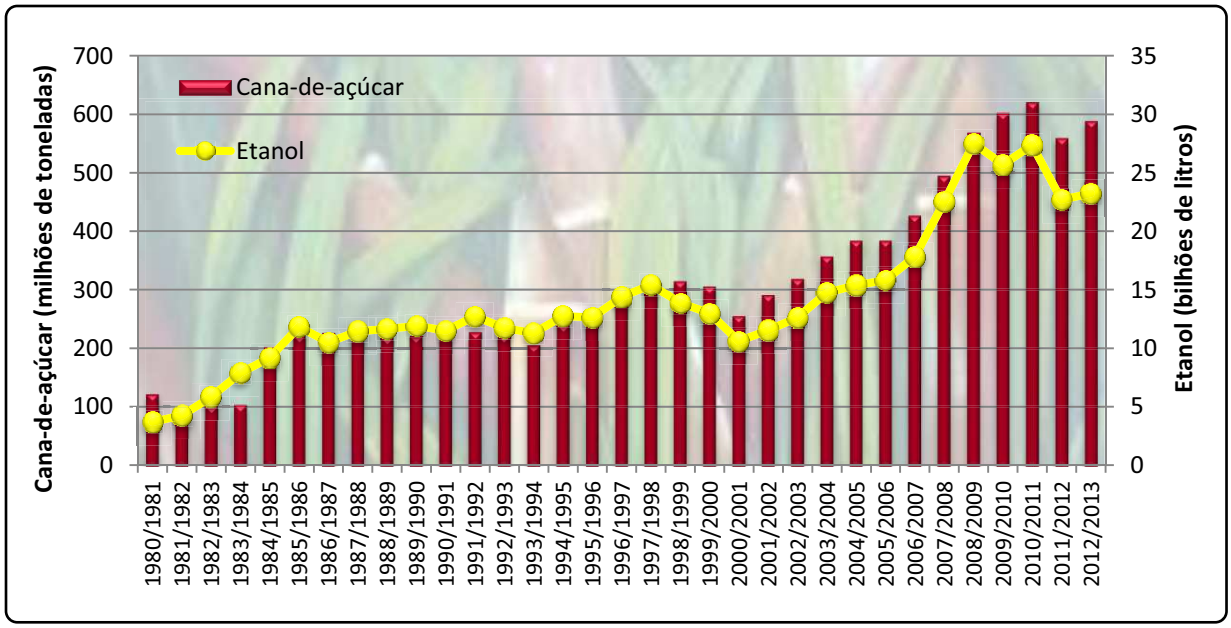


Figura 3.22. Produção de cana-de-açúcar e etanol no Brasil entre as safras de 1980/1981 e 2012/2013. Fonte: Adaptado de UNICADATA (2013).

Acompanhando o expressivo aumento da produção de cana-de-açúcar no Brasil, a produção de etanol tem mostrado relevante aumento nos útimos anos. Na safra de 1980/1981 foram produzidos no país 3,71 bilhões de litros, atingindo uma produção máxima em 2008/2009, em que a produção nacional

de etanol foi de 27,53 bilhões de litros (UNICADATA, 2013). Este avanço no setor produtivo alcooeiro representou um aumento de cerca de 7 vezes nas últimas 3 décadas. De 2011 à 2013 houve uma leve redução da produção nacional, como reflexo de políticas públicas e fatores econômicos nacionais e internacionais. Contudo, o Brasil ainda ostenta a posição de maior produtor de etanol de cana-de-açúcar do mundo, com uma produção de 23,23 bilhões de litros na safra de 2012/2013. Segundo o MAPA, a produção total de etanol no país deve chegar a 25,77 bilhões de litros na safra 2013/2014 (MAPA, 2013).

3.14.3 Produção de bagaço de cana-de-açúcar no Brasil

Estudos têm mostrado que o etanol celulósico ou de segunda geração é uma alternativa fundamental aos países capazes de produzir o combustível renovável. Do ponto de vista da oferta, as tecnologias de primeira geração deverão garantir um crescimento relativamente constante no mercado do etanol. No entanto, os produtores mundiais precisarão de tecnologias da geração seguinte para suprir a demanda mundial (ROMERO, 2008).

O Brasil é um país que reúne inúmeras vantagens comparativas que o tornam capaz de atuar como líder no mercado mundial de produtos agrícolas, agroindustriais e silviculturas, em particular aqueles dedicados à energia. O setor sucroalcooleiro e a produção de etanol são referências nacional e internacional de estruturação bem sucedida de uma cadeia produtiva agroindustrial integrada de alimentos e energia.

A produção de etanol no Brasil apresenta uma eficiência global bastante elevada, em torno de oito unidades energéticas para cada uma produzida, podendo alcançar valores ainda maiores se os resíduos agrícolas puderem ser

aproveitados para fins energéticos e um novo paradigma tecnológico for aplicado para o aproveitamento do conteúdo energético do bagaço de cana, através da produção do etanol celulósico ou etanol de segunda geração (BETANCUR & PEREIRA Jr., 2010; MME, 2007).

Estima-se que a massa de bagaço produzida esteja por volta de 27% da massa total da cana-de-açúcar (FIESP, 2006), constituindo uma vasta fonte de biomassa para uso no contexto de Biorrefinaria. No ano safra 2010/2011 a produção de bagaço de cana no Brasil chegou a 167,51 milhões de toneladas. Mais recentemente (2012/2013) esta produção foi de 158,89 milhões de toneladas. A figura 3.23 apresenta a quantidade de bagaço produzida por ano no Brasil nas útimas três décadas.

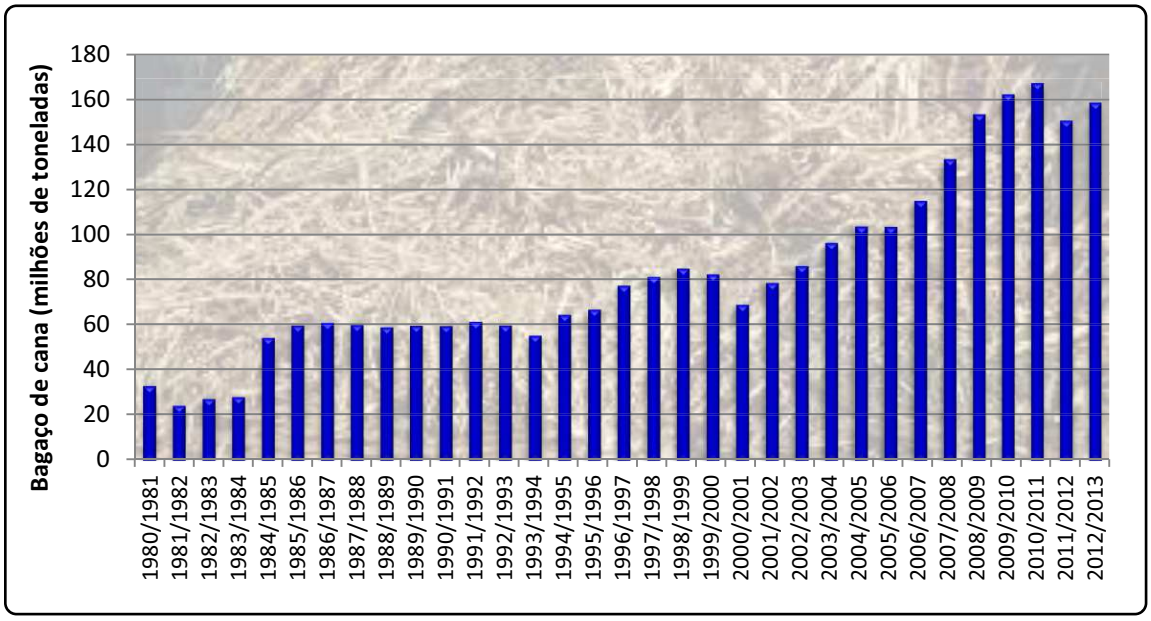


Figura 3.23. Produção de bagaço de cana-de-açúcar no Brasil entre as safras de 1980/1981 e 2012/2013. Fonte: Adaptado de UNICADATA (2013).

Devido à inexistência de opções mais atraentes, o bagaço da cana de açúcar durante muitos anos foi considerado um co-produto da indústria sucro-

alcooleira, sendo majoritariamente utilizado nas caldeiras das usinas para a produção de energia. Esta biomassa residual é composta majoritariamente de polissacarídeos, que após tratamento apropriado, gera unidades glicídicas, constituindo-se em uma importante fonte de energia renovável (VÁSQUEZ et al., 2007). A tendência atual é viabilizar condições técnicas e produzir inovações tecnológicas para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, gerando produtos de maior valor agregado, como energia, biocombustíveis e outros produtos químicos (PEREIRA Jr. et al., 2008).

3.14.4 Produção de etanol de segunda geração no Brasil

Conforme publicação mais recente da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA, 2013), a construção da usina pioneira de etanol celulósico em escala comercial do Brasil, com previsão de inauguração em 2014 em Alagoas, coloca o país entre líderes globais no uso da nova tecnologia. A UNICA aponta que esta construção representa um grande avanço para o Brasil porque o coloca entre os países que já tem planos concretos de utilização dessa tecnologia, e destaca que a usina, do grupo GranBio, terá capacidade de produção considerável. A usina já iniciará com uma produção equivalente a unidades de primeira geração, estimulando outras empresas a seguir caminhos similares, como é o caso da Petrobras e Raízen. Esse é o primeiro passo para a integração da segunda geração na cadeia produtiva do país (UNICA, 2013).

Com objetivo de acelerar o desenvolvimento em escala comercial do etanol de segunda geração produzido a partir da palha e do bagaço da cana-de-açúcar, o Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) decidiu investir R$ 600 milhões na usina pioneira da GranBio, que terá

capacidade para produzir 82 milhões de litros/ano. O Banco abriu uma linha de crédito em 2012, que vem sendo utilizada por diversas empresas ativas no desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis de segunda geração, como Abengoa e DuPont (UNICA, 2013).

A UNICA relata que embora em fase inicial de implantação, o etanol celulósico apresenta grande potencial de crescimento, visto que não depende da produção de alimentos para sua industrialização e nem da expansão da área plantada com cana-de-açúcar, e sim do reaproveitamento dos resíduos da produção de etanol e açúcar, que já são abundantes. Um dos principais desafios para o Brasil está na busca pela competitividade do combustível de segunda geração em relação ao de primeira.

Em geral, o custo de produção no Brasil do etanol de primeira geração, convencional, é mais baixo do que em outros países. Assim, a busca pela competitividade no Brasil poderá induzir a uma maior inovação nas tecnologias para redução do custo de produção. Segundo a UNICA, até 2020, outras empresas começarão a utilizar essas tecnologias, provocando um volume crescente de produção de combustível de segunda geração. A organização empresarial acredita que esse tipo de combustível terá uma aceitação especial no mercado pela sustentabilidade em sua produção, e que o Brasil terá uma parcela significativa de segunda geração na produção total dentro de uma década (UNICA, 2013).

3.14.5 Mercado nacional e internacional de celulases e perspectivas

O alto custo das enzimas (celulases) hoje representa o maior gargalo econômico para a produção de etanol de segunda geração a nível mudial, já

que o custo das enzimas e as taxas de conversão têm relação direta com a economicidade do processo produtivo. O custo da matéria-prima celulósica, entretanto, é baixo se comparado com o das outras matérias-primas para a produção de etanol (PEREIRA Jr. et al., 2008).

Atualmente, as maiores multinacionais detentoras do mercado mundial da produção de celulases são Novozymes (DK e US) e Genencor Inc. (US), que participam com 38% e 15% da produção mundial, respectivamente (figura 3.24). Outras empresas de grande atuação nesta vertente industrial incluem: Procter & Gambier (US), Novo Nordisk (DK), DSM N. V. (NL), Iogen (CA) e Danisco (DK) (KIRIHATA, 2010; SCHLITTLER et al., 2012). Em termos gerais, estas empresas recebem financiamento governamental de seus países para a pesquisa e desenvolvimento da produção destas enzimas, inclusive para a aplicação na produção de etanol combustível.

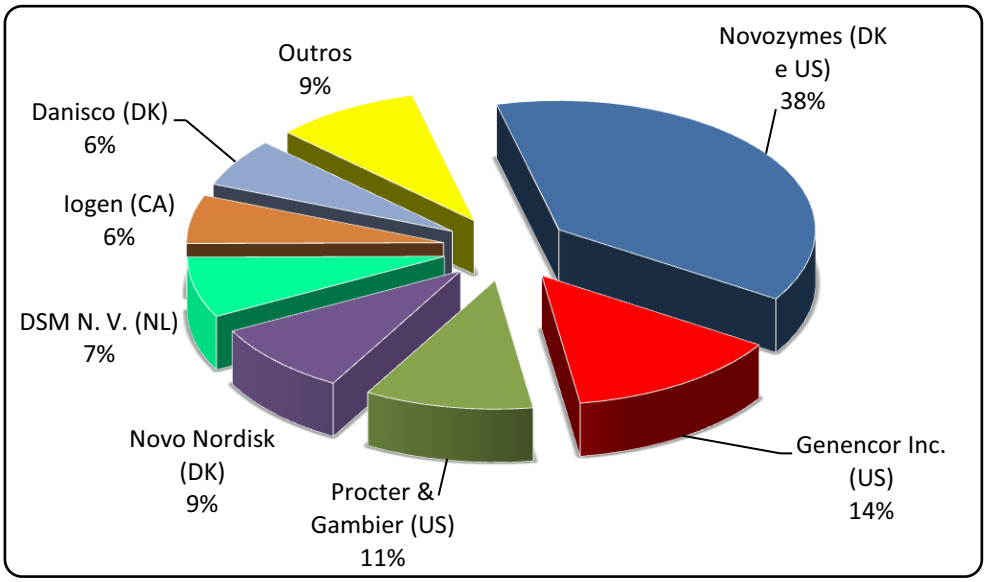


Figura 3.24. Principais multinacionais produtoras de celulases no mercado mundial. DK: Dinamarca, US: Estados Unidos, CA: Canadá, NL: Holanda. Fonte: Adaptado de Schlittler et al. (2012).

O Brasil atualmente depende de preparados celulásicos importados. De acordo com o portal do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2010), de janeiro de 2007 a junho de 2010, o país importou 431,80 toneladas de preparado enzimático à base de celulases, equivalendo a US$ 2.657.658 e exportou neste mesmo período 169,5 toneladas, equivalendo a US$ 1.907.564. A importação e exportação de celulases destinam-se principalmente à indústria têxtil e de detergentes.

O incentivo à produção de etanol de segunda geração tem atraído investimentos e parceria com indústrias multinacionais produtoras de enzimas.

Em 2007, a companhia dinamarquesa Novozymes e o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), de São Paulo, assinaram acordo para desenvolver uma enzima mais adequada para a hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar. No final de 2008, a Novozymes, divulgou que dentro de poucos anos o país poderia iniciar a produção deste tipo de álcool em escala comercial (STAVISKI, 2008). Segundo a empresa, cuja sede na América Latina está localizada em Araucária (PR), esta tecnologia aponta para uma solução, cujo custo será inferior ao da produção de álcool a partir do açúcar, e ainda afirmou que na medida em que ganhar escala, o álcool de celulose será mais barato que o produto atual. Esta pesquisa da Novozymes ocorre em escala mundial porque os Estados Unidos têm o mesmo interesse de produzir o álcool de celulose a partir dos resíduos do milho. São dezenas de cientistas envolvidos na sede da empresa na Europa, nos EUA (empresa tem parceria com a Universidade de Washington) e no Brasil (STAVISKI, 2008).

De acordo com Kirihata (2010), em 2010 a Novozymes assinou contrato com a empresa brasileira Dedini, que fabrica equipamentos para o setor de açúcar e etanol, e também apresentou interesse em utilizar a planta piloto do

Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) para testes de suas enzimas (KIRIHATA, 2010).

Paralelamente, o Brasil está procurando por estas enzimas através do Programa Bioetanol, projeto nacional financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) que estuda o processo de hidrólise enzimática. A planta piloto da Petrobras também inclui a produção de celulases (PETROBRAS, 2008). No Brasil se conhece ainda uma outra iniciativa empresarial voltada para o processo de hidrólise enzimática comercial - a da empresa de biotecnologia Bioenzimas, situada em Caruaru, PE. Com isso se pode antever que, no futuro, poderão existir dois ou três fornecedores dessa tecnologia no Brasil (STAVISKI, 2008).

3.14.6 Patentes nacionais e internacionais de celulases depositadas no Brasil

Em termos de patentes nacionais e internacionais de celulases depositadas no Brasil, houve um considerável número de aplicações nas últimas duas décadas. Segundo Schlittler et al. (2012), no Brasil há um vasto mercado consumidor de enzimas, particularmente celulases, e consequentemente, grandes empresas se instalaram no país, incluindo a Novozymes e Genencor. De acordo com este estudo, o primeiro pedido de patente registrado no banco de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) relacionado a celulases foi depositado em 1984. A maior parte das aplicações esteve concentrada entre 1991 e 2005, talvez em parte por causa de uma instalação industrial da Novozymes no sul do Brasil criada em 1989. O trabalho também ressaltou que, em muitas dessas patentes, a Biologia molecular foi uma ferramenta importante para o desenvolvimento de estirpes microbianas com a capacidade para aumentar a produtividade enzimática, bem

como a produção de enzimas novas e melhoradas. A figura 3.25 apresenta o número de aplicações de patentes de celulases no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil entre 1984 e 2012.

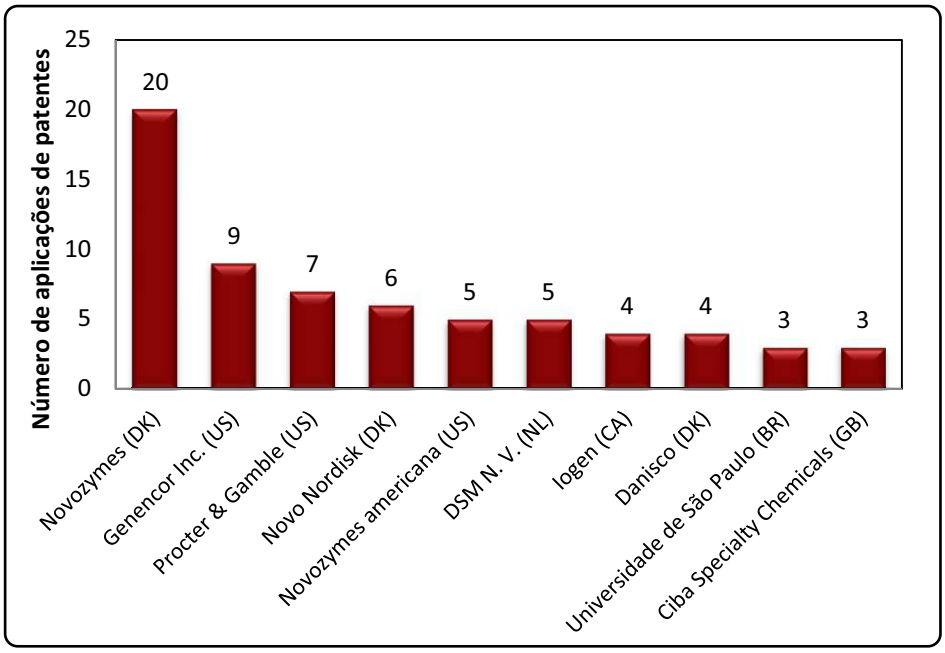


Figura 3.25. Principais empresas depositantes de patentes de celulases e respectivos números de aplicações no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil entre 1984 e 2012. DK: Dinamarca, US: Estados Unidos da América, CA: Canadá, NL: Holanda, GB: Grã-Bretanha. Fonte: Adapatado de Schlittler et al. (2012).

Ainda segundo Schlittler et al. (2012), as empresas dos Estados Unidos foram os maiores depositantes na base INPI entre 1984 e 2012, com 37 pedidos de patentes, seguidos pelos depositantes dinamarqueses com 32. O estudo revelou que, para a América do Norte, todas as aplicações foram depositadas por 13 instituições, enquanto que os pedidos dinamarquesas foram depositados por apenas 4 instituições. Apesar do grande número de depósitos de patentes por empresas norte-americanas, a empresa dinamarquesa Novozymes continua como líder mundial na produção de celulases. Contudo as instituições norte-americanas Genencor e Procter &

Gamble mantêm-se como referências na indústria de produção destas enzimas. A figura 3.26 mostra os principais países depositantes de patentes no Brasil.

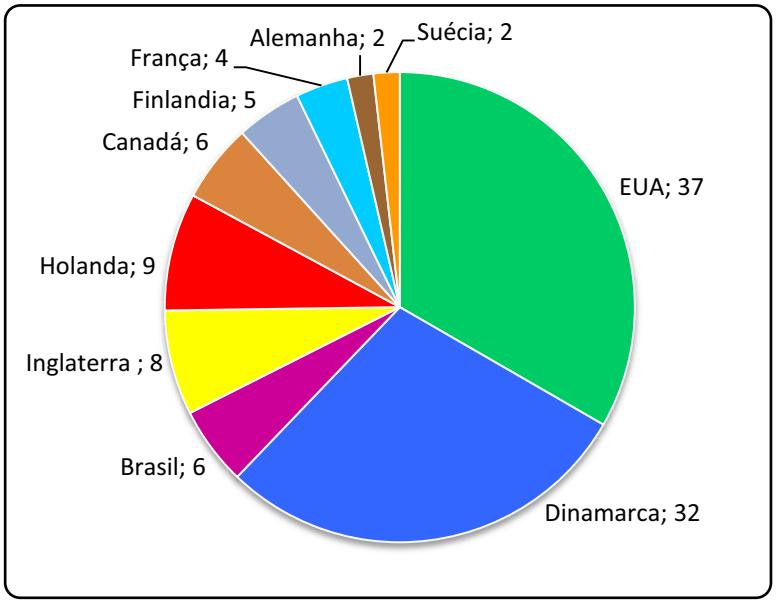


Figura 3.26. Principais países depositantes de patentes de celulases no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil entre 1984 e 2012. Fonte: Adapatado de Schlittler et al. (2012).

3.15 Considerações gerais sobre a revisão bibliográfica

Nos últimos anos o setor agroindustrial vem se destacando por ser um forte gerador de matéria-prima para o segmento de energia, principalmente o de biocombustíveis. O Brasil, em especial, tem grande potencial para a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica proveniente de bagaço de cana-de-açúcar.

Atualmente, o grande desafio é a redução do custo nos processos de produção do etanol de segunda geração, que está relacionado, principalmente, à dimimuição do custo das enzimas sacarificantes. O uso de biomassa lignocelulósica para a produção dessas enzimas associado à otimização do meio de cultivo, portanto, pode contribuir consideravelmente para a economicidade do processo de produção desses biocatalisadores.

Capítulo 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pré-tratamento do bagaço de cana

A celulignina utilizada neste estudo foi obtida a partir de bagaço de cana (*Saccharum* spp., Usina Dedini, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por meio de dois pré-tratamentos consecutivos (ácido e alcalino). O pré-tratamento ácido foi realizado com solução de ácido sulfúrico (1,1% v/v) com uma relação sólido:líquido de 1:2,8 (g:mL) a 121 °C durante 30 min, como descrito por Betancur e Pereira Jr. (2010). Após o pré-tratamento ácido, duas frações foram obtidas: uma fase líquida, que contém o hidrolisado de hemicelulose, e uma fração sólida, composta principalmente de celulose e lignina. Estas duas frações foram separadas por filtração em uma prensa hidráulica a uma pressão de 10 kg/cm^2. O sólido remanescente foi lavado repetidamente com água e o pH ajustado para 5 com NaOH 2 M. O resíduo lavado pré-tratado foi submetido a um pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio (2% m/v), com uma relação sólido:líquido de 1:20 a 121°C durante 30 min, como descrito por VASQUEZ et al. (2007). O material sólido resultante foi chamado celulignina parcialmente

deslignificada (CPD). A determinação da composição do bagaço de cana e celulignina parcialmente deslignificada foi conduzida por hidrólise química com H_2SO_4 realizada em duas etapas, de acordo com NREL (2005) e VERVERIS et al. (2007). A figura 4.1 mostra o aspecto do bagaço *in natura* e após os pré-tratamentos.

Figura 4.1. Aspecto do bagaço de cana *in natura* (a), após o pré-tratamento ácido (b) e após os pré-tratamentos ácido e alcalino.

4.1.1 Caracterização do bagaço de cana e celulignina

O bagaço de cana e a celulignina parcialmente deslignificada (CPD) foram caracterizados por gravimetria e cromatografia líquida (HPLC), de acordo com os procedimentos descritos a seguir.

O bagaço de cana foi cominuído em moinho (MF10 Basic, marca IKA®) e as partículas padronizadas com uso de peneira de abertura 0,5 mm. Posteriormente foi realizada a hidrólise química, utilizando ácido sulfúrico 72 % (m/m) em tubos de ensaio por 1 h a 30 °C. Após este período, o ácido foi diluído para 4 % com água deionizada e então, o bagaço com solução ácida foi autoclavado por uma hora a 121°C. O hidrolisado foi filtrado em cadinhos de vidro tipo Gooch nº 3 (previamente calcinado a 550 °C e pesado) e o resíduo foi

lavado com água destilada para remover todo o hidrolisado. Os cadinhos com resíduo seco (lignina klasson) foram pesados e calcinados em mufla a 550 °C por 5 h, resfriados e pesados. O hidrolisado foi neutralizado para pH 5,5 a 6,0 e filtrado. A partir do filtrado foram determinados os teores de açúcares redutores totais pelo método de DNS, segundo Miller (1959) e glicose por HPLC, em coluna HPX87. As concentrações de celulose, hemicelulose, lignina e cinza foram determinadas conforme as equações abaixo (SLUITER *et al*. 2005; VERVERIS *et al*. 2007; MAEDA, 2010).

$$Celulose\ (\%\ m/m) = \frac{0{,}90}{0{,}96} \cdot C1 \cdot \frac{v}{m} \cdot \alpha \cdot 100$$

Onde,

0,90 = Coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de glicose;

0,96 = Rendimento de sacarificação da celulose a glicose

*C*1 = Concentração de glicose (g/L)

v = Volume total da solução de açúcar (L)

m = massa da amostra seca (g)

∝ = diluição da amostra (se houver)

$$Hemicelulose\ (\%\ m/m) = \frac{0{,}88}{0{,}93} \cdot (C2 - C1) \cdot \frac{v}{m} \cdot \alpha \cdot 100$$

Onde,

0,88 = Coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de glicose

0,93 = Rendimento de sacarificação da xilana a xilose

*C*1 = Concentração de glicose (g/L)

*C*2 = Concentração de açúcares redutores (g/L)

v = Volume total da solução de açúcar (L)

m = massa da amostra seca (g)

∝ = diluição da amostra (se houver)

$$Lignina\ \ (\%\ m/m) = \frac{W1 - W2}{m} \cdot 100$$

Onde,

*W*1 = Resíduo seco da filtragem (g)

*W*2 = Resíduo após calcinação (g)

m = massa da amostra seca (g)

$$Cinza\ \ (\%\ m/m) = \frac{W2}{m} \cdot 100$$

Onde,

*W*2 = Resíduo após calcinação (g)

m = massa da amostra seca (g)

4.2 Microscopia eletrônica de varredura da fibra lignocelulósica de bagaço de cana nas diferentes etapas do pré-tratamento

O aspecto da fibra lignocelulósica nas diferentes etapas do pré-tratamento foi visualizado por microscopia eletrônica de varredura no Laboratório de Microscopia da *University of York*, Inglaterra, utilizando um microscópio modelo Hitachi S-5500 (Hitachi). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante do equipamento.

4.3 Microrganismo utilizado

O microrganismo utilizado neste estudo foi a cepa de *Trichoderma harzianum* IOC 3844, caracterizado e catalogado pelo banco de dados do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil.

Os esporos foram armazenados em glicerol (20% v/v) a 4°C em microtubos. Em cada experimento, a estirpe foi cultivada em placas contendo meio PDA (Merck) estéril, a 30°C durante 9-10 dias antes da inoculação.

A figura 4.2 mostra o aspecto macro e microscópico de *T. harzianum* IOC 3844. A imagem (a) do cultivo em placa foi registrada através de fotografia digital utilizando camera Nikon modelo D3100. As imagens (b) e (c) referem-se às hifas em meio de Mandels e Weber (1969) (aumentos de 40 x e 20 x), e (d) corresponde aos esporos de *T. harzianum* em água estéril. Estas imagens foram obtidas por microscópio Leica modelo DM 2000.

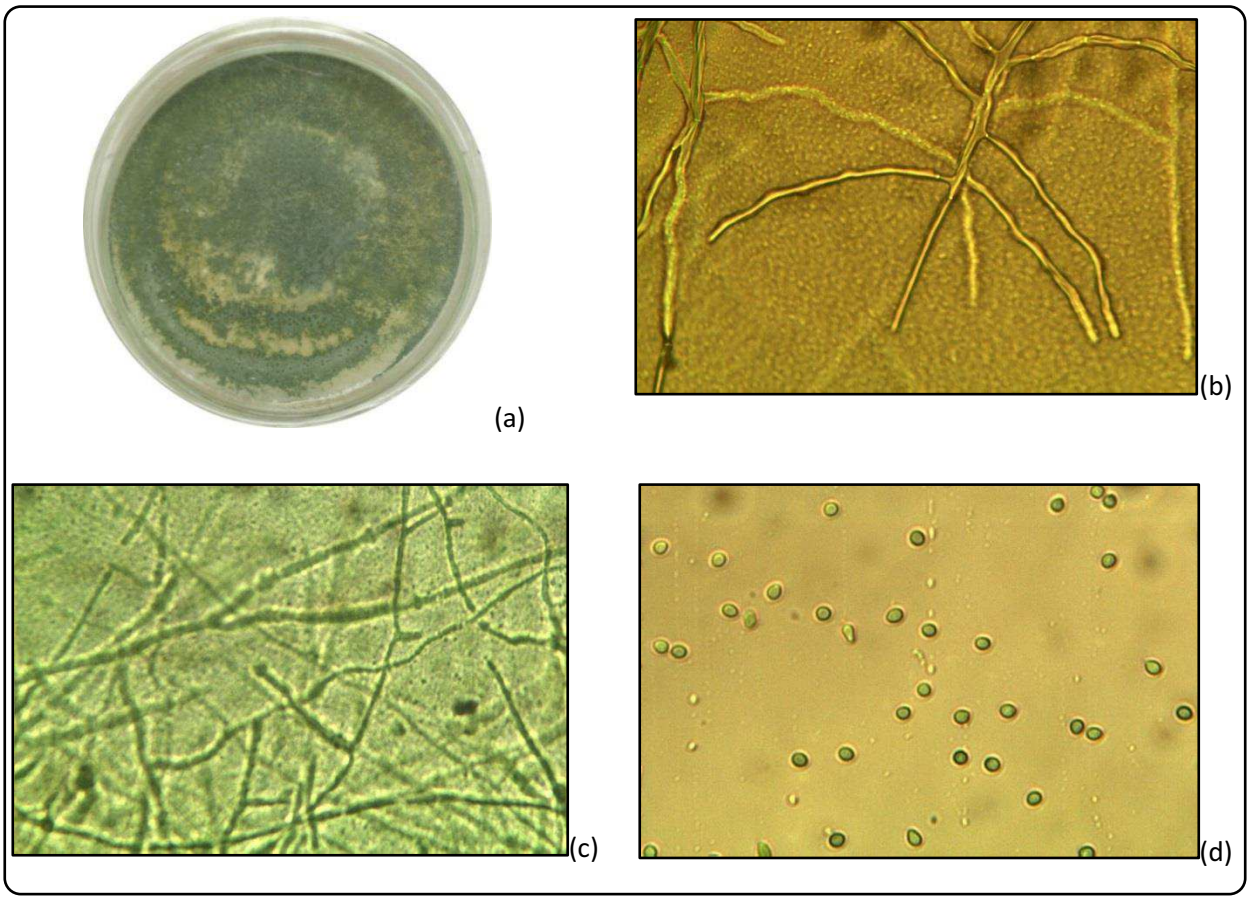


Figura 4.2. Aspecto macro e microscópico de *Trichoderma harzianum* IOC 3844. (a) esporos no cultivo em placa; (b) hifas (aumento de 40 x); (c) hifas (aumento de 20 x); (d) esporos (aumento de 40 x).

4.4 Produção de celulases

4.4.1 Otimização da produção de celulases em celulignina

A otimização da produção de celulases por *T. harzianum* foi feita utilizando meio de Mandels & Weber (1969) cujos componentes do meio original estão listados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição do meio Mandels & Weber (1969) para produção de celulases.

	Componente	Concentração
g/L	Uréia	0,3
	Extrato de levedura	0,25
	$(NH_4)_2SO_4$	1,4
	Peptona	0,75
	KH_2PO_4	2,0
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,4
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3
mg/L	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5,0
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1,6
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,4
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2,0

A otimização da produção de celulases foi conduzida por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR) cujas faixas de estudo são mostrados na tabela 4.2. Os fatores avaliados (uréia, extrato de levedura e sulfato de amônio) e as faixas de estudo foram escolhidos baseando-se em resultados prévios (ROCHA, 2010). O DCCR foi composto de um planejamento fatorial completo 2^3 (8 experimentos) com 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, o que resultou em 17 ensaios. Como fonte de carbono e indutor

da produção de enzimas utilizou-se celulignina parcialmente deslignificada (15 g/L).

Inicialmente foi feito o pré-inóculo transferindo-se assepticamente 10^6 esporos/mL previamente contados em câmara de Neubauer para frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de Mandels & Weber (1969) com 15 g/L de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) como fonte de carbono. O meio foi previamente autoclavado a 0,5 atm por 20 min. Os frascos foram incubados à temperatura de 30°C, sob agitação orbital de 200 rpm, durante 48 horas.

A produção de celulases foi realizada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio, e inoculados com o pré-inóculo (10% v/v) durante a etapa de otimização do meio. Os frascos foram incubados à temperatura de 30°C sob agitação orbital de 200 rpm. Após 72 horas de incubação, uma alíquota de 10 mL de cada frasco foi transferida para tubos falcon de 15 mL identificados, e posteriormente centrifugada a 3000 rpm por 15 min. Do sobrenadante foram retiradas as quantidades necessárias de extrato enzimático para a quantificação das atividades enzimáticas. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C até a análise.

Tabela 4.2. Fatores e níveis utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização da produção de celulases.

	Axial	**Min**	**PC**	**Max**	**Axial**
Fator	**-1,68**	**-1**	**0**	**1**	**1,68**
Uréia (g/L)	0,00	0,81	2,00	3,19	4,00
Extrato de levedura (g/L)	0,00	0,40	1,00	1,60	2,00
Sulfato de amônio (g/L)	0,00	0,81	2,00	3,19	4,00

Min: valor mínimo, PC: ponto central, Max: valor máximo.

A avaliação estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Statistica 6,0 (StatSoft, Inc.). As variáveis de resposta foram as atividades FPase, CMCase e β-glucosidase. Para maximizar as três variáveis de resposta simultaneamente, utilizou-se a função *Desirability* (D). Esta função varia de 0 a 1 ($0 < d_i < 1$), de acordo com a convergência dos resultados. Para uma função com três variáveis independentes, a função global é expressa como: $D = (d_1.d_2.d_3)^{1/3}$ (DERRINGER & SUICH, 1980). Os valores previstos foram validados experimentalmente nas condições otimizadas. As medições das atividades foram realizadas em triplicata.

4.4.2 Produção de celulases em biorreator instrumentado

A produção de celulases foi realizada em biorreator de 10 L (BioFlo® 310, New Brunswick Scientific), contendo meio de fermentação em condições otimizadas, adotando-se um volume reacional de 8 L. O meio foi inoculado com pré-inóculo (como descrito no item 4.4.1) numa proporção 10% v/v. Temperatura, agitação, pH, aeração, e espuma foram automaticamente controlados. O processo foi mantido a 30°C, pH 5,0 com uma velocidade de agitação de 200 rpm. O pH foi ajustado para 5,0 ± 0,2 e foi mantido pela adição de HCl 2 M ou NaOH 2 M. A espuma foi controlada por adição de agente anti-espumante. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em torno de 10%. O período total de cultivo foi de 42 horas. Uma alíquota de 10 mL foi retirada a cada 12 horas, centrifugada a 4.000 rpm durante 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi separado para quantificar as atividades das celulases. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C até a análise.

A figura 4.3 mostra o biorreator contendo meio de fermentação para produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 em celulignina parcialmente deslignificada. Ao término do processo, o meio fermentado produzido em biorreator foi filtrado a vácuo em lã de vidro para retirada das células presentes no meio e obtenção do extrato bruto enzimático.

Figura 4.3. Biorreator contendo meio de fermentação para produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 em celulignina parcialmente deslignificada (30°C, 200 rpm, pH 5, OD 10%, 42 horas).

4.4.3 Avaliação do efeito da aeração na produção de celulases

O efeito da aeração foi avaliado através de duas condições de saturação de oxigênio dissolvido (OD) do sistema: 10% e 30%. Esses níveis foram escolhidos baseando-se em estudos prévios (ROCHA, 2010). A produção de celulases foi realizada em biorreator instrumentado em meio otimizado nas condições previamente descritas.

4.4.4 Concentração do extrato enzimático em membranas de fibras ocas

O extrato enzimático foi concentrado utilizando um sistema de fibras ocas (*Hollow Fiber*® modelo QuixStand, marca GE Healthcare) (Figura 4.4). A primeira etapa consistiu em microfiltração em membrana de fibras ocas de polissulfona, de porosidade 0,2 µm, para remoção de células e material particulado. Posteriormente, o microfiltrado foi concentrado por ultrafiltração através de membrana de fibras ocas de polissulfona, de porosidade 5 kDa. Nesta etapa, o extrato enzimático concentrado ficava retido, enquanto que partículas menores que 5 kDa eram permeadas e eliminadas juntamente com a água. A pressão máxima aplicada ao sistema durante a concentração do extrato enzimático foi de 15 psi. O fator de concentração foi obtido dividindo-se o volume incial de extrato enzimático sobre o volume final obtido após a concentração. Neste estudo o fator de concentração foi de 48 vezes. Foram coletadas amostras do tanque de alimentação (extrato bruto), do concentrado final e do resíduo permeado para quantificação das respectivas atividades celulásicas.

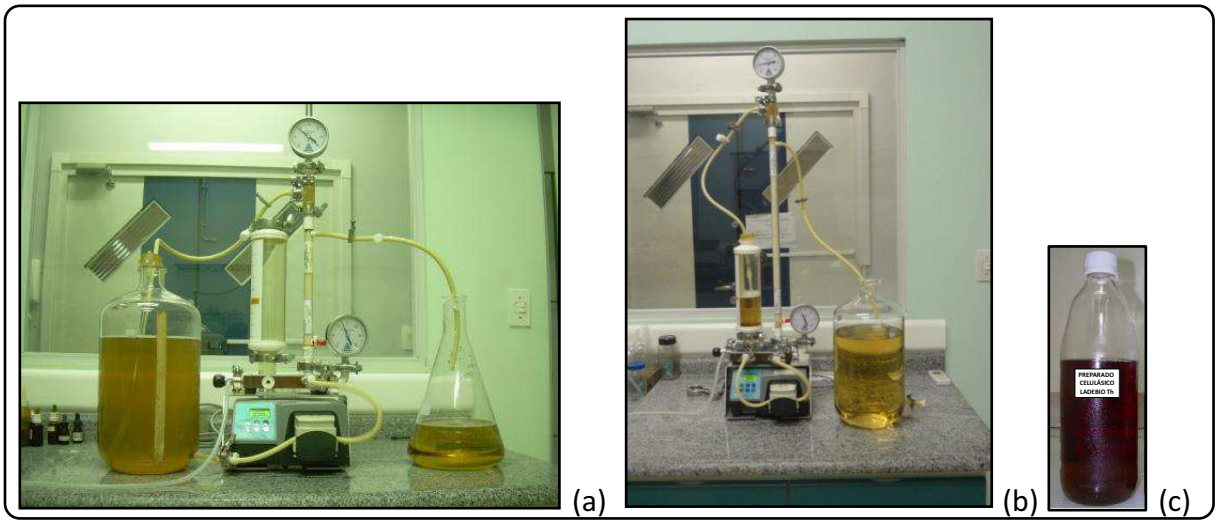


Figura 4.4. Equipamento de membranas de fibras ocas (*Hollow Fiber*®) utilizado para concentração do extrato bruto enzimático. (a) Microfiltração (0,2 µm); (b) Ultrafiltração (5 kDa). (c) Preparado celulásico Ladebio Th (após a concentração).

4.4.5 Determinação das atividades enzimáticas

O modo de preparo das soluções utilizadas nos ensaios enzimáticos está disponibilizado no anexo 1.

4.4.5.1 Atividade FPase

A quantificação da atividade FPase foi realizada em tubo de ensaio incubando-se 500 µL de extrato enzimático (devidamente diluído) com 1 tira de papel de filtro Whatman nº1 de 1 x 6 cm (enroscada) e 1 mL de tampão citrato de sódio pH 5,0 a 50°C por 60 minutos (adaptado de GHOSE, 1987). Cada amostra foi analisada em triplicata. Foi feito um branco reacional nas mesmas condições da amostra, mas que continha somente tampão. Foi feito também o controle da enzima nas mesmas condições da amostra, mas sem o substrato; e o controle do substrato foi feito nas mesmas condições da amostra, mas sem a enzima. Das atividades das amostras foram subtraídos os valores de absorbância do branco, controle da enzima e controle do substrato.

Transcorrido o tempo reacional, os tubos foram imediatamente incubados a 100°C por 5 min, de forma a parar a reação enzimática. Em seguida, adicionou-se 3 mL de reagente de DNS e os tubos foram incubados por 5 min a 100°C. Após esfriamento dos frascos, adicionou-se 20 mL de água e as soluções contidas nos tubos foram homogeneizadas por inversão. A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. Previamente foi feita curva de calibração utilizando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores (glicose equivalente) por minuto.

4.4.5.2 Atividade CMCase

A quantificação da atividade CMCase foi realizada em tubos eppendorf de 2 mL, incubando-se 50 µL de extrato enzimático diluído com 50 µL de solução de CMC (2 % m/v) a 50°C por 15 min (adaptado de GHOSE, 1987). Cada amostra foi analisada em triplicata. Foi feito um branco reacional nas mesmas condições da amostra, mas que continha somente tampão. Foi feito também o controle da enzima nas mesmas condições da amostra, mas sem o substrato; e o controle do substrato foi feito nas mesmas condições da amostra, mas sem a enzima. Das atividades das amostras foram subtraídos os valores de absorbância do branco, controle da enzima e controle do substrato.

Após o tempo reacional, os tubos foram imediatamente incubados a 100°C por 5 min, de forma a parar a reação enzimática. Em seguida, foram adicionados 300 µL de reagente de DNS, e os tubos foram incubados por 5 min a 100°C. Após este período, foram adicionados 1,5 mL de água, seguido de homogeneização em vórtex. A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. Previamente foi feita curva de calibração utilizando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores (glicose equivalente) por minuto.

4.4.5.3 Atividade β-glucosidase

Para a determinação da atividade β-glucosidase, 50 µL de extrato enzimático diluído foram incubados com 50 µL de solução de celobiose (2 % m/v) por 15 min a 50°C (adaptado de GHOSE, 1987). Cada amostra foi analisada

em triplicata. Foi feito um branco reacional nas mesmas condições da amostra, mas que continha somente tampão. Foi feito também o controle da enzima nas mesmas condições da amostra, mas sem o substrato; e o controle do substrato foi feito nas mesmas condições da amostra, mas sem a enzima. Das atividades das amostras foram subtraídos os valores de absorbância do branco, controle da enzima e controle do substrato.

Após o tempo de reação, os tubos foram imediatamente incubados a 100°C por 5 min, de forma a promover a inativação das enzimas. Em seguida, adicionou-se 1 mL de reativo enzimático glicose oxidase (GOD) para dosagem de glicose e os tubos foram novamente incubados, desta vez a 37°C por 15 min. Finalmente, foi adicionado 1 mL de água destilada e as soluções tiveram suas absorvâncias registradas no comprimento de onda de 505 nm. A quantificação da glicose liberada foi baseada em uma curva padrão de concentração máxima de 1 g/L de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto.

4.4.5.4 Atividade avicelase

A quantificação da atividade avicelase foi realizada em tubo de ensaio incubando-se 500 µL de extrato enzimático (devidamente diluído) com 1000 µL de solução de Avicel (2 % m/v) a 50°C por 1 hora (adaptado de CASTRO, 2006). Cada amostra foi analisada em triplicata. Os tubos foram agitados manualmente a cada 10 minutos, visto que o Avicel é insolúvel em água. Foi feito um branco reacional nas mesmas condições da amostra, mas que continha somente tampão. Foi feito também o controle da enzima nas mesmas condições da amostra, mas sem o substrato; e o controle do substrato foi feito

nas mesmas condições da amostra, mas sem a enzima. Das atividades das amostras foram subtraídos os valores de absorbância do branco, controle da enzima e controle do substrato.

Transcorrido o tempo reacional, os tubos foram imediatamente incubados a 100°C por 5 min, de forma a parar a reação enzimática. Em seguida, retirou-se 100 µL do sobrenadante dos tubos de ensaio e transferiu-se para respectivos eppendorfs, previamente identificados. Adicionou-se, então, 300 µL de reagente de DNS, e os tubos foram incubados por 5 min a 100°C. Após este período, foram adicionados 1,5 mL de água, seguido de homogeneização em vórtex. A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. Previamente foi feita curva de calibração nas mesmas condições das amostras, utilizando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores (glicose equivalente) por minuto.

4.4.5.5 Atividade xilanase

A quantificação da atividade xilanase foi realizada em tubos eppendorf de 2 mL, incubando-se 50 µL de extrato enzimático diluído com 50 µL de solução de xilana (2 % m/v) a 50°C por 15 min (adaptado de GHOSE, 1987). Cada amostra foi analisada em triplicata. Foi feito um branco reacional nas mesmas condições da amostra, mas que continha somente tampão. Foi feito também o controle da enzima nas mesmas condições da amostra, mas sem o substrato; e o controle do substrato foi feito nas mesmas condições da amostra, mas sem a enzima. Das atividades das amostras foram subtraídos os valores de absorbância do branco, controle da enzima e controle do substrato.

Após o tempo reacional, os tubos foram imediatamente incubados a 100°C por 5 min, de forma a parar a reação enzimática. Em seguida, foram adicionados 300 µL de reagente de DNS, e os tubos foram incubados por 5 min a 100°C. Após este período, foram adicionados 1,5 mL de água, seguido de homogeneização em vórtex. A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. Previamente foi feita curva de calibração utilizando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores (glicose equivalente) por minuto.

4.4.6 Teor proteico

O teor de proteínas totais dos extratos enzimáticos foi determinado incubando-se 800 µL de amostra (devidamente diluída) com 200 µL de reativo de Bradford (BioRad) por 5 min à temperatura ambiente (BRADFORD, 1976). A leitura foi realizada a 595 nm. O branco reacional continha 800 µL de água, ao invés de amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata. A quantificação de proteínas liberada foi baseada em uma curva padrão de concentração máxima de 1 g/L de soro albumina bovina (BSA).

4.5 Gel de Proteínas dos meios otimizado e não-otimizado

O perfil de proteínas dos meios otimizado e não-otimizado foi visualizado em gel SDS-PAGE. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida (10%) através da aplicação de uma diferença de potencial de 180 V e uma corrente de 20 mA/gel num sistema vertical, modelo Mini Protean 3 (Bio-Rad) (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

Foram avaliadas as seguintes condições: meio não-otimizado produzido em frasco, meio otimizado produzido em frasco, e meio otimizado produzido em reator. Todas as canaletas foram carregadas com o mesmo volume de proteínas (15 µL).

4.6 Zimogramas do secretoma de *T. harzianum*

No que diz respeito aos zimogramas de CMCases e xilanases, a corrida eletroforética do secretoma concentrado de *T. harzianum* foi realizada em gel de poliacrilamida (10%) mediante a aplicação de uma diferença de potencial de 180 V e uma corrente de 20 mA/gel num sistema vertical, modelo Mini Protean 3 (Bio-Rad). Para os zimogramas de CMCase e xilanase, carboximetilcelulose (1% m/v) e xilana 1% (m/v) foram adicionados à composição de gel de poliacrilamida, respectivamente. A caracterização foi realizada por comparação das bandas reveladas com padrões de peso molecular. Para todas as amostras foram aplicados 10 µg de proteínas por canaleta no gel.

Ao término da corrida das amostras, os géis foram imersos em solução Triton X-100 1% e mantidos sob agitação constante durante 20 minutos para remover o SDS. Em seguida, os géis foram lavados duas vezes em tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 5,0) durante 20 minutos e foram incubados no mesmo tampão a 50°C durante 20 minutos. Os géis foram então imersos em solução de vermelho Congo (0,1% m/v) durante 30 minutos e depois foram lavados sucessivas vezes com uma solução de NaCl 1 M até que as bandas fossem reveladas. Finalmente, os géis foram lavados com solução de ácido acético 5%, formando uma coloração roxa (adaptado de ALFENAS, 1998).

4.7 Caracterização proteômica de *T. harzianum*

4.7.1 SDS-PAGE do secretoma de *T. harzianum* e Digestão tríptica em gel para espectrometria de massa: bandas 1D

Inicialmente foi feita a produção de proteínas por *T. harzianum* em biorreator em condições otimizadas utilizando bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

As proteínas do secretoma de *T. harzianum* (200 µg) foram, então, separadas por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida (10%) através da aplicação de uma diferença de potencial de 180 V e uma corrente de 20 mA/gel durante 40 min num sistema vertical, modelo XCell SureLock (Invitrogen) (Figura 4.5a). Para visualizar as bandas de proteínas, o gel foi corado com *Coomassie brilliant blue* (0,1% m/v) e em seguida foram feitas lavagens sucessivas com água Milli-q até o aparecimento das bandas (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

Para a caracterização proteômica, as bandas do gel foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1 mm (Figura 4.5b) e transferidas para tubos eppendorf *LoBind*. O descoramento foi feito lavando as bandas com bicarbonato de amônio 25 mM em acetonitrila 50%: água deionizada 50% (v/v, 200 mL) durante 20 minutos. O procedimento foi repetido uma vez. O sobrenadante foi removido e lavado com acetonitrila (200 µL) durante 5 minutos. Os pedaços de gel foram secos no *Speedvac* (20 minutos). Em seguida, foram adicionados 200 µL de ditiotreitol 100 mM (DTE) em solução de bicarbonato de amônio 100 mM e incubou-se a 56°C durante 1 hora com o objetivo de reduzir as amostras. Os pedaços de gel voltaram à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido do gel e para alquilar as amostras foram adicionados 200 µL de iodoacetamida 50 mM em solução de bicarbonato

de amônio 100 mM, seguido de incubação no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. O sobrenadante foi removido e o gel foi lavado com bicarbonato de amônio 100 mM (200 µL), durante 15 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o gel foi lavado com bicarbonato de amônio 25 mM em acetonitrila 50%: água 50% (v/v, 200 mL) durante 15 minutos. Este sobrenadante, então, foi removido e o gel lavado em acetonitrila (200 µL) durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os pedaços de gel foram secos em *Speedvac* (20 minutos). A digestão foi feita pela adição de 10 µL de solução de tripsina (0,02 µg/µL de tripsina em bicarbonato de amônio 25 mM) para cada amostra. As amostras foram incubadas a 37°C durante a noite. O sobrenadante contendo os peptídeos digeridos foi removido e retido. Os peptídeos foram extraídos do gel residual com acetonitrila 50%: água 50% (v/v, 200 µL) durante 15 minutos. Isto foi repetido duas vezes. O sobrenadante combinado e os extratos foram secos em *Speedvac*. Os peptídeos foram reconstituídos em 20 µL de ácido trifluoroacético 0,1% em água.

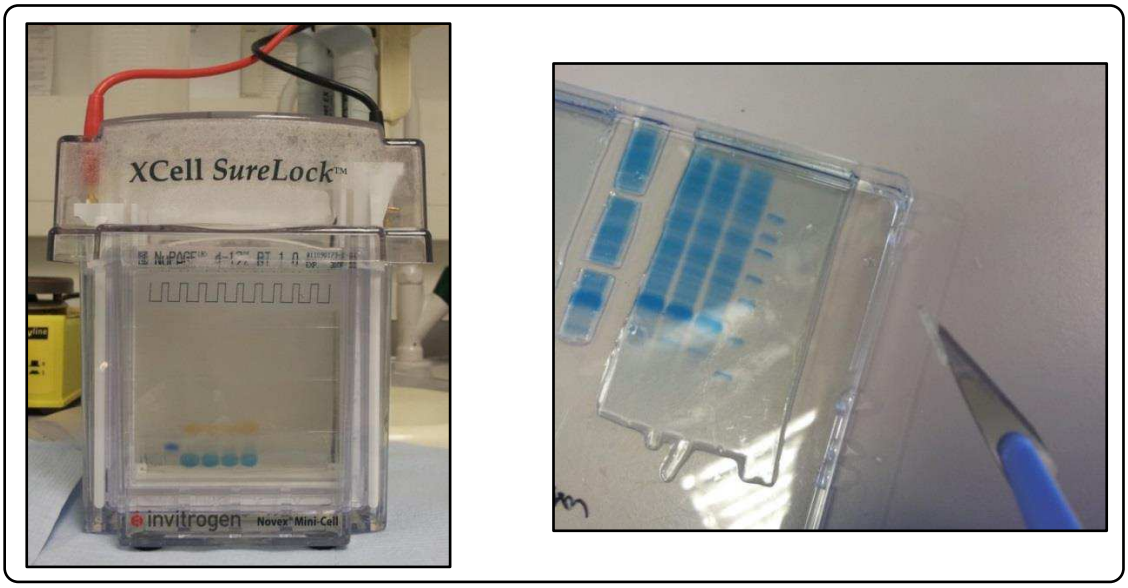


Figura 4.5. (a) Eletroforese de proteínas do secretoma de *T. harzianum* em gel SDS-PAGE; (b) corte do gel contendo secretoma de *T. harzianum* para digestão tríptica por espectrometria de massa.

4.7.2 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa foi aplicada para identificar as proteínas do gel SDS-PAGE após a digestão com tripsina. A análise dos peptídeos foi efetuada por *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) utilizando um nanoHPLC (Dionex) acoplado a um espectrômetro de Massa ESI-QUAD-TOF-2 (Waters Micromass). O algoritmo de Mascot (Matrix Science) foi utilizado para correlacionar os dados de espectrometria de massa com sequências de aminoácidos na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando o Blastp (BLAST proteína-proteína) (NCBI, 2013; RAMOS-FERNANDEZ et al., 2008). Assim, as sequências dos peptídeos analisados podiam ser identificadas, e, em última análise, proteínas correspondentes podiam ser determinadas.

4.7.3 Análise dos dados da Espectrometria de massa

A proporção de cada proteína foi calculada pelo *índice de abundância de proteína modificado exponencialmente (emPAI)* que estima a quantidade de proteína absoluta no proteoma pelo número de peptídeos sequenciados por proteína, de acordo com as equações (ISHIHAMA *et al*., 2005):

$$PAI = \frac{N_{observado}}{N_{observável}}$$

$$emPAI = 10^{PAI} - 1$$

$$Conteúdo\ de\ Proteínas\ (mol\ \%) = \frac{emPAI}{\Sigma\ emPAI} x\ 100$$

4.8 Hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum*

4.8.1 Efeito do grau de deslignificação da celulignina

A fim de avaliar o efeito do grau de deslignificação da celulignina parcialmente deslignificada no desempenho hidrolítico do preparado celulásico produzido por *T. harzianum* IOC 3844, foram preparadas amostras de celulignina com diferentes graus de deslignificação. Inicialmente o bagaço de cana de açúcar foi pré-tratado utilizando ácido sulfúrico 1% para retirar a hemicelulose. Em seguida foram preparadas diferentes amostras de celulignina com diferentes graus de deslignificação utilizando solução de NaOH com diferentes concentrações: 0,10%; 0,25%; 0,50%; 1%; 2% e 4%. Foi feito experimento controle utilizando-se bagaço de cana sem pré-tratamento.

A hidrólise utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum* foi realizada com carga enzimática normalizada em 25 FPU/g de CPD. A concentração de CPD (para cada grau de deslignificação) foi de 100 g/L. Os experimentos foram conduzidos em duplicata em frascos Erlenmeyers previamente identificados, contendo 200 mL de meio reacional (tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5, enzima e CPD), a 50°C sob agitação de 200 rpm por 72 horas. Os perfis cinéticos das hidrólises foram obtidos com amostragens de 1 mL a cada três horas durante as primeiras 12 horas, e posteriormente foram feitas amostragens em intervalos maiores. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 10°C durante 10 minutos e o sobrenadante armazenado a -20°C até a análise das amostras. Do sobrenadante foi feita a quantificação de glicose e açúcares redutores liberados.

4.8.2 Comparação com um preparado celulásico comercial e efeito da adição de β-glucosidase

O desempenho do preparado enzimático concentrado de *T. harzianum* (*Ladebio Th*) foi comparado com a preparação enzimática *Multifect*® produzido pela Genencor, ambos com adição de β-glucosidase comercial (NS 50010).

Os experimentos de hidrólise foram conduzidos com uma carga enzimática normalizada de 25 FPU/g, na proporção de 1 FPU: 5 BG (β-glucosidase), e uma concentração de substrato de 100 g/L de celulignina parcialmente deslignificada pré-tratada como descrito no item 4.1. Os experimentos foram realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers com 200 mL de meio reacional (tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5, enzima e CPD), a 50°C, agitação de 200 rpm durante 24 horas. Durante este procedimento, alíquotas foram periodicamente obtidas para avaliação do perfil cinético. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 10 °C durante 10 minutos e o sobrenadante armazenado a -20°C até a análise das amostras. Do sobrenadante foi feita a quantificação de glicose liberada.

4.8.3 Avaliação de diferentes concentrações de substrato e diferentes cargas enzimáticas

Com intuito de verificar o efeito da carga enzimática e da concentração de substrato na *performance* do preparado celulásico de *T. harzianum*, foram feitos diferentes experimentos de hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada. Os experimentos foram realizados de acordo com a tabela 4.3, de modo que para cada concentração de substrato (25 g/L, 50 g/L, ou 100 g/L) foram avaliadas três cargas enzimáticas (25 FPU/g, 50 FPU/g, ou 75

FPU/g). Um experimento controle foi feito sem enzima nas mesmas condições que as amostras. A celulignina parcialmente deslignificada (CPD) foi pré-tratada como descrito no item 4.1.

Os experimentos foram realizados em triplicata, em frascos cônicos com 100 mL de meio reacional (tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5, enzima e CPD), a 50°C, sob agitação de 200 rpm durante 48 horas, utilizando celulignina parcialmente deslignificada como fonte de celulose. Durante este procedimento, alíquotas foram periodicamente retiradas para a elaboração de um perfil cinético. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min e o sobrenadante armazenado a -20°C até a análise das amostras. Do sobrenadante foi feita a quantificação de glicose e celobiose liberadas.

Tabela 4.3. Concentrações de CPD e cargas enzimáticas (preparado enzimático de *T. harzianum*) utilizadas na hidrólise enzimática.

Concentração de CPD (g/L)	**Carga enzimática (FPU/g)**
25	25
	50
	75
50	25
	50
	75
100	25
	50
	75

Como exemplo, a figura 4.6 mostra o aspecto do bagaço de cana após a hidrólise enzimática utilizando o preparado enzimático de *T. harzianum*. A fotografia refere-se à amostra de 100 g/L e 75 FPU/g.

Figura 4.6. Aspecto do bagaço de cana após a hidrólise enzimática utilizando o preparado enzimático de *T. harzianum*.

A eficiência de hidrólise dos distintos ensaios foi calculado com base na presença de 68% de celulose na CPD (dados mostrados na seção de resultados), de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Eficiência de hidrólise (\%)} = \frac{\text{glicose liberada } (g.L^{-1})}{\text{concentração de CPD} \times 0{,}68 \times 1{,}1} \times 100$$

Onde:

0,68 é o teor de celulose na celulignina (g/g); e

1,1 é um fator estequiométrico que representa a adição de moléculas de água aos resíduos de anidroglicose em celulose.

A análise estatística foi realizada com objetivo de determinar a significância dos parâmetros avaliados na hidrólise enzimática utilizando celulases de *T. harzianum*: concentração de substrato (25, 50 e 100 g/L), carga enzimática (25, 50 e 75 FPU/g) e tempo (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas) em um

delineamento fatorial 3x3x7 e Teste de Tukey para comparação de médias. Estas análises foram realizadas para um nível de confiança de 95% (nível de significância de 5%), utilizando o programa STAT versão 2.0 (FCAV / UNESP, Software Jaboticabal). A eficiência de hidrólise e a concentração de glicose liberada foram as variáveis de resposta.

4.8.4 Quantificação em HPLC dos açúcares produzidos

As amostras dos hidrolisados foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min a 10°C. Em seguida o sobrenadante foi filtrado em membrana Millex 4 mm de diâmetro e porosidade 0,22 µm (Millipore). Posteriormente as amostras foram adequadamente diluídas e analisadas por HPLC.

Os açúcares produzidos na hidrólise enzimática (glicose e celobiose) foram quantificados por sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Waters 2414, detector de índice de refração, coluna HPX87P). A temperatura do detector foi 40°C, e a da coluna 80°C. A fase móvel foi água milliQ, a um fluxo de 0,6 mL/min. Como padrões foram utilizadas glicose e celobiose.

4.8.5 Quantificação dos açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada em microtubos eppendorf de 2 mL, incubando-se 100 µL de amostra (devidamente diluída) com 300 µL de reagente de DNS. A reação ocorreu por 5 min a 100 ^{o}C. Após este período, foram adicionados 1,5 mL de água, seguido de homogeneização em vórtex. A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959).

4.9 Produção de swolenina recombinante

No presente estudo a produção de swolenina recombinante de *T. harzianum* foi feita por expressão heteróloga em *A. niger*.

4.9.1 Sequência da swolenina

A sequência de swolenina utilizada foi obtida do *Joint Genome Institute* (JGI, 2013) e é apresentada no anexo 2.

4.9.2 Clonagem do gene da swolenina de *T. harzianum* no plasmídeo

4.9.2.1 Mapa do plasmídeo

A figura 4.7 mostra o mapa do plasmídeo pSC-B::*SWO1* utilizado para a clonagem do gene da swolenina de *T. harzianum*.

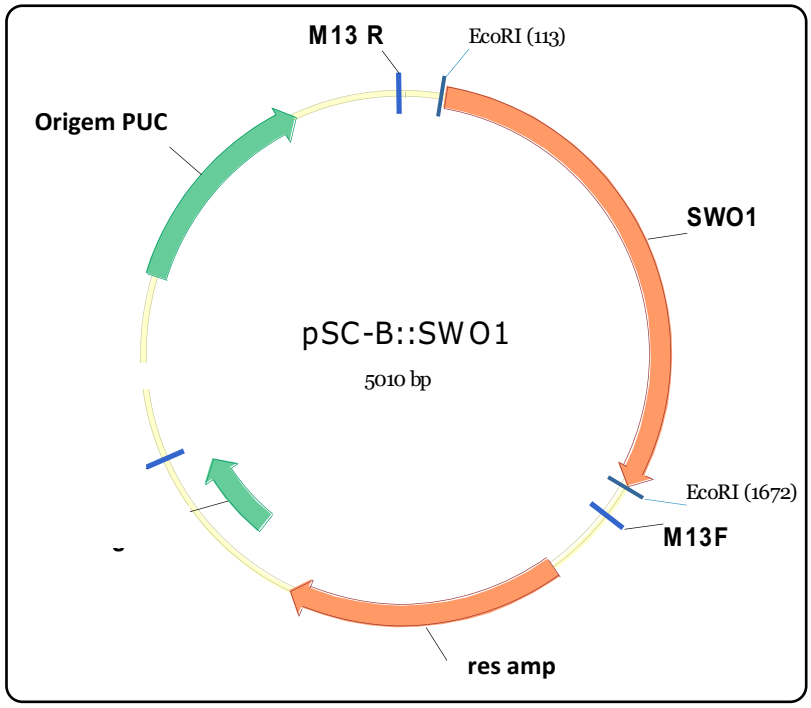


Figura 4.7. Mapa do plasmídeo pSC-B::SWO1.

Os símbolos do mapa do plasmídeo se referem a:

- Origem PUC: Origem de replicação do plasmídeo. Sequência derivada do plasmídeo PUC (um plasmídeo de alto número de cópias utilizado na construção de outros plasmídeos para gerar elevada taxa de replicação)
- M13 R: Primer reverso
- *SWO1*: Gene codificante da swolenina
- *Eco*RI: Enzima de restrição de *E. coli*
- M13 F: Primer direto
- res amp: Gene codificante da beta-lactamase (confere resistência à ampicilina)

O plasmídeo utilizado neste estudo foi o vetor pSC-B (kit StrataClone PCR Cloning, Agilent Technologies). Esse plasmídeo é um vetor comercial utilizado para clonar produtos de PCR, e foi usado para ligar o inserto *SWO1*.

O gene da swolenina foi amplificado por PCR a partir do cDNA e clonado no vetor pSC-B para sequenciamento. Uma vez que a sequência foi verificada este foi novamente amplificado usando o plasmídeo como modelo e clonado no vetor para expressão de proteínas recombinantes em *Aspergillus niger* pIGF-pyrG-GlaSS . Este vetor possibilita a expressão da swolenina fusionada ao peptídeo de secreção da glucoamilase (Gla). A fusão Gla-swolenina é então clivada por proteases fúngicas, liberando a swolenina diretamente no meio de cultivo. O vetor contendo o gene de interesse foi transformado em *A. niger*, onde este foi incorporado no genoma e expresso.

4.9.2.2 Extração, quantificação e tratamento do RNA de *T. harzianum*

Para a extração do RNA, inicialmente foi feita a produção de proteínas por *T. harzianum* de acordo com a condição otimizada descrita na metodologia. Após 48 horas, a amostra foi filtrada em membrana *Miracloth* estéril e a biomassa fúngica foi armazenada a -80°C. Posteriormente o micélio fúngico foi triturado em cadinho de porcelana contendo nitrogênio líquido utilizando um socador de porcelana. Alíquotas de nitrogênio líquido foram constantemente adicionadas, de modo a manter a amostra sempre congelada. Foram avaliadas diferentes quantidades de biomassa fúngica em duplicata em tubos eppendorf estéreis: 25, 50, 75 e 100 mg.

A extração do RNA foi realizada utilizando o kit *Total RNA Purification* (Norgen Biotek Corporation). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop) e posteriormente estocado a -80°C.

A integridade/pureza do RNA foi verificada através de corrida em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL). A amostra que apresentou maior concentração de RNA e aspecto íntegro no gel foi selecionada para a produção de cDNA.

O RNA foi tratado com DNAse de modo a eliminar qualquer contaminação com DNA genômico da amostra de RNA.

O tratamento com DNase foi feito adicionando-se os seguintes componentes: 1 µL de *10x buffer* (Promega), 1 µL de *RQ1 DNAse* (Promega), 1 µg de RNA total de *Aspergillus* e 5 µL de água (total de 8 µL). A incubação foi conduzida a 37°C por 30min. Em seguida adicionou-se 1 µL de *stop buffer*

(Promega) e as amostras foram mantidas a 65°C por 15min. O RNA foi mantido a -80°C até a síntese de cDNA.

4.9.2.3 Produção do cDNA, purificação e avaliação da viabilidade em gel

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita de acordo com o seguinte protocolo, usando um primer para a cauda de poli(A) do mRNA (oligo dT) e a enzima transcriptase reversa SuperScriptII RT (Invitrogen): 1 µL de oligo dT Invitrogen 100 µM (MW 4500), 10 µL de *DNAsed* RNA (1 µg), 1 µL de dNTP 10 mM (Total 12 µL). A incubação foi conduzida por 5 min a 65°C em máquina de PCR , seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 13.000 rpm por 1 min.

Posteriormente foi realizado o tratamento com RNAse. Misturou-se os seguintes componentes: 160 µL de *First Strand buffer* 5x (Invitrogen), 80 µL de 0,1M DTT e 40 µL de RNAseOUT (40 µg/µL). Dessa mistura foram adicionados 7 µl em cada amostra. A incubação foi conduzida a 42 °C por 2 min em máquina de PCR. Adicionou-se 1 µL de SuperScriptII RT (Invitrogen). A incubação foi realizada durante 50 min a 42°C, seguida de inativação por aquecimento durante a 70°C 15 min em máquina de PCR. Diluiu-se a 100 µL em H2O (através da adição de 80 µL de água).

O cDNA codificante para swolenina foi produzido seletivamente por reação de polimerização em cadeia (PCR) em máquina de PCR modelo PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições: 94°C /2 min; 35x (94°C/15 s; 55°C/30 s; 72°C/1 min e 30 s); 72°C /5 min; 10°C /10 min. A DNA polimerase de alta fidelidade utilizada na reação foi a *Phusion Hot Start II* (Finnzymes). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizadas duas combinações de primers 5'→3' (5'UTR_SWO → 3'UTR_SWO) e (5'ATG_SWO → 3'Stop_SWO), a fim de maximizar a amplificação específica de

cDNA codificador da swolenina. As sequências dos primers estão apresentadas no anexo 3. A viabilidade do transcrito (cDNA) foi verificada através de corrida em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL). Os tamanhos de pares de base esperados no gel foram de: 1541 pb/UTR e 1500 pb/ATG.

Após verificação da viabilidade no gel, o cDNA amplificado usando os primers UTR e ATG foi purificado utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (QIAquick) e armazenado a -20°C. O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante.

4.9.2.4 Ligação do DNA de *T. harzianum* no plasmídeo

A ligação do cDNA de *T. harzianum* ao plasmídeo pSC-B de *E. coli* foi feita utilizando o kit *StrataClone PCR Cloning* (Agilent Technologies). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O produto das ligações foi transformado em células termocompententes de *E. coli e* 40 µL da suspensão celular foi repicado em placas de Petri previamente identificadas contendo meio LB Agar + carbenicilina 50 mg/L e 40 µL de X-Gal. As células de *E. coli* cresceram a 37°C por 18 horas. X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranosídeo) é um substrato cromogênico que por ação da beta-galactosidase é hidrolisado a galactose incolor e 4-cloro-3-bromo-indigo, formando um precipitado azul intenso (http://www.thermoscientificbio.com). Este reagente é utilizado para a seleção das células recombinantes. As células recombinantes (positivas) formam coloração branca, enquanto que as negativas possuem coloração azul.

4.9.2.5 Seleção das colônias positivas e amplificação do DNA

Foram escolhidas aleatoriamente 8 colônias positivas (brancas) para amplificação do DNA. As colônias individuais foram coletadas das placas por raspagem utilizando ponteiras estéreis, e transferidas para tubos eppendorf previamente identificados contendo 20 µL de água estéril, em fluxo laminar. As suspensões celulares foram mantidas estéreis em geladeira a 4°C.

O DNA das colônias individuais foi amplificado por reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando o kit *Dream Taq Green DNA Polymerase* (Fermentas Life Sciences). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O PCR foi feito em máquina de PCR modelo PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições: 94°C /3 min; 35x (94°C/30 seg; 54°C/30 seg; 72°C/1 min e 30 seg); 72°C /10 min; 10°C /10 min. Os primers utilizados foram M13 F (*foward*) e M13 R (*reverse*). Foram utilizados 5 µL da suspensão celular bacteriana (preparada como descrito acima) como fonte de DNA-molde. A amplificação do DNA foi verificada através de corrida em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL). As colônias com produto de PCR com tamanho de pares de base esperado no gel (positivas) (1541 pb/UTR e 1500 pb/ATG) foram selecionadas para posterior repique e purificação do DNA.

4.9.2.6 Reação com Enzima de restrição *Eco*RI

A fim de se verificar a ligação dos produtos de PCR ao vetor pSC-B, o fragmento contendo a sequência de swolenina foi amplificado a partir do DNA plasmidial selecionado como descrito acima e seu tamanho em pb foi confirmado utilizando a enzima de restrição *Eco*RI (Promega). O procedimento

foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. A viabilidade dos fragmentos formados foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL).

4.9.2.7 Repique das colônias positivas, purificação e quantificação do DNA

O repique das colônias positivas foi feito transferindo-se 15 µL de suspensão celular em frascos de polipropileno cilíndricos estéreis previamente identificados contendo 3 mL de meio líquido LB + carbenicilina 50 mg/L. O crescimento das células foi feito a 37°C em shaker com agitação de 100 rpm por 18 horas. Após este período as amostras foram centrifugadas, os sobrenadantes descartados e os pellets armazenados a -20°C até a purificação do DNA.

O DNA foi purificado utilizando o kit Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop). As amostras de DNA plasmidial purificadas foram armazenadas a -20°C.

4.9.2.8 Sequenciamento do DNA plasmidial

As amostras que apresentaram maior concentração de DNA foram enviadas para o sequenciamento do DNA plasmidial. O preparo das amostras foi feito de acordo com o protocolo do laboratório de sequenciamento de DNA da University of York, UK (www.york.ac.uk). Aquelas que apresentaram sequenciamento positivo para swolenina foram estocadas a -20°C para posterior amplificação do DNA.

4.9.3 Clonagem do gene de swolenina de *T. harzianum* no vetor de expressão para *A. niger*

4.9.3.1 Mapa do plasmídeo

O plasmídeo utilizado neste estudo foi *Escherichia coli* pSC-B::*SWO1* derivado dos clones previamente selecionados e sequenciados. O gene de interesse (swolenina) foi clonado neste vetor usando os sítios de restrição únicos *Xba*I (na extremidade 5') e *Hpa*I (na extremidade 3') de modo que a expressão do gene foi conduzida pelo promotor Gla A. A figura 4.8 mostra o mapa físico do plasmídeo pIGF-pyrG-GlaSS utilizado na clonagem do gene de swolenina de *T. harzianum* no vetor de expressão para *A. niger*.

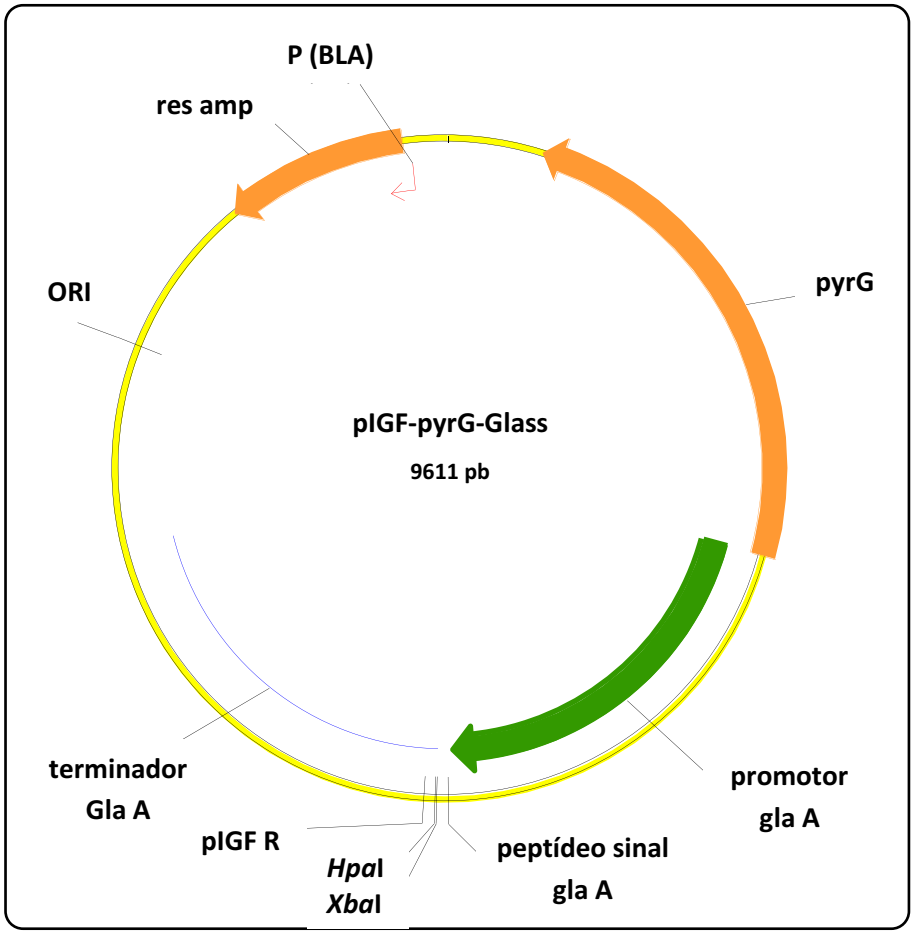


Figura 4.8. Mapa físico do plasmídeo pIGF-pyrG-GlaSS.

Os símbolos do mapa do plasmídeo se referem a:

- ORI: Origem de replicação. Uma sequência de DNA em que a replicação é iniciada no plasmídeo
- res amp: Gene codificante da beta-lactamase (confere resistência à ampicilina)
- P (BLA): Promotor do gene de resistência à ampicilina (gene codificador da beta-lactamase)
- pyrG: Gene codificador da orotidina 5'fosfato decarboxilase de *A. niger* para seleção dos transformantes. Confere crescimento em ausência de uracil/uridina
- promotor glaA: Promotor da sequência da glucoamilase A de *A. niger*
- peptídeo sinal glaA: Sequência codificante do peptídeo de trânsito ou peptídeo sinal para secreção extracelular derivada da glucoamilase A (esta sequência permite que a enzima recombinante seja dirigida ao espaço extracelular, ou seja, secretada no meio de cultura)
- *Hpa* I e *Xba* I: Enzimas de restrição
- pIGF R: Primer
- terminador glaA: Terminador de transcrição do gene glucoamilase A de *A. niger*

4.9.3.2 Amplificação do DNA dos clones positivos, purificação e quantificação

A amplificação do DNA dos clones positivos foi feita por reação de polimerização em cadeia (PCR) em máquina de PCR modelo PTC-200 (MJ Research). Foram utilizados dois tipos de DNA polimerase a fim de avaliar a que melhor se adequaria à produção de DNA. As polimerases avaliadas no PCR foram: *Phusion Hot Start II High Fidelity DNA polymerase* (Finnzymes) e *Expand*

High Fidelity PCR System (Roche). Os procedimentos foram feitos de acordo com os protocolos dos fabricantes. Para a *Phusion Hot Start II High Fidelity DNA polymerase* foram utilizadas as seguintes condições: 98°C /2 min; 35x (98°C/10 seg; 65°C/30 seg; 72°C/ 30 seg); 72°C /5 min; 10°C /10 min. Para a *Expand High Fidelity PCR System* foram utilizadas as seguintes condições: 94°C /2 min; 35x (94°C/15 seg; 55°C/30 seg; 72°C/ 1 min e 30 seg); 72°C /5 min; 10°C /10 min. Os primers 5'→3' utilizados foram 5'SP_SWO_KEX2 (*foward*) e 3'SWO_HIS (*reverse*). As sequências dos primers estão apresentadas no anexo 3. A viabilidade do DNA formado foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL).

Após verificação da viabilidade no gel, o DNA foi purificado utilizando o *QIAquick PCR Purification Kit Protocol* (Qiagen). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O produto de PCR purificado foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop) e armazenado a -20°C.

4.9.3.3 Digestão com enzimas de restrição *Hpa*I and *Xba*I e purificação do fragmento

A digestão do produto de PCR foi realizada utilizando as enzimas de restrição HpaI and XbaI (Promega). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O fragmento da reação (contendo a sequência de swolenina recombinante) foi purificado utilizando o *QIAquick PCR Purification Kit Protocol* (Qiagen). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O fragmento purificado foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop) e estocado a -20°C.

4.9.3.4 Ligação ao vetor e Seleção das colônias recombinantes

A ligação do fragmento ao vetor foi feita utilizando-se a enzima *T4 DNA Ligase* (Thermo Scientific). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Após a ligação, a transformação do fragmento ligado ao vetor foi feita utilizando células termocompetentes *E. coli* XL1 (Agilent Technologies). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Depois, 150 µL de células foram repicados em placas de Petri previamente identificadas contendo meio LB Agar + carbenicilina 50 mg/L. As células de *E. coli* cresceram a 37°C por 18 horas. Foram escolhidas aleatoriamente 20 colônias para amplificação do DNA. As colônias individuais foram coletadas das placas por raspagem utilizando ponteiras estéreis, e cada colônia foi transferida em fluxo laminar para um tubo eppendorf contendo 20 µL de água estéril. As suspensões celulares foram mantidas estéreis em geladeira a 4°C.

4.9.3.5 Amplificação do DNA e avaliação da viabilidade em gel

O DNA do plasmídeo foi purificado utilizando o *kit* Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop). As amostras de DNA purificadas foram armazenadas a -20°C.

O DNA das colônias individuais foi amplificado por reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando o kit *Dream Taq Green DNA Polymerase* (Fermentas Life Sciences). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O PCR foi feito em máquina de PCR modelo PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições: 94°C /3 min; 35x (94°C/30 seg; 54°C/30 seg; 72°C/1 min); 72°C /10 min; 10°C /10 min. Os primers 5'→3' utilizados

foram SEQ_SWO1F (*foward*) e PIGFR (*reverse*). A viabilidade do DNA foi verificada através de corrida em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL). As colônias com produto de PCR com tamanho de pares de base esperado no gel (900 pb) foram selecionadas para posterior digestão com enzimas de restrição *Hpa*I and *Xba*I.

4.9.3.6 Digestão com enzimas de restrição Hpa I and Xba I

A digestão do DNA do plasmídeo foi realizada utilizando as enzimas de restrição *Hpa*I and *Xba*I (Promega). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O fragmento da reação (contendo a sequência de swolenina recombinante ligada ao vetor para expressão heteróloga em *A. niger*) foi purificado utilizando o *QIAquick PCR Purification Kit Protocol* (Qiagen). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O fragmento purificado foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop).

4.9.3.7 Sequenciamento do DNA plasmidial

As amostras positivas, com tamanho de pares de base esperado no gel após análise dos produtos de PCR e fragmentos de restrição, foram enviadas para o sequenciamento do DNA plasmidial. O preparo das amostras foi feito de acordo com o protocolo do laboratório de sequenciamento de DNA da University of York, UK (www.york.ac.uk). Aquelas que apresentaram sequenciamento positivo para swolenina foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação do DNA.

4.9.3.8 Estoque das colônias dos plasmídeos positivos em placas

As colônias bacterianas contendo os plasmídeo pIGF-pyrG-GlaSS e a sequência completa do gene *SWO1*, conforme verificado por sequenciamento de DNA, foram repicados em placa de Petri previamente identificada contendo meio LB Agar + carbenicilina 50 mg/L. O crescimento das células foi feito em estufa a 37°C durante 18 horas. O estoque foi mantido em geladeira a 4°C.

4.9.3.9 Repique e Purificação do DNA do plasmídeo positivo

Paralelamente ao repique de estoque em placas das colônias positivas, foi feito um repique para a purificação do DNA para posterior aplicação na transformação de *A. niger*.

Foi escolhida a colônia que apresentou melhor resultado no sequenciamento do DNA. O repique da colônia positiva foi feito transferindo-se 15 µL de suspensão celular em frascos de polipropileno cilíndricos estéreis previamente identificados contendo 25 mL de meio líquido LB + carbenicilina 50 mg/L. O crescimento das células foi feito a 37°C em shaker com agitação de 100 rpm por 18 horas.

Após este período a amostra foi centrifugada, e o sobrenadante descartado. O DNA do plasmídeo foi purificado utilizando o *kit* Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) em 5 minipreps eluídos em 100 µL cada. O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida o DNA dos 5 minipreps (500 µL) foi combinado em 1 tubo estéril, para possibilitar a concentração do DNA plasmidial para posterior transformação em *A. niger*. Adicionou-se 50 µL de NaCl 5M e 1 mL de etanol 100% e homogeneizou-se. A amostra foi mantida a -20°C por 1 hora. Depois foi centrigugada a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. A

amostra foi lavada com 1 mL de etanol 70%, centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 50 µL de água. O DNA concentrado foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop). Verificou-se se havia a concentração adequada para a transformação de *A. niger* (>1 µg/µL). As amostras purificadas de DNA plasmidial foram armazenadas a -20°C.

4.9.4 Transformação: Inserção do DNA de *T. harzianum* em *A. niger*

4.9.4.1 Crescimento de *A. niger* para transformação

Esporos de *A. niger* para transformação (2 x 10^6 esporos/mL) foram repicados em 200 mL de meio líquido MN + uridina em frascos erlenmeyer de 2 L a 30°C, 200 rpm por 20 horas.

4.9.4.2 Filtração do micélio

O micélio foi filtrado em membrana *Miracloth* estéril. Foram pesados aproximadamente 5 gramas de biomassa fúngica e ressuspendidos em 25 mL de MM *buffer*.

4.9.4.3 Extração do protoplasto de *A. niger* para transformação

O protoplasto foi extraído através da digestão do micélio com enzimas de acordo com a metodologia descrita por Bekker et al. (2009).

As etapas da digestão enzimática da parede celular do micélio foram fotografadas em microscópio óptico Eclipse E600 (Nikon).

4.9.4.4 Transformação de *A. niger*

A transformação foi feita adicionando-se o DNA purificado do plasmídeo ao protoplasto extraído de *A. niger*, de acordo com a metodologia descrita por Punt & van den Hondel (1992).

Foram feitas 16 combinações de protoplasto mais DNA a fim de maximizar a probabilidade de obter-se fungos transformantes.

4.9.4.5 Crescimento do fungo *A. niger* transformante em placa

O fungo transformante foi repicado em placas de Petri contendo meio seletivo AMMN com sorbitol (composição do meio no Anexo 1). O crescimento do microrganismo foi feito a 30°C em estufa por 3 dias.

4.9.4.6 Crescimento do fungo *A. niger* transformante em tubos inclinados

Após crescimento em placa, foram feitos 3 repiques consecutivos em tubos inclinados contendo meio AMMN a 30°C em estufa por 3 dias (cada repique).

4.9.4.7 Crescimento do fungo *A. niger* transformante para extração do DNA e RNA

Para a extração do DNA e RNA do fungo transformante foi feito repique em microplaca estéril de espectrofotômetro de 96 poços de 250 µL. Em cada poço foram adicionados 200 µL de meio líquido YPD e cada um dos 16 fungos transformantes foi repicado em duplicata com auxílio de alças estéreis. A placa foi fechada com tampa e fita macroporo. O crescimento dos fungos foi feito em a 30°C em estufa por 2 dias. Em seguida a placa foi armazenada em geladeira a

4°C até extração do DNA e RNA. Os pellets formados no crescimento em placa foram utilizados para a extração do DNA e RNA.

4.9.4.8 Extração do DNA do fungo *A. niger* transformante

A extração do DNA dos pellets formados no crescimento de *A. niger* em placa foi feita utilizando o kit *BioSprint Plant DNA* (Qiagen). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA purificado foi mantido em gelo e quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop). Posteriormente as amostras foram armazenadas a -80°C.

4.9.4.9 Amplificação do DNA e avaliação da viabilidade em gel

O DNA dos 16 transformantes foi amplificado por reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando o kit *Dream Taq Green DNA Polymerase* (Fermentas Life Sciences). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. O PCR foi feito em máquina de PCR modelo PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições: 94°C /5 min; 30x (94°C/30 s; 54°C/30 s; 72°C/1 min e 30 s); 72°C /10 min; 4°C /10 min. Os primers 5'→3' utilizados foram SEQ_SWO1F (*foward*) e PIGFR (*reverse*). A presença do gene recombinante *SWO1* do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL). Os transformantes com produto de PCR com tamanho de pares de base esperado no gel (900 pb) foram selecionados para posterior avaliação do RNA.

4.9.4.10 Extração do RNA do fungo *A. niger* transformante e Avaliação da integridade em gel

O RNA dos pellets formados no crescimento de *A. niger* em microplaca foi extraído usando o kit *Total RNA Purification Plus* (Norgen Biotek Corporation). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Foram selecionados apenas os 8 transformantes com a inserção do gene *SWO1*, de acordo com o gel dos produtos de PCR. O RNA purificado foi mantido em gelo e quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop). Posteriormente as amostras foram armazenadas a -80°C.

A integridade/pureza do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL).

O RNA foi tratado com DNAse de modo a eliminar qualquer contaminação com DNA genômico da amostra de RNA.

O tratamento com DNase foi feito adicionando-se os seguintes componentes: 1 µL de *10x buffer* (Promega), 1 µL de *RQ1 DNAse* (Promega), 1 µg de RNA total de *Aspergillus* e 5 µL de água (total de 8 µL). A incubação foi conduzida a 37°C por 30min. Em seguida adicionou-se 1 µL de *stop buffer* (Promega) e as amostras foram mantidas a 65°C por 15min. O RNA foi mantido a -80°C até a síntese de cDNA.

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita de acordo com o seguinte protocolo, usando um primer para a cauda de poli(A) do mRNA (oligo dT) e a enzima transcriptase reversa SuperScriptII RT (Invitrogen): 1 µL de oligo dT Invitrogen 100 µM (MW 4500), 10 µL de *DNAsed* RNA (1 µg), 1 µL de dNTP 10 mM (Total 12 µL). A incubação foi conduzida a 65°C por 5 min em máquina de PCR , seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 13.000 rpm por 1 min.

Posteriormente foi realizado o tratamento com RNAse. Misturou-se os seguintes componentes: 160 µL de *First Strand buffer* 5x (Invitrogen), 80 µL de

0,1M DTT e 40 µL de RNAseOUT (40 µg/µL). Dessa mistura foram adicionados 7 µl em cada amostra. A incubação foi conduzida a 42 °C por 2 min em máquina de PCR. Adicionou-se 1 µL de SuperScriptII RT (Invitrogen). A incubação foi realizada a 42°C durante 50 min, seguida de inativação por aquecimento a 70°C durante 15 min em máquina de PCR. Diluiu-se a 100 µL em água (através da adição de 80 µL de água).

4.9.4.11 Produção de cDNA e avaliação da viabilidade em gel

O cDNA dos 8 transformantes que apresentaram RNA de alta qualidade foi produzido por reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando o kit *Dream Taq Green DNA Polymerase* (Fermentas Life Sciences). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante.

A presença de transcritos do gene *SWO1* foi testada por meio de PCR usando primers gene-específicos. O PCR foi feito em máquina de PCR modelo PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições: 94°C /5 min; 30x (94°C/30 seg; 54°C/30 seg; 72°C/1 min e 30 seg); 72°C /10 min; 4°C /10 min. Os primers 5'→3' utilizados foram SEQ_SWO1F (*foward*) e PIGFR (*reverse*). Foi feito um controle positivo com primers de Ubiquitina. O primer SEQ teve como alvo a sequência de swolenina de *T. harzianum* presente no DNA de *A. niger* recombinante, enquanto que o primer PIGFR anela na regiao 3' downstream ao gene *SWO1.* Os primers para UBIQUITIN foram utilizados como controle da eficiência de transcrição reversa, pois o gene codificador de ubiquitina é transcrito constitutivamente no sistema de *A. niger* utilizado.

A presenca dos produtos de PCR foi verificada através de corrida em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A fluorescência das amostras foi obtida por adição de brometo de etídio (concentração final em solução de 0,5 µg/µL). Os

transformantes com produto de PCR com tamanho de pares de base esperado no gel (positivos) (900 pb) foram selecionados para posterior repique e análise de *Western blot*.

4.9.4.12 Estoque de *A. niger* transformante

Os transformantes positivos foram cultivados em tubos inclinados contendo meio AMMN. O procedimento foi realizado em fluxo laminar. O crescimento dos fungos foi feito em a 30°C em estufa por 2 dias.

Depois desse período, a lavagem dos esporos foi feita adicionando-se 5 mL de Tween 20 0,1% (v/v) sobre os esporos em cada tubo, os frascos foram homogeneizados e as amostras foram transferidas para tubos falcon estéreis. As amostras, então, foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram descartados. O procedimento foi repetido. Foram mantidos 2 mL de Tween 20 0,1% (v/v) em cada falcon. As amostras foram transferidas para tubos estéreis de polipropileno de tampa rosqueada e estocados em geladeira a 4°C.

4.9.5 Avaliação de diferentes condições de cultivo de *A. niger* transformante em meio de fermentação

Foram avaliadas 96 condições para a produção da swolenina recombinante: 3 temperaturas (20, 25 e 30 °C), 8 transformantes e 4 dias.

Inicialmente foi feito um pré-inóculo de 1 x 10^6 esporos/mL (previamente contados em câmara de Neubauer) em 20 mL de meio CLS (composição do meio no Anexo 1) a 30°C, 170 rpm por 18 horas para cada um dos 8 transformantes positivos na análise do cDNA.

O inóculo de cada transformante foi feito transferindo-se 1% de pré-inóculo (2 mL) para frascos erlenmeyer previamente identificados contendo 200 mL de meio de fermentação modificado (composição do meio no Anexo 1). O procedimento foi conduzido em diferentes shakers com as respectivas temperaturas (20, 25 e 30 ^{o}C), a 150 rpm por 4 dias. Alíquotas de 1 mL foram retiradas assepticamente de cada frasco nos diferentes dias e transferidas para tubos eppendorf para avaliação (detecção) da produção da swolenina recombinante. Logo após a retirada das alíquotas, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes refrigerados a 4°C.

4.9.5.1 *Dot blot* e *Western blot* das diferentes condições de cultivo avaliadas

O *dot blot* das 96 condições avaliadas foi feito em membrana de nitrocelulose (Thermo Scientific) adicionando-se 100 µL das respectivas amostras em cada poço da placa de *dot blot*. As posições das amostras nos poços foram identificadas. O escoamento das amostras foi feita por leve pressão com o auxílio de uma bomba de vácuo. Em seguida a membrana foi corada com corante de Ponceau (0,1% m/m em ácido acético 5% v/v) em placa de polipropileno, homogeneizada em shaker de placas a 40 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e lavada com água milli-Q. Os pontos onde havia proteínas em geral produzidas pelo fungo foram visualizados em coloração vermelha.

Para confirmar as condições em que houve a produção da swolenina recombinante, foi feito o *Western blot* da mesma membrana. Primeiramente a membrana com os pontos corados em vermelho foi lavada com tampão TBST 1x (composição do meio no Anexo 1) por agitação em shaker de placas a 40 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a remoção do corante o

tampão foi descartado. Foram adicionados 30 mL de solução bloqueadora (leite desnatado 5% m/v em TBST). A amostra foi mantida a 4°C em shaker de placas a 40 rpm por 18 horas. Em seguida a solução bloqueadora foi descartada. A swolenina recombinante foi então testada com exposição à anti-his 30 s. Foram adicionados 20 mL de solução leite 5% m/v em TBST + 4 µL de anticorpo monoclonal α-Histidina (Sigma) (previamente misturados). A placa com a membrana permaneceu sob agitação em shaker de placas a 40 rpm por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBST 1x por agitação em shaker de placas a 40 rpm por 5 minutos (cada vez) à temperatura ambiente. O tampão foi descartado. Adicionou-se 1 mL de cada componente do kit de solução reveladora (SuperSignal West Pico Chemiluminescente subtrate, Thermo Scientific) previamente misturados sobre a membrana. O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Após a reação a membrana foi revelada em filme (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) em câmara escura.

O kit de solução reveladora é composto por duas soluções: solução de peróxido e luminol (solução intensificadora). A peroxidase catalisa a oxidação do luminol em um reagente que emite luz quando este se decompõe. A peroxidase, por sua vez, está ligada à proteína de interesse na membrana através do anticorpo secundário. Assim, quando revelada, a proteína de interesse gera uma banda no filme. A reação produz fluorescência proporcionalmente à quantidade de proteína. No presente estudo, como anticorpo primário foi utilizada α-Histidina que se liga à cauda de histidina presente na proteína recombinante. Dessa forma, os pontos onde havia a swolenina recombinante, ou onde havia a amostra de controle positivo, apresentavam fluorescência na revelação.

4.9.5.2 Purificação da swolenina por FPLC (*Fast protein liquid chromatography*)

Para a produção da swolenina recombinante e purificação por FPLC foi escolhido o transformante positivo que apresentou a banda mais intensa de swolenina recombinante na anáise de *Western blot* (transformante 10).

O pré-inóculo para a produção desta proteína foi feito de acordo com o item 4.10.5. O inóculo foi feito transferindo-se 1% de pré-inóculo (2 mL) para frascos erlenmeyer previamente identificados contendo 200 mL de meio de fermentação modificado. Foram feitas 4 réplicas, totalizando 800 mL. O procedimento foi conduzido a 20°C em shaker a 150 rpm por 3 dias. O micélio foi filtrado em membrana *Miracloth* estéril e o sobrenadante foi refrigerado a 4°C. Posteriormente o sobrenadante contendo a swolenina recombinante foi concentrado 10 vezes a 4°C em câmara fria usando uma coluna de ultrafiltração de membranas de fibras ocas de tamanho de corte de 10 kDa (modelo QuixStand, GE Healthcare). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Depois de concentrada, a amostra foi processada como descrito a seguir: centrifugada a 1000 x g em uma centríguga *Multifuge 3SR Heraeus* (Thermo Scientific Sorvall). A velocidade baixa foi usada como uma precaução para previnir a precipitação da proteína recombinante. O sobrenandante foi recuperado e filtrado em uma membrana de polietersulfona (PES) hidrofílica *Millipore Express PLUS*, de porosidade 0,45 µm, 47 mm, acoplada ao vácuo.

A purificação da swolenina recombinante foi feita por cromatografia de afinidade em equipamento FPLC *AKTA Purifier* (GE) (Figura 4.9).

A amostra (50 mL) foi tamponada com um tampão de corrida pH 8,0 consistindo de 0,1 M de TRIS-HCl, 0,3 M de cloreto de sódio (NaCl) e 0,1% de

Tween 20. A amostra tamponada foi carregada em coluna *Níquel-Sepharose 6 Fast Flow* 1 mL (GE Healthcare) a 120 cm/h. A swolenina ligada foi eluída com o tampão de corrida acima mencionado, contendo 0,50 M de imidazol. A amostra foi coletada em frações em *rack* de polipropileno de 96 poços, e mantida refrigerada a 4°C.

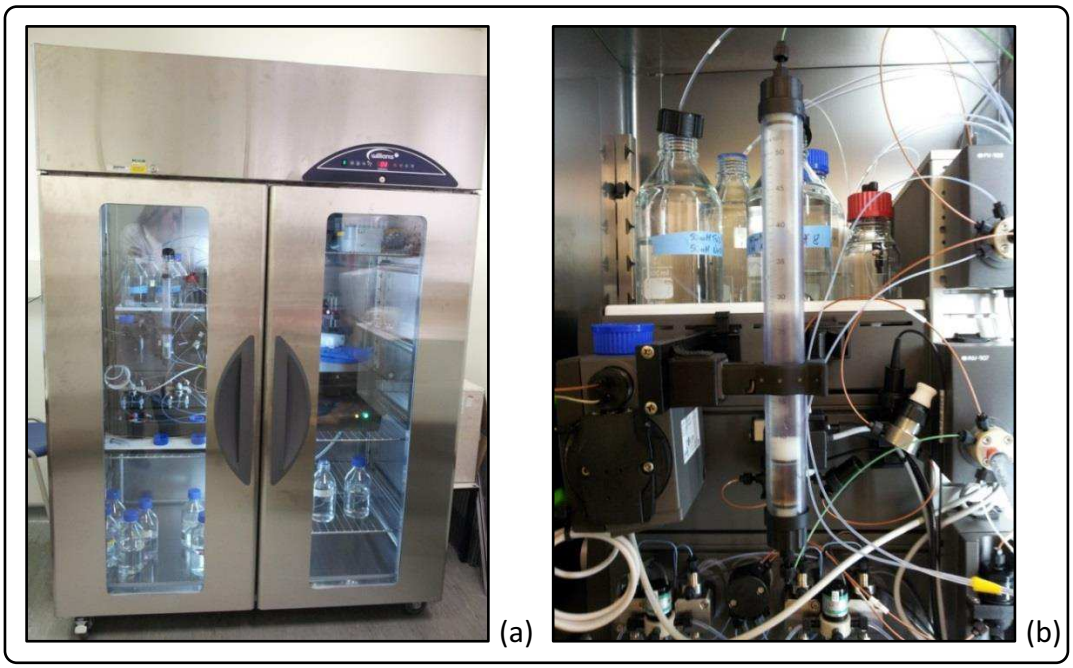


Figura 4.9. Equipamento de FPLC (a) e coluna contendo amostra para purificação (b).

4.9.5.3 SDS-PAGE, Corante de Glicosilação e *Western blot* da swolenina

A corrida de proteínas foi feita por eletroforese SDS-PAGE a 180 volts durante 40 minutos utilizando gel pronto *12% Mini-Protean® TGX™* Gel 12 poços 20 µL #456-1045 (Bio-Rad). O volume de amostra em cada canaleta foi de 20 µL. A visualização das bandas ocorreu por adição de Comassie blue (Thermo Scientific).

O teste de glicosilação foi feito em outro gel em condições similares, utilizando o kit *Pierce™Glycoprotein Staining* (Thermo Scientific). O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Esse kit

detecta porções de açúcar de glicoproteínas em géis de poliacrilamida e em membranas de nitrocelulose. Quando tratado com o reagente oxidante, glicóis presentes em glicoproteínas são oxidados em aldeídos. Após concluir o procedimento, os glicóis são corados, produzindo bandas com coloração rosa.

O *Western blot* foi testado com exposição à anti-his 30 s de acordo com a metodologia descrita no item 4.9.5.1. A transferência das bandas do gel para a membrana de nitrocelulose foi feita em um *Protein Blotting Equipment* (Bio-Rad) com uma corrente de 25 volts por 20 minutos.

Foram avaliadas as seguintes condições no gel: frações de swolenina eluídas por FPLC, sobrenadante da cultura concentrado, sobrenadante da cultura concentrado e centrifugado a 1000 g, não-retido na coluna de níquel, e lavado da coluna de níquel.

4.9.5.4 Quantificação da swolenina purificada por FPLC

As frações referentes ao pico de swolenina purificada no FPLC foram unidas em um frasco estéril. A quantificação da proteína foi feita por método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.9.5.5 Similaridade da sequência da swolenina de *T. harzianum* e *T. reesei*

A similaridade da sequência de swolenina de *T. harzianum* e *T. reesei* foi avaliada utilizando o programa *Vector NTI version 11* (Invitrogen). Este programa usa a *score matrix Blosum62MT2* com os seguintes parâmetros: *gap opening penalty 10; gap extension penalty 0.05; gap separation penalty 8*.

Capítulo 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição do bagaço de cana e celulignina

A biomassa lignocelulósica é primariamente constituída de celulose (40-50%), hemicelulose (25-35%) e lignina (7-29%) (SUN et al., 2004). Para tornar possível o uso da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol e outras substâncias pela plataforma bioquímica, é necessário desorganizar sua estrutura por pré-tratamento, e dessa forma fracionar seus principais componentes (BARCELOS et al. , 2012).

Nos pré-tratamentos ácido e alcalino a desorganização do complexo lignocelulósico ocorre pela remoção (parcial) dos componentes hemicelulose e lignina, respectivamente, tornando a celulose mais acessível e amorfa. A celulose amorfa possui maior área superfícial e é mais suscetível para a atuação das celulases, uma vez que não possui tantas ligações de hidrogênio intermoleculares quanto às regiões cristalinas, e isto contribui para a sacarificação enzimática (SUN & CHENG, 2002; ARANTES & SADLER, 2010).

A lignina, além de constituir uma barreira física dificultando o acesso às fibras de celulose através da associação lignina-celulose naturalmente ocorrente, pode formar ligações improdutivas com celulases, diminuindo a eficiência de hidrólise (ARANTES & SADLER, 2010; KAYA *et al*., 2000). Dessa forma, a retirada desta fração da estrutura da lignocelulose, ainda que parcialmente, é necessária para a atuação das enzimas.

No presente estudo, foi possível fracionar os constituintes da fibra do bagaço de cana através de pré-tratamentos ácido e alcalino. Houve um aumento da proporção de celulose (de 35,2% para 68,4%), e uma redução do teor da hemicelulose e lignina (de 28,8% para 12,6% e de 18,9% para 8,9%, respectivamente), como mostra a figura 5.1.

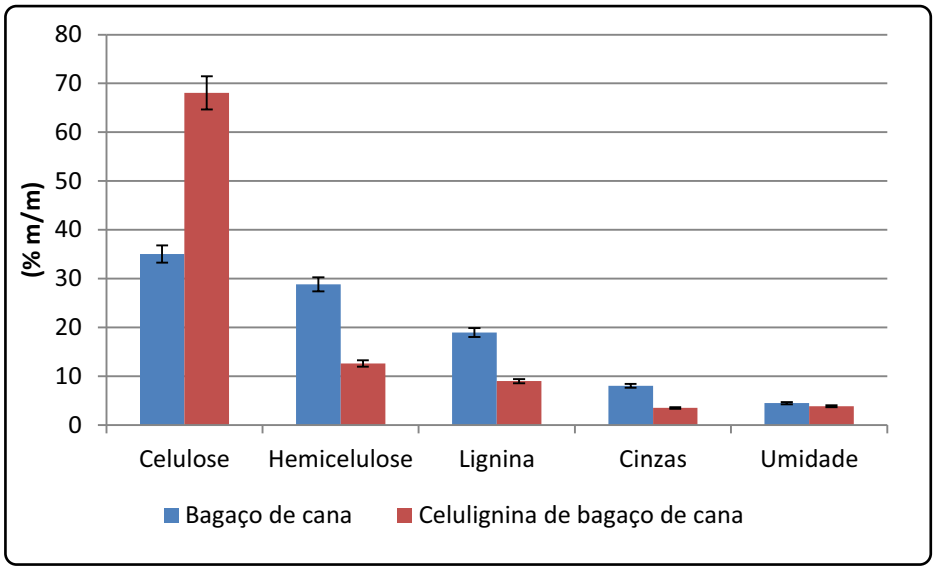


Figura 5.1. Composição do bagaço de cana e da celulignina parcialmente deslignificada (CPD) proveniente de pré-tratamentos ácido e alcalino.

5.2 Microscopia eletrônica de varredura da fibra lignocelulósica de bagaço de cana

A fibra do bagaço de cana *in natura*, e após os pré-tratamentos ácido e

alcalino foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura, revelando diferentes aspectos estruturais causados pelos pré-tratamentos. O aspecto da fibra nos diferentes estágios pode ser visualizada na figura 5.2.

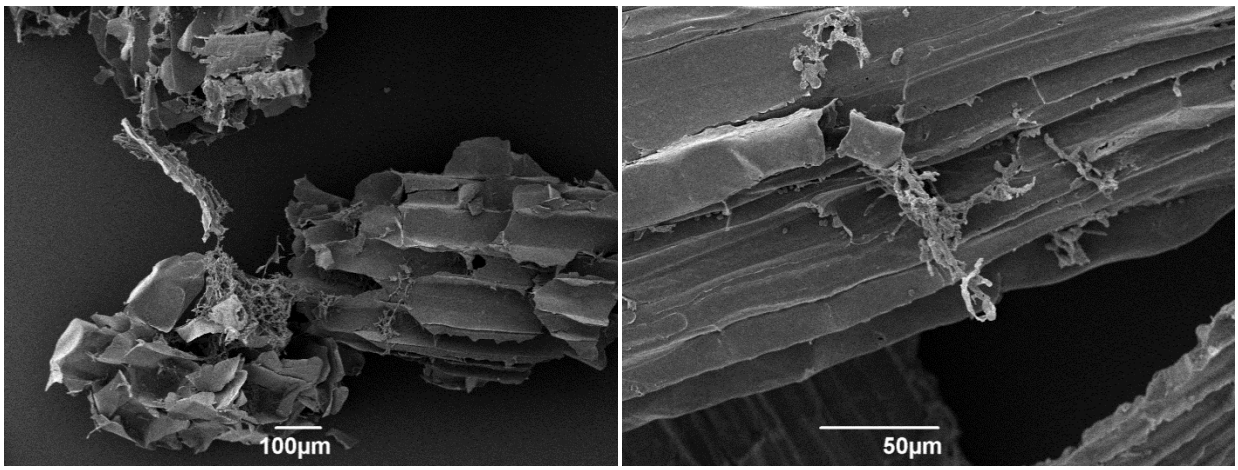
A primeira imagem refere-se ao bagaço de cana *in natura*. Através da microscopia, pode-se observar o aspecto íntegro da fibra dessa biomassa lignocelulósica, composta principalmente por celulose e hemicelulose envolvidas por lignina, que confere rigidez à parede celular. Neste estágio, o bagaço possui estrutura fibrosa e coloração parda, gerada pela presença da lignina.

Já após pré-tratamento ácido, a fibra apresentou estrutura mais desorganizada que o bagaço de cana *in natura*, como mostra a imagem, devido à remoção da hemicelulose.

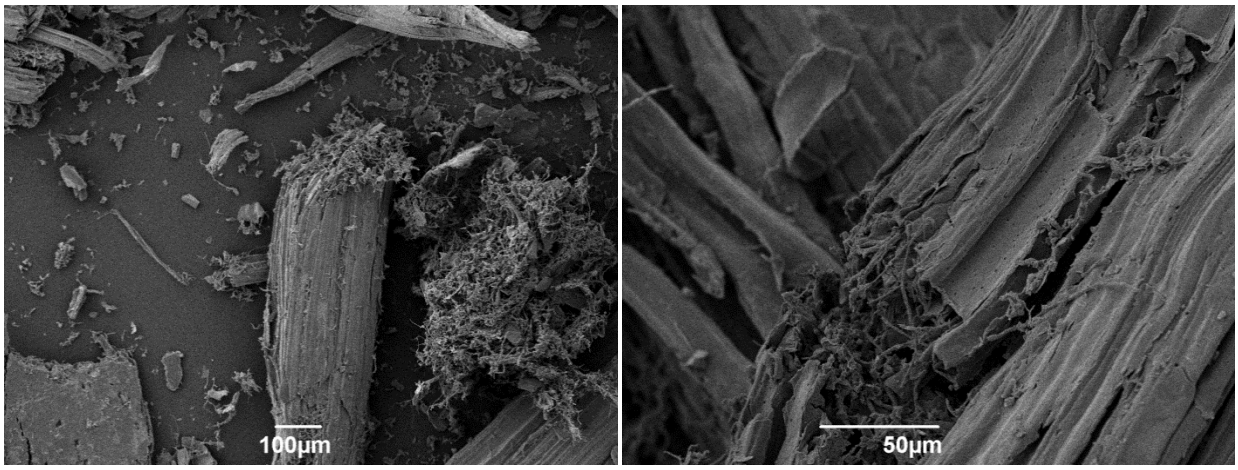
Corroborando com os resultados de composição do bagaço de cana e celulignina (item 5.1) que evidenciaram a deslignificação do bagaço de cana, as imagens de microscopia da fibra lignocelulósica de bagaço de cana após pré-tratamentos ácido e alcalino mostrou o aspecto mais amorfo da fibra. Esta etapa é caracterizada pela remoção da lignina. Portanto, há o aumento da proporção de celulose em relação aos demais constituintes, hemicelulose e lignina, que foram removidos, mesmo que de forma parcial. Deste modo, a celulose torna-se mais exposta e mais amorfa.

O bagaço de cana pré-tratado por métodos ácido e alcalino, denominado celulignina parcialmente deslignificada (CPD) foi utilizado para a realização dos experimentos do presente trabalho, tanto para a produção de celulases, quanto para a hidrólise enzimática.

Bagaço de cana *in natura*



Bagaço de cana após pré-tratamento ácido



Bagaço de cana após pré-tratamentos ácido e alcalino

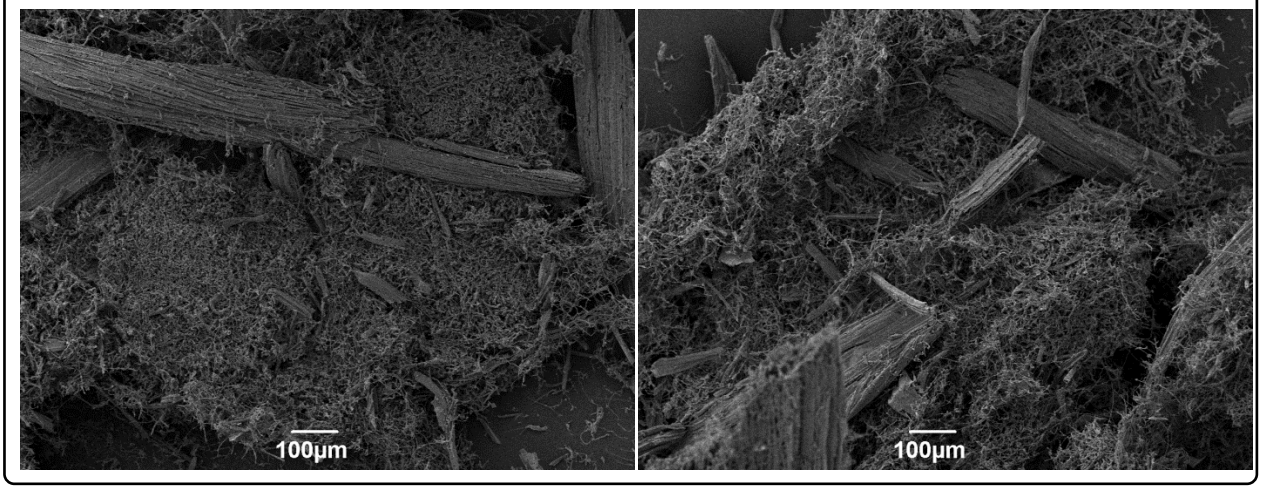


Figura 5.2. Microscopia eletrônica de varredura da fibra lignocelulósica de bagaço de cana *in natura*, após pré-tratamento ácido, e após pré-tratamentos ácido e alcalino.

5.3 Produção de celulases

5.3.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de celulases por *T. harzianum* para potencializar a produção de tais enzimas. Para tanto, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR). As faixas de estudo utilizadas foram baseadas nos resultados prévios de Rocha (2010).

Os valores das variáveis de resposta dos 17 ensaios do DCCR podem ser observados na tabela 5.1. Nota-se que a atividade FPase variou de 79,0 U/L a 459,6 U/L; a atividade CMCase esteve entre 2.011,3 U/L e 13.475,3 U/L; enquanto a atividade β-glucosidase foi de 51,1 U/L a 485,2 U/L. De modo geral os maiores valores das atividades de celulases estiveram nas proximidades do ponto central (ensaios 15, 16 e 17), o que indica que as condições avaliadas estavam na faixa ótima deste bioprocesso.

Dentre os nutrientes avaliados, foi constatada a essenciabilidade da uréia no meio de cultivo, uma vez que no ponto axial negativo (ensaio 9) em que não foi adicionado este componente, as atividades enzimáticas foram bastante reduzidas em relação à maioria dos ensaios. Enquanto que no ponto axial positivo de uréia (ensaio 10) houve um aumento considerável das atividades enzimáticas, o que confirma a influência de tal nutriente.

Já o extrato de levedura apresentou menor influência no meio de produção de celulases quando comparado à uréia, visto que no ponto axial positivo (ensaio 12) foram obtidos valores de atividade enzimática levemente superiores ao experimento que houve ausência de extrato de levedura (ensaio 11).

Para o sulfato de amônio, observou-se que as atividades enzimáticas foram notavelmente elevadas no ponto axial positivo deste nutriente (ensaio 14), sinalizando seu efeito benéfico no meio de cultivo.

Quanto às atividades enzimáticas, verifica-se que houve uma maior abundância na produção de CMCase, que é uma característica deste microrganismo, como relatado em outros estudos (AHMED at al., 2009; CASTRO et al., 2010; ROCHA, 2010).

Tabela 5.1. Matriz do Delineamento composto central rotacional (DCCR) e resultados correspondentes das atividades das celulases.

Ensaio	Uréia	Extrato de levedura	Sulfato de Amônio	FPase (U/L)	CMCase (U/L)	β-glucosidase (U/L)
1	-1	-1	-1	288,14	8,041,21	92,59
2	-1	-1	1	331,32	10.126,50	91,22
3	-1	1	-1	384,99	10.845,57	150,89
4	-1	1	1	409,67	11.821,45	262,00
5	1	-1	-1	296,47	10.455,22	184,50
6	1	-1	1	363,40	11.708,45	294,92
7	1	1	-1	105,86	6.705,80	2,06
8	1	1	1	456,86	13.321,21	409,12
9	-1,68	0	0	79,02	2.011,33	51,10
10	1,68	0	0	403,19	11.893,35	273,66
11	0	-1,68	0	312,51	11.246,19	207,48
12	0	1,68	0	331,63	12.283,70	332,99
13	0	0	-1,68	393,01	11.872,81	193,04
14	0	0	1,68	454,39	12.766,50	485,25
15 (C)	0	0	0	450,38	13.454,75	420,78
16 (C)	0	0	0	459,63	13.352,03	416,32
17 (C)	0	0	0	452,54	13.475,30	427,64

As tabelas 5.2, 5.3 e 5.4 apresentam a análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos, considerando somente os termos estatisticamente significativos. Observa-se que o valor de Fcalc foi maior que o valor de Ftab para as três atividades enzimáticas, indicando que os modelos são adequados para descrever o processo. O p-valor apresentou alta significância, revelando a robustez dos resultados (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Tabela 5.2. Análise de variância (ANOVA) para a atividade FPase.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F cal	F tab (10%)	p-valor
Regressão	211828,8	9	23536,5	4,98	2,72	0,0147
Resíduos	33055,2	7	4722,2			
TOTAL	244884,0	16				

*Fcal: valor de Fisher calculado; Ftab: valor de Fisher tabelado

Tabela 5.3. Análise de variância (ANOVA) para a atividade CMCase.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F cal	F tab (10%)	p-valor
Regressão	149785796,4	9	16642866,3	6,42	2,72	0,0064
Resíduos	18144540,0	7	2592077,1			
TOTAL	167930336	16				

*Fcal: valor de Fisher calculado; Ftab: valor de Fisher tabelado

Tabela 5.4. Análise de variância (ANOVA) para a atividade beta-glucosidase.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F cal	F tab (10%)	p-valor
Regressão	281970,3	9	31330,0	26,12	2,72	0,0001
Resíduos	8397,6	7	1199,7			
TOTAL	290367,9	16				

*Fcal: valor de Fisher calculado; Ftab: valor de Fisher tabelado

Os modelos matemáticos preditivos, obtidos pelo Statistica 6,0, que representam a produção de celulases nas condições experimentais deste estudo são descritos a seguir. Os parâmetros não significativos foram retirados dos modelos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Atividade FPase = 420,2 + 44,9 Ur - 65,2 Ur^2 - 54,2 EL^2 + 59,8 SA - 46,5 Ur x EL

Atividade CMCase = 12.431,5 + 1.682,3 Ur -2.100,2 Ur^2 + -752,2 EL^2 + 1.376,3 SA

Atividade β -glucosidase = 424,2 + 61,5 Ur - 100,5 Ur^2 + 39,8 EL - 62,4 EL^2 + 69,3 SA - 38,0 SA^2 + 29,5 Ur x SA + 29,6 EL x SA

onde: Ur = uréia; EL = extrato de levedura; SA = sulfato de amônio.

Por meio dos gráficos de superfície de resposta verifica-se os perfis dos resultados otimizados para as 3 variáveis de resposta: FPase, CMCase e β-glucosidase.

Estes perfis corroboram a forte influência da uréia e sulfato de amônio na produção de celulases por *T. harzianum* IOC 3844 (Figura 5.3). É notório que a região ótima, com os maiores valores de atividade enzimática estiveram na área do ponto central, tanto para FPase, CMCase e β-glucosidase. Ao passo que no ponto axial negativo (-1,68), por exemplo, em que avaliou-se a ausência destes nutrientes, os valores de atividade enzimática foram consideravelmente menores.

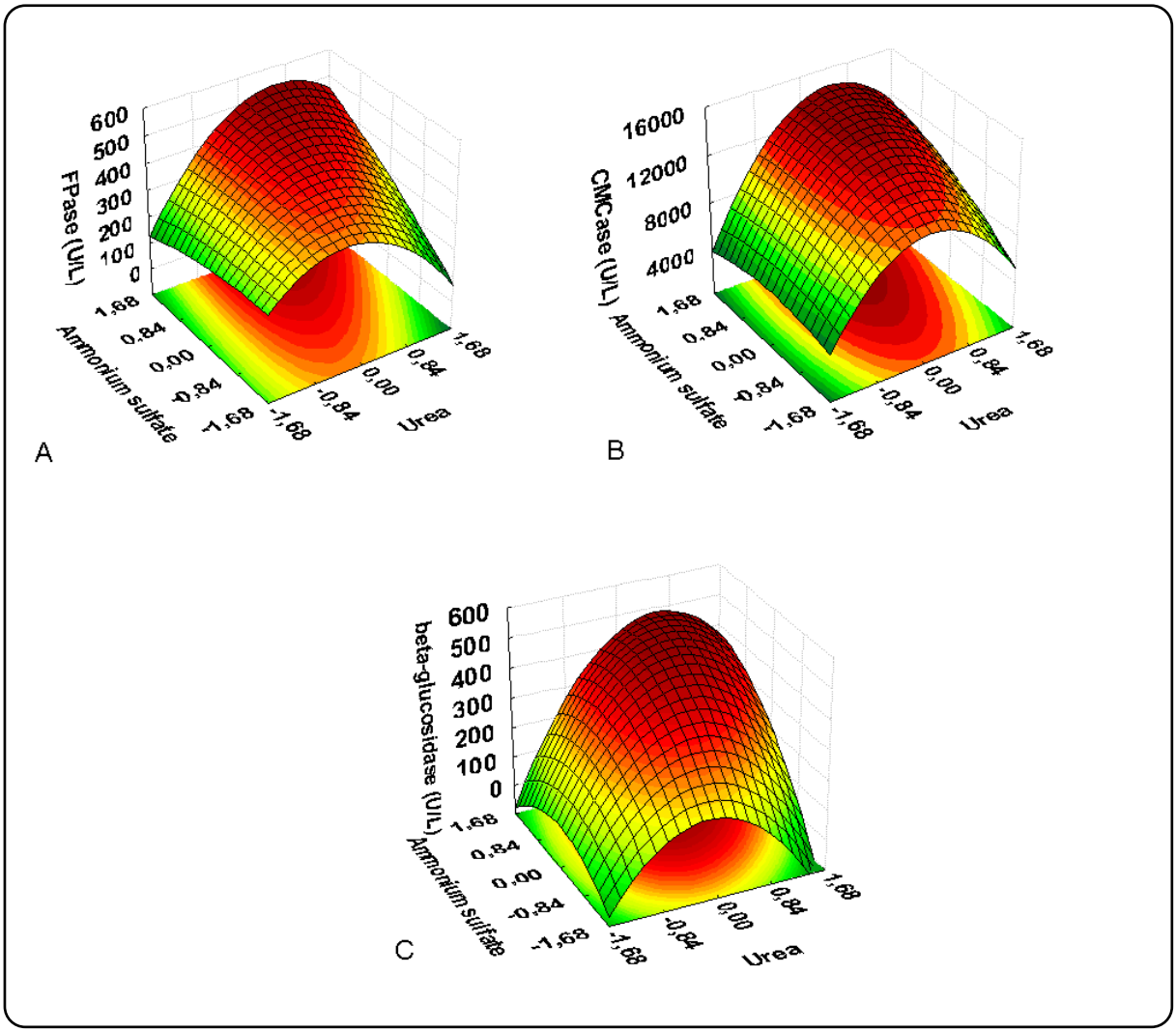


Figura 5.3. Superfície de resposta da produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtida no Delineamento composto central rotacional (DCCR) (fonte de carbono: celulignina parcialmente deslignificada ; temperatura: 30°C; agitação: 200 rpm). Valores codificados de uréia e sulfato de amônio.

5.3.2 Otimização da produção de celulases através da função *Desirability* e validação experimental

O valor *Desirability* para atingir simultaneamente a condição ótima para as três atividades enzimáticas foi de 1.00, o que significa que a otimização por esta função utilizou o valor máximo obtido para cada variável de resposta. De acordo com esta função, as concentrações ótimas preditas de nutrientes foram

as seguintes: uréia (2,24 g/L), extrato de levedura (1,14 g/L) e sulfato de amônio (3,42 g/L). Estas condições foram validadas por testes em frascos Erlenmeyers com os outros nutrientes mantidos nas mesmas concentrações descritas na metodologia. As atividades CMCase e FPase estiveram na margem de confiança de 90%, enquanto que o valor da atividade β-glucosidase foi ligeiramente mais elevado. A Tabela 5.5 mostra as atividades celulásicas previstas e obtidas experimentalmente na validação experimental.

Tabela 5.5. Atividades celulásicas previstas e obtidas experimentalmente na validação experimental.

	FPase (U/L)	**CMCase (U/L)**	**β-glucosidase (U/L)**
Prevista	509,1	14.446,1	494,7
Obtida	486,8	13.094,0	637,0

A composição ótima final do meio de produção de celulases por *T. harzianum* IOC 3844 é apresentada na tabela 5.6.

Tabela 5.6. Composição ótima do meio de produção de celulases por *T. harzianum* IOC 3844.

	Componente	**Concentração**
g/L	Celulignina	15,0
	Uréia	2,24
	Extrato de levedura	1,14
	$(NH_4)_2SO_4$	3,42
	KH_2PO_4	2,0
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,4
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3
mg/L	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5,0
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1,6
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,4
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2,0

5.3.3 Perfil da produção de celulases em biorreator instrumentado

As condições validadas experimentalmente em frascos foram, então, reproduzidas em biorreator. As condições de cultivo em biorreator instrumentado, em que há o efeito da oxigenação e controle de pH, seguramente levaram ao aumento expressivo das atividades enzimáticas quando comparado com os experimentos em frascos agitados. O fungo filamentoso *T. harzianum* IOC 3844 foi capaz de produzir celulases com elevadas atividades em biorreator contendo meio de cultivo nas condições otimizadas. Em apenas 42 horas de fermentação foram atingidas as seguintes atividades enzimáticas: CMCase, 27.017,6 U/L; FPase, 1.225,9 U/L; β-glucosidase, 609,4 U/L; e avicelase 577,0 U/L. O perfil cinético da produção de celulases em biorreator é apresentado na figura 5.4.

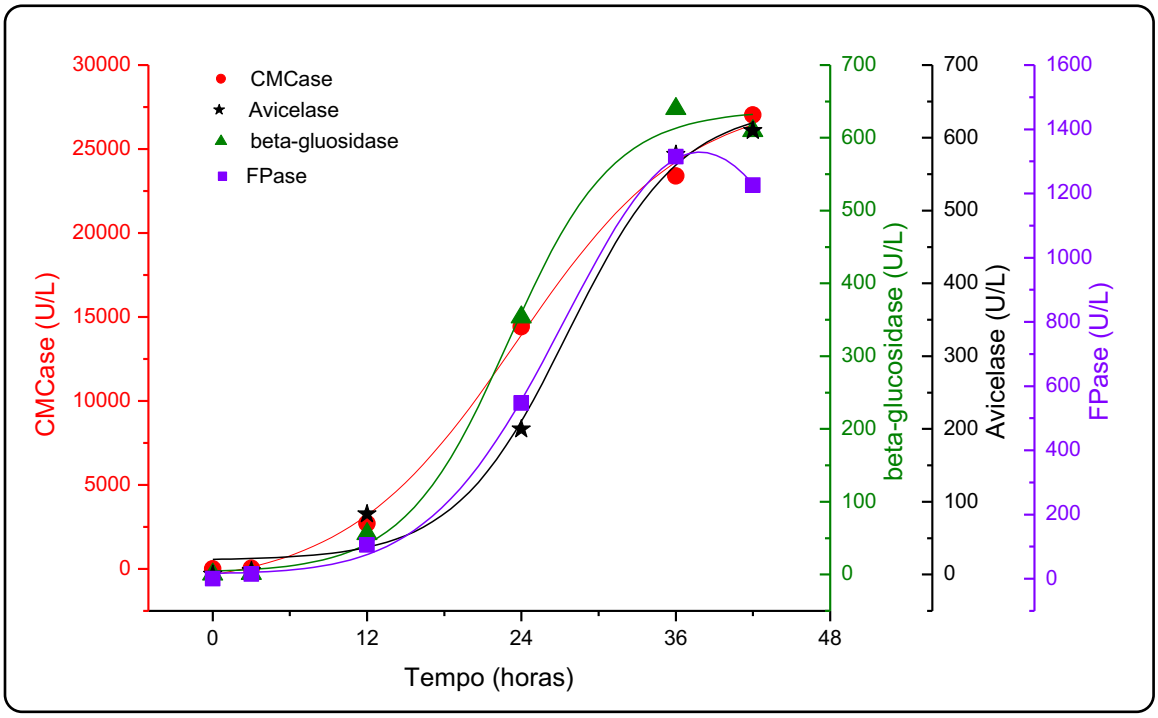


Figura 5.4. Perfil cinético da produção de celulases em biorreator instrumentado contendo meio otimizado (fonte de carbono: celulignina parcialmente deslignificada 15 g/L; temperatura 30°C; agitação 200 rpm; pH 5,0; oxigênio dissolvido (OD) 10% de saturação).

Os resultados de atividades celulásicas obtidas através da produção em meio de cultivo otimizado em biorretor, no presente estudo, foram consideravelmente maiores que os de outros trabalhos. As atividades CMCase e FPase foram, respectivamente, 4 e 7 vezes maiores em relação aos resultados obtidos usando o meio de Mandels e Weber (1969) para a mesma cepa, cujas atividades enzimáticas máximas foram: CMCase 6.365,5 U/L (72 h), FPase 165,2 U/L (31 h) e β-glucosidase 633,1 U/L (98 h), de acordo com Castro et al. (2010). A atividade CMCase de *T. harzianum* obtida no presente trabalho (27.017,6 U/L) ultrapassou o relatado por Li *et al*. (2005) após 192 horas (8 dias) de cultura de *Trichoderma reesei* QM 9414 em fibra de milho pré-tratada (9.529 U/L). Roussos & raimbault (1982) relataram que a atividade CMCase máxima produzida por *T. harzianum* em celulose microcristalina foi de 3000 U/L. Em relação à atividade FPase, o valor máximo obtido neste trabalho (1.225 U/L) foi maior do que alguns dos resultados relatados na literatura em que vários substratos celulósicos foram utilizados, tais como fibra de milho pré-tratada (280 U/L) e celulose microcristalina (400 U/L) (LI *et al*., 2005; ROUSSOS & RAIMBAULT, 1982). Em outros estudos, foram obtidos atividades FPase próximos a este estudo. Delabona et al. (2012) encontraram uma atividade FPase máxima de 1.210 U/L de *Trichoderma harzianum* P49P11 usando bagaço de cana pré-tratado em 120 horas de processo. Juhász et al. (2005) relataram 1.200 FPU/L produzido por *T. reesei* RUT C30 (ATCC 56765), durante 168 horas. Para a atividade β-glucosidase, Kocher *et al*. (2008) observaram um valor máximo de 1.650 U/L em fermentação submersa de palha de arroz com *T. harzianum* RUT-C 8230 após 240 horas (10 dias) de cultura.

No que diz respeito ao teor de proteína, a concentração obtida no presente trabalho após 42 horas foi de 261,6 mg/L. As atividades específicas das enzimas foram as seguintes: 103,3 U/mg proteína (CMCase); 4,7 U/mg proteína (FPase); 2,3 U/mg de proteína (β-glucosidase), e 2,2 U/mg de proteína (avicelase). A atividade específica de CMCase foi mais elevada do que a observada para o fungo modelo *Trichoderma reesei* RUT C30 em biorreator (AHMED & VERMETTE, 2008), cujo valor foi de 4,2 U/mg, enquanto que a atividade específica FPase foi semelhante (5,0 U/mg) a do presente trabalho. Já a atividade específica de avicelase aqui resgistrada foi superior aquela relatada por Colussi et al. (2011), de 1,25 U/mg. Em termos de produtividade volumétrica (Q_p), o nosso estudo obteve os valores mais elevados registrados na literatura para atividades CMCase, FPase e avicelase de *T. harzianum*.

Uma característica importante observada no perfil da produção de celulase por *T. harzianum* IOC 3844 foi a cinética rápida do processo, que atingiu taxas elevadas em apenas 42 horas de fermentação. Este é um aspecto vantajoso deste microrganismo, que é capaz de produzir enzimas do complexo celulásico em curtos períodos de tempo, resultando em elevados valores de produtividade volumétrica (Q_p), especialmente para CMCase (643,3 U/L/h). Para FPase e β-glucosidase, as produtividades volumétricas foram, respectivamente, 29,2 e 14,5 U/L/h. As condições otimizadas avaliadas neste estudo permitiram um aumento da produtividade volumétrica máxima (7 vezes para CMCase, 5 vezes para FPase e 1,4 vezes para β-glucosidase) em comparação com um meio não-otimizado para a mesma estirpe (CASTRO et al., 2010). Ao utilizar o conhecido fungo *T. reesei* RUT-C30 em um biorreator agitado mecanicamente, AHMED & VERMETTE (2008) obtiveram as seguintes produtividades volumétricas: 29,2 U/L/h (para CMCase) e 34,9 U/L/h (para

FPase). Comparando com resultados descritos para este fungo modelo, no presente estudo houve uma significativa produtividade volumétrica de CMCase.

A tabela 5.7 mostra os valores de atividades das celulases e a produtividade volumétrica (Q_p) de *T. harzianum* relatadas em diferentes estudos. Ressalta-se que a atividade avicelásica não foi reportada nos estudos citados, por isso não faz parte desta tabela.

Tabela 5.7. Atividade das celulases e produtividade volumétrica (Q_p) de *Trichoderma harzianum* em diferentes estudos.

Microrganismo	Atividade (U/L)			Produtividade Volumétrica (U/L/h)		
	FPase	CMCase	β-glucosidase	FPase	CMCase	β-glucosidase
Trichoderma harzianum IOC 3844 (a)	1.225	27.017	609	29,2	643,3	14,5
Trichoderma harzianum IOC 3844 (b)	445	6.358	742	5,3	88,4	6,5
Trichoderma harzianum (c)	400	3.000	NR*	8,3	0,1	NR*
Trichoderma harzianum (d)	NR*	790	920	NR*	6,6	7,7
Trichoderma harzianum RUT-C 8230 (e)	127	150	1.650	0,5	0,6	6,9

(a) Este estudo; (b) Castro et al. (2010); (c). Roussos & Raimbault (1982); (d) Ahmed et al. (2009); (e) Kocher et al. (2008). NR*: não reportado.

5.3.4 Avaliação do efeito da aeração na produção de celulases

O oxigênio é indispensável em sistemas metabólicos aeróbios e sua provisão está intimamente relacionada ao direcionamento do produto de interesse. A importante função do oxigênio condiz com sua utilização como aceptor final de elétrons ao final da cadeia respiratória, na re-oxidação de co-enzimas, gerando ATP, que é a principal fonte de energia das células. Em muitos casos, as fermentações que são aeradas naturalmente, têm restrições em termos de rendimento e produtividade por não atender à demanda das células tendo em vista as baixas taxas de transferência de massa e de absorção desse gás. O fornecimento de oxigênio ao meio de cultivo, sem dúvida, pode impulsionar a produção de um bioprocesso, e sua ausência pode constituir uma limitação tecnológica (PEREIRA Jr. et al., 2008).

Em relação ao efeito da aeração, observou-se que a condição de OD em 10% de saturação foi suficiente para impulsionar o aumento da produção enzimática. Após 42 horas de fermentação as atividades foram: CMCásica 27.017,6 U/L; FPásica 1.225,9 U/L, e β-glucosidásica 609,4 U/L, o que significa incrementos de 1,9, 2,4 e 1,2 vezes, respectivamente, em relação aos resultados da validação experimental em frascos. Quando aplicou-se maior aeração (30%), não houve aumento significativo na produção de celulases comparativamente à condição de 10% de OD. As atividades foram similares: CMCásica 25.896,5 U/L, FPásica 1.064,7 U/L, β-glucosidásica 446,7 U/L. Estes resultados indicam que a produção de celulases por *T. harzianum* IOC 3844 pode ser realizada com níveis reduzidos de aeração (10% OD), permitindo um menor gasto energético ao sistema. Isto é interessante quando objetiva-se o escalonamento do bioprocesso.

A tabela 5.8 mostra a atividade das celulases em biorreator instrumentado após 42 horas de fermentação em diferentes condições de saturação de oxigênio dissolvido nas condições deste estudo.

Tabela 5.8. Atividade das celulases em biorreator instrumentado em fermentação submersa sob diferentes condições de saturação de oxigênio dissolvido e respectivos desvios-padrão.

Saturação de OD	CMCase (U/L)	FPase (U/L)	β-glucosidase (U/L)	Avicelase (U/L)
10%	27.017,6 ±2,2	1.225,9 ±0,1	609,4 ±0,2	577,0 ±0,5
30%	25.896,5 ±0,1	1.064,7 ±0,4	446,7 ±0,2	530,3 ±0,2

5.3.5 Concentração do extrato enzimático em membranas de fibras ocas

O extrato enzimático produzido foi concentrado 48 vezes em relação ao volume inicial usando um sistema de membrana de fibras ocas (*cut-off* 5 kDa). O concentrado, chamado "*Ladebio Th*", obteve as seguintes atividades de celulases: 46.661,5 U/L (FPase), 1.034.801,1 U/L (CMCase), 23.750,7 U/L (β-glucosidase), e 21.200,5 (avicelase). Houve uma pequena perda de atividade CMCase após concentração devido à passagem de moléculas para a fração do permeado, em que atividades de celulase foram observadas (Tabela 5.9). Embora a filtração por membrana de porosidade tenha sido de 5 kDa, a passagem de proteínas maiores podem ocorrer devido à pressão aplicada durante a concentração.

Tabela 5.9. Atividade das celulases nas diferentes etapas de concentração do extrato enzimático de *T. harzianum* em membranas de fibras ocas.

Etapa	FPase (U/L)	CMCase (U/L)	β-glucosidase (U/L)	Avicelase (U/L)
Extrato Bruto	1.024,8	29.384,2	492,7	577,0
Microfiltrado	1.029,6	24.682,0	315,3	*
Concentrado	46.661,5	1.034.801,1	23.750,7	21.200,5
Permeado final	92,6	1.869,4	0,2	*
Perdas (%)	9,0	6,4	0,1	*

*: não analisado

A proporção de atividades FPase: CMCase: β-glucosidase foi de 1:22:0.5 no extrato concentrado de *T. harzianum* (*Ladebio Th*). No preparado comercial *Multifect*® da Genencor foi observada a relação 1:32:0.6 para as mesmas atividades. Assim, existe uma proporção semelhante de celulases no preparado enzimático *Ladebio Th* quando comparado com o *pool* enzimático comercial. Tais similaridades mostram que foi possível obter a partir de bagaço de cana um preparado enzimático de composição similar ao de um preparado celulásico comercial em termos de proporções de atividade enzimática, ainda que em menores concentrações. As atividades celulolíticas das preparações de *Ladebio Th* e *Multifect*® são apresentadas na tabela 5.10.

Tabela 5.10. Atividade das celulases dos preparados *Ladebio Th* e *Multifect*®.

Preparado enzimático	FPase (U/L)	CMCase (U/L)	β-glucosidase (U/L)
Ladebio Th	46.661	1.034.801	23.751
Multifect®	200.000	6.500.000	125.000

5.4 Produção de xilanases

Além das celulases, o preparado enzimático de *T. harzianum* apresentou elevada produção de xilanases. Possivelmente, a produção de tais enzimas foi induzida pela hemicelulose residual presente na celulignina parcialmente deslignificada (12,6%).

A figura 5.5 mostra o perfil cinético da produção destas enzimas. Após 42 horas de fermentação, foi atingida uma atividade endoxilanásica de 62.800,6 U/L. O elevado teor de xilanases no extrato enzimático de *T. harzianum* pode ser relevante para a hidrólise de material lignocelulósico pré-tratado, visto que mesmo após os pré-tratamentos há resíduos da fração hemicelulósica, cujo componente principal é a xilana (COLLINS *et al*., 2005).

Recentemente, tem sido mostrado que a transcrição do gene de xilanase em *T. reesei*, por exemplo, é desencadeada por diferentes indutores de várias macromoléculas de hemicelulose. Este estudo revelou que a expressão das xilanases de *T. reesei* pode ser induzida por ambos D-xilose e L-arabinose, mas independentemente uma da outra (HEROLD, et al., 2013).

O gênero *Trichoderma* é conhecido por produzir enzimas com alta atividade xilanolítica (WONG & SADDLER, 1992). Na literatura há o registro de diferentes xilanases que foram identificadas e purificadas. Algumas das xilanases têm sido extensivamente caracterizadas no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas, hidrolíticas, e moleculares. Xilanases também têm sido utilizadas com sucesso em aplicações industriais, tal como no branqueamento de polpas na indústria de papel e celulose. E ainda, pesquisas têm sido desenvolvidas com intuito de aproveitar a fração hemicelulósica da biomassa (presente no hidrolisado ácido do pré-tratamento) para a produção

de etanol de segunda geração, sendo necessário o uso de xilanases (BETANCUR, 2005).

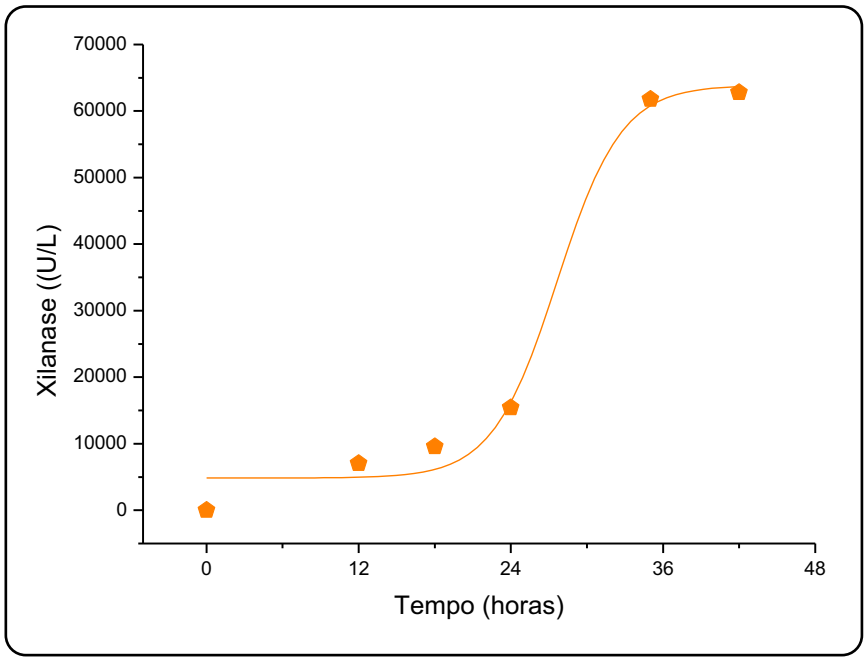


Figura 5.5. Perfil cinético da produção de endoxilanases em biorreator instrumentado contendo meio otimizado (fonte de carbono: celulignina parcialmente deslignificada ; temperatura: 30°C; agitação: 200 rpm; pH 5,0; o oxigênio dissolvido (OD): 10% de saturação).

5.5 Gel de Proteínas dos meios otimizado e não-otimizado

O perfil de proteínas dos meios otimizado e não-otimizado foi visualizado em gel SDS-PAGE. Foram avaliadas as seguintes condições: meio não-otimizado produzido em frasco, meio otimizado produzido em frasco, e meio otimizado produzido em reator. Todas as canaletas foram carregadas com o mesmo volume de amostra.

Dentre as amostras analisadas, verificou-se a maior abundância de proteínas por volume de amostra no meio otimizado produzido em biorreator,

como mostra a figura 5.6, o que se configura como um importante fator para posteriores aplicações do extrato enzimático.

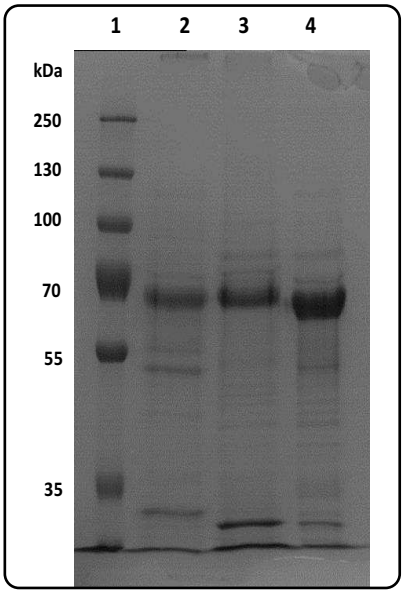


Figura 5.6. Gel de Proteínas dos meios otimizado e não-otimizado. 1: padrão de massa molecular de proteína; 2: meio não-otimizado produzido em frasco; 3: meio otimizado produzido em frasco; 4: meio otimizado produzido em biorreator.

Foi observada um grande variedade de proteínas produzidas por *T. harzianum*, algumas de tamanho reduzido (<35 kDa), até outras maiores, com massa molecular de no máximo 250 kDa.

A proeminente banda de massa molecular de cerca de 70 kDa observada no gel possivelmente é a celobiohidrolase I de *T. harzianum* (ThCBHI) purificada e caracterizada por Colussi et al. (2011). Estes autores produziram ThCBHI por indução com celulose microcristalina sob fermentação submersa, e na análise em gel de poliacrilamida verificaram que esta proteína constituiu a banda majoritária do *pool* enzimático. A caracterização bioquímica de CBH I de *T. harzianum* mostrou que esta proteína possui massa molecular de 66 kDa. Investigações biofísicas baseadas em dados de dicroismo circular demostraram que a composição da estrutura secundária de ThCBHI é característica de

proteínas ricas em estrutura β, muito semelhante a de CBHI de *T. reesei*. Isto indica que o enovelamento global da proteína é presumivelmente semelhante ao de CBHI de *T. reesei*. Esta enzima foi classificada na família GH7 de glicosil hidrolases (COLUSSI et al., 2011).

5.6 Zimograma do secretoma de *T. harzianum*

Com intuito de confirmar as principais atividades do preparado enzimático de *T. harzianum* (concentrado) e suas bandas de proteínas, foram feitos os zimogramas de CMCase e xilanase, adicionando-se carboximetilcelulose (1% m/v) e xilana 1% (m/v) à composição de gel de poliacrilamida, respectivamente. Os géis foram corados em solução de vermelho Congo (0,1% m/v), como descrito na metodologia. As áreas onde o substrato foi hidrolisado por ação de tais enzimas, não aderem à coloração, revelando a presença das bandas de tais enzimas. Ao passo que as bandas escuras referem-se às bandas de proteínas presentes no meio, mas que não possuem atividade enzimática sobre o substrato avaliado.

Os zimogramas evidenciaram a presença de inúmeras bandas de CMCase e xilanase no secretoma de *T. harzianum* (Figura 5.7). Foi observada grande abundância de CMCases, com diversas massas moleculares, variando entre (<) 25 kDa e 250 kDa. As xilanases apresentaram tamanhos mais reduzidos, menores que 35 kDa. A literatura tem relatado xilanases de baixa massa molecular do gênero *Trichoderma* (UJIIE et al., 1991; TÖRRÖNEN et al., 1992).

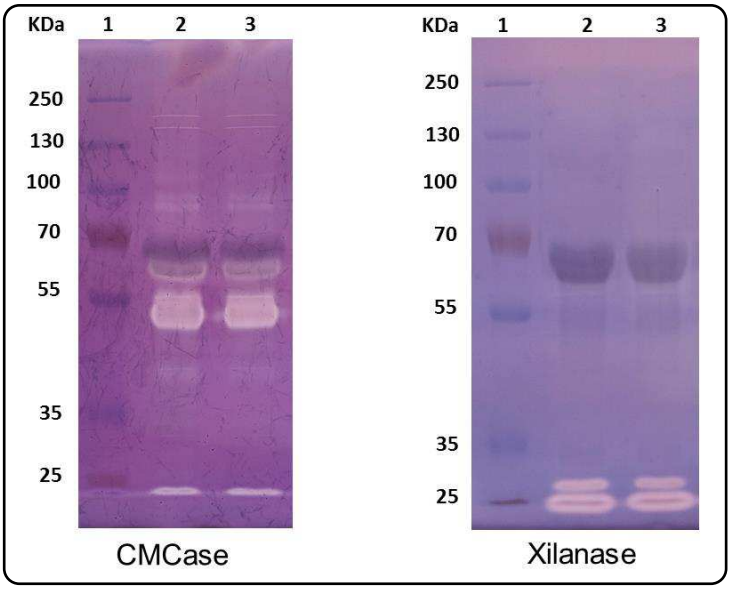


Figura 5.7. Zimogramas do secretoma de *T. harzianum.* (1) Padrão molecular de proteínas, (2) e (3) duplicata do preparado enzimático de *T. harzianum* (Ladebio Th). As bandas claras referem-se às enzimas (CMCases ou xilanases).

5.7 Evolução da otimização do meio de produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844

Estudos realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos da UFRJ têm levado à evolução da otimização do meio de produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Tendo como base resultados anteriores (ROCHA, 2010), observa-se que do primeiro planejamento experimental em que se utilizou o meio de Mandels & Weber até a produção em biorreator utilizando meio otimizado com celulignina parcialmente deslignificada, as atividades enzimáticas foram consideravelmente aumentadas (CMCase, 5 vezes; beta-glucosidase,3 vezes; e FPase, 9 vezes), como mostra a figura 5.8.

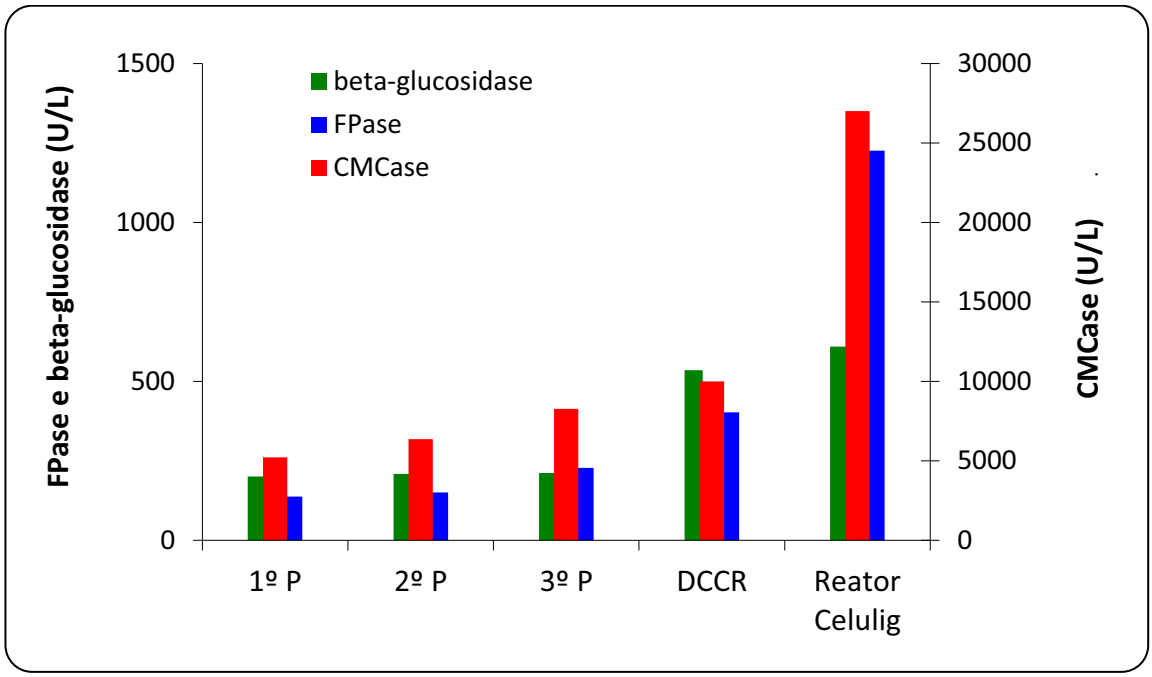


Figura 5.8. Evolução da otimização do meio de produção de celulases por *T. harzianum* desde os planejamentos experimentais (Rocha, 2010) até a produção em biorreator contendo meio otimizado com celulignina parcialmente deslignificada (presente estudo). P: Planejamento experimental; DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional; Celulig: celulignina parcialmente deslignificada. Foram considerados os valores dos pontos centrais dos planejamentos experimentais.

A posteriori, as atividades enzimáticas foram incrementadas, visto que o meio produzido em biorreator em condições otimizadas com celulignina, que já apresentava elevadas atividades, foi concentrado em membrana de fibras ocas. Particularmente considerando os dados de atividade enzimática do biorreator do presente estudo, antes e após concentração, verifica-se que o aumento das atividades foi bastante acentuado, em média, 38 vezes para cada uma das atividades enzimáticas, o que pode ser observado na figura 5.9.

Por fim, em termos gerais, a tabela 5.11 mostra um resumo da evolução da otimização do meio de produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Desde a produção inicial antes da otimização (ROCHA, 2010) até o concentrado do biorreator (presente estudo), as atividades aumentaram

expressivamente: CMCase (198 vezes), FPase (338 vezes) e β-glucosidase (118 vezes).

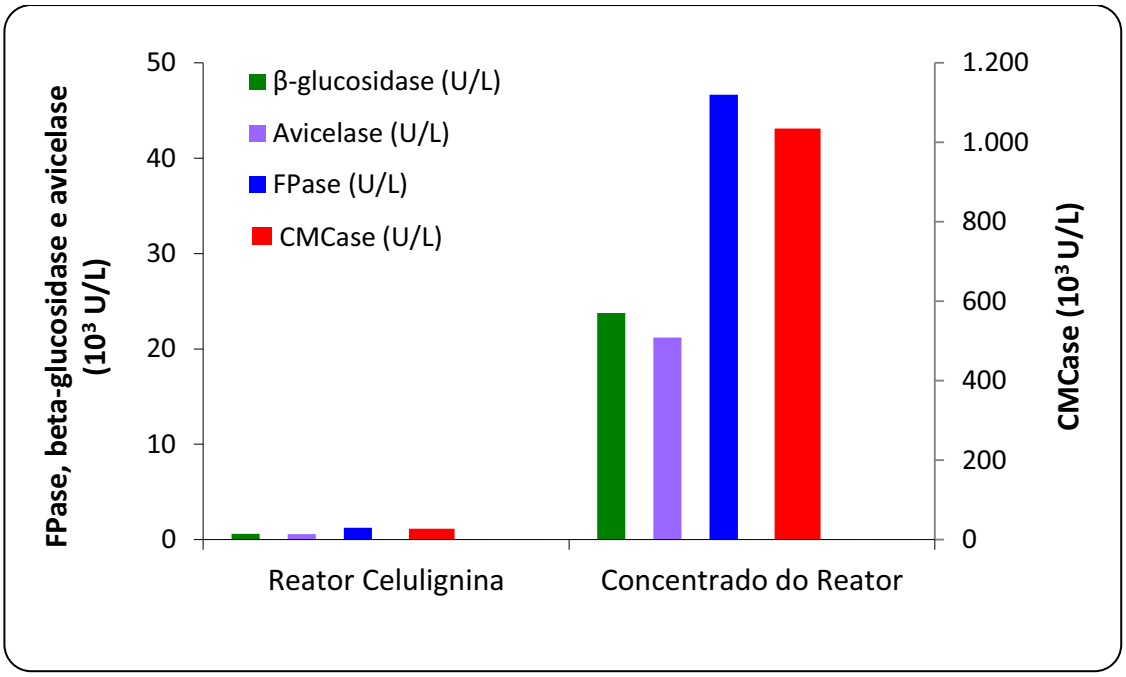


Figura 5.9. Aumento da atividade das celulases de *T. harzianum* produzidas em biorreator antes e após concentração do preparado enzimático.

Tabela 5.11. Evolução da otimização do meio de produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844 desde a produção inicial antes da otimização até o concentrado do biorreator contendo meio otimizado.

Meio de fermentação	CMCase (U/L)	FPase (U/L)	β-glucosidase (U/L)	Avicelase (U/L)
meio de Mandels (a)	5.230,6	138,0	201,3	*
Concentrado do Reator contendo meio otimizado (b)	1.034.801	46.661	23.751	21.200,50
Aumento da atividade enzimática (X)	***198***	***338***	***118***	_

Fonte: (a) Rocha (2010); (b) Este estudo. *: não reportado.

Com base na literatura, ressalta-se que no presente estudo foram obtidas as maiores atividades enzimáticas de preparados celulásicos bruto ou concentrado de *T. harzianum* já reportados. Isto se configura como um avanço biotecnológico não somente pelos altos valores de atividade, mas também pelo aproveitamento de um resíduo agroindustrial como fonte de carbono para a produção destas enzimas.

5.8 Caracterização proteômica de *T. harzianum*

A análise proteômica é uma importante ferramenta que pode proporcionar uma compreensão sistemática de eventos a nível molecular (CHUNDAWAT et al., 2011). Estudos de proteômica de fungos filamentosos têm começado a aparecer recentemente na literatura, apesar da prevalência destes organismos na indústria de biotecnologia.

No corrente estudo, as bandas das proteínas do preparado enzimático de *T. harzianum* foram separadas por eletroforese em gel uni-dimensional seguido de coramento por *Comassie blue*. O SDS-PAGE do secretoma de *T. harzianum* revelou múltiplas proteínas com massa molecular entre 10 a 250 KDa. Estas proteínas foram digeridas por tripsina e analisadas por LC-MS/MS. A identificação das proteínas foi feita comparando o spectro LC-MS/MS obtido contra o banco de dados de proteínas de *T. harzianum* do NCBI (NCBI, 2013), através da pesquisa da sequências de proteínas não redundantes usando o Blastp (BLAST proteína-proteína).

A análise proteômica identificou 117 proteínas. O secretoma de *T. harzianum* IOC 3844 crescido em bagaço de cana mostrou a seguinte composição: glicosil hidrolases (67%), módulo de ligação ao carboidrato (CBM; 1%), proteínas de atividade acessória (AA9; 1%), swolenina (1%), carboidrato

esterases (1%), proteases (5%), lipases (1%), proteínas desconhecidas (10)%, dentre outras (Figura 5.10a). Estes resultados sugerem que a exposição de *T. harzianum* ao bagaço de cana-de-açúcar foi capaz de induzir o metabolismo para a expressão de glicosil hidrolases (GH), provavelmente porque este resíduo agroindustrial possui em sua composição alto teor de celulose, além de hemicelulose.

A elevada concentração de glicosil hidrolases observada (67%) é um importante fator para a hidrólise da biomassa. As GH são um grupo comum de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um hidrato de carbono e uma porção de não-carbohidratos (CAZY, 2013). Devido à sua atividade hidrolítica, podem estar diretamente relacionadas à degradação de hexoses e pentoses constituintes da biomassa lignocelulósica.

A nomenclatura das glicosil hidrolases (EC 3.2.1-) é baseada na sua especificidade ao substrato, e no seu mecanismo molecular. A classificação de glicosil hidrolases em famílias com base em semelhanças de sequências de aminoácidos é fundamentada na relação direta entre seqüência e similaridade das dobras (CAZY, 2013). Tal classificação de GH's e enzimas relacionadas (por exemplo, liases e carboidrato esterases) dentro de famílias de proteínas baseadas na similaridade da sequência de aminoácidos foi introduzida em décadas recentes. Tem sido mostrado que o domínio catalítico de glicosil hidrolases pertencentes à mesma família tem a mesma dobra tri-dimensional e exibem similar esterioespecificidade para atividades hidrolíticas.

As GH observadas neste estudo foram distribuídas em 26 famílias: GH7, GH6, GH3, GH10, GH15, GH5, GH55, GH92, GH11, GH71, GH47, GH2, GH62, GH17, GH72, GH61 (LPMOs), GH74, GH18, GH27, GH16, GH64, GH81, GH95, GH54, GH25, GH76, como ilustra a figura 5.10b.

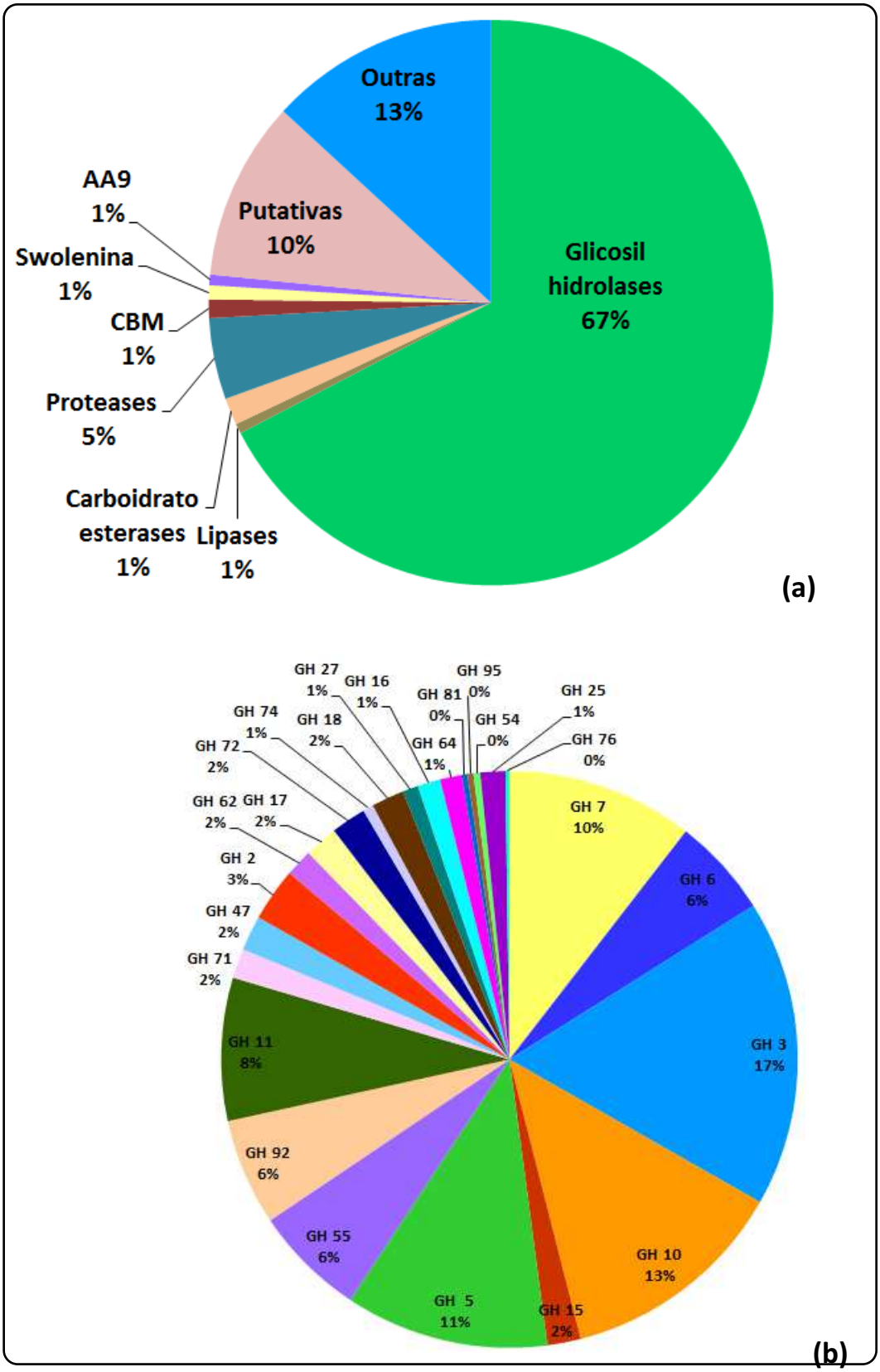


Figura 5.10. Caracterização proteômica de *T. harzianum.* (a) proporção de proteínas totais e (b) glicosil hidrolases de *T. harzianum* IOC 3844 calculadas por emPAI (índice de abundância de proteína modificado exponencialmente).

Dentre as glicosil hidrolases com atividade sobre a celulose, os grupos mais abundantes foram: GH 5 (11%), GH 6 (6%), GH 7 (10%), GH 3 (17 %) e GH 55 (6%).

GH5 é a maior de todas as famílias de glicosil hidrolases. Originalmente conhecida como família de celulase A, uma variedade de especificidades desta família é agora conhecida, notavelmente endoglucanase (celulase). São também incluídas nesta família: endomananases, exoglucanases, exomananases, β-glucosidases e β-manosidases. Outras atividades abrangem 1,6-galactanases, 1,3-mananases, 1,4-xilanases, endoglicoceramidases, bem como xiloglucanases de alta especificidade (CAZY, 2013). Enzimas GH5 são amplamente encontrados em Archaea, bactérias e eucariotos, especialmente fungos e plantas. Estruturas tridimensionais estão disponíveis para um grande número de enzimas da família GH5.

São pertencentes à família GH6: as endoglucanases, classificadas como EC 3.2.1.4 e as celobiohidrolases, classificadas como CE 3.2.1.91 (CAZY, 2013). Glicosil hidrolases da família GH6 clivam ligações β-1,4 glicosídicas de celulose em β-1,4-glucanas. As celobiohidrolases desta família agem a partir das extremidades não redutoras das cadeias de celulose para gerar celobiose. As enzimas GH6 realizam a catálise com inversão da estereoquímica anomérica, conforme mostrado na primeira celobiohidrolase II (CBH II; Cel6A) a partir do fungo *T. reesei* (KNOWLES et al., 1988). As GH6 são originalmente conhecidas como celulase família B.

A família GH 7 inclui: endo-b-1,4-glucanases (EC 3.2.1.4); celobiohidrolases (EC 3.2.1.176); quitosanases (EC 3.2.1.132), endo-b-1,3-1,4-glucanases (EC 3.2.1.73) (CAZY, 2013). As enzimas deste grupo são

originalmente conhecidas como celulases família C. As celobiohidrolases desta família agem a partir das extremidades redutoras das cadeias de celulose para gerar celobiose. Este grupo difere das celobiohidrolases EC 3.2.1.91, que atuam a partir das extremidades não redutoras da celulose. A maioria das glicosil hidrolases da família 7 clivam as ligações β-1,4 glicosídicas em cellulose/β-1,4-glucanas. Estruturas tridimensionais estão disponíveis para ambos, endoglucanases e celobiohidrolases de GH 7 (DIVNE et al., 1994; SULZENBACHER et al., 1996).

A família GH3 de glicosil hidrolases atualmente agrupa os exo-agentes: β-glucosidases (EC 3.2.1.21); xilano 1,4-β-xilosidases (EC 3.2.1.37); β-N-acetilhexosaminidases (EC 3.2.1.52); glucano 1,3-β-glucosidases (EC 3.2.1.58); glucano 1,4-β-glucosidases (EC 3.2.1.74), exo-1,3-1,4-glucanases (EC 3.2.1.-); α-L-arabinofuranosidases (EC 3.2. 1,55) (CAZY, 2013). Amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas, enzimas GH3 realizam uma série de funções, incluindo a degradação da biomassa de celulose, remodelação da parede celular bacteriana e de plantas, metabolismo energético e de defesa a patógenos. As GH3 atuam removendo resíduos glicosídeos simples a partir das extremidades não redutoras dos seus substratos. Vários estudos têm contribuído para a compreensão da cinética e mecanismo dessas enzimas (DAN et al., 2000; THONGPOO et al., 2013).

GH 55 é uma família de glicosil hidrolases composta exclusivamente de β-1,3-glucanases, incluindo tanto exo- e endo-enzimas (CAZY, 2013). Todos os membros bioquimicamente caracterizados desta família são de origem fúngica, embora não existam homólogos de levedura. O substrato fisiológico para estas enzimas pode ser a parede celular fúngica, cujo principal componente é β-1,3/1,6-glucano. A maioria dos membros desta família são exo-glucano-1,3-β-

glicosidases (EC 3.2.1.58), que clivam a ligação terminal β-1,3-glicosídica na extremidade não redutora de β-1,3-glucanas ou β-1,3/1,6-glucanas. Muitos produzem gentiobiose (β-D-glucopiranosil-1,6-D-glucose), em adição à glicose durante a degradação de β-1,3/1,6-glucana (PITSON et al., 1995; BARA et al., 2003).

GH 10 (13%) e GH 11 (7%), preponderantemente hemicelulases, foram alguns dos grupos de enzimas mais abundantes do secretoma de *T. harzianum*. As atividades conhecidas da família 10 de glicosil hidrolases (GH 10) são endo-1,4-β-xilanases (EC 3.2.1.8), endo-1,3-β-xilanases (EC 3.2.1.32); enquanto que a família GH 11 inclui apenas endo-β-1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) (CAZY, 2013). Outras hemicelulases foram encontradas: manosidases (GH 92, GH 2, GH 47, e GH5); arabinofuranosidases (GH62 e GH54), galactosidases (GH27). Xiloglucanases (GH 74) estiveram presentes ao nível de 1%. Xiloglucanase é provavelmente uma importante classe de enzimas expressa pelo crescimento de fungos em paredes celulares de plantas. Isto se deve aos elevados valores de xiloglucanos presentes nas paredes celulares primárias que o fungo deve digerir para chegar até as paredes celulares secundárias. Nos últimos anos, estudos mostraram que a expressão destas enzimas é estreitamente coordenada com outras celulases e hemicelulases. A transcrição coordenada e expressão de múltiplas glicosil hidrolases foram sugeridas como típicas de sistemas microbianos complexos degradadores de substratos lignocelulósicos como paredes celulares de plantas, como relatado para *T. reesei* (FOREMAN et al., 2003; NOGAWA et al., 2001).

Outras glicosil hidrolases também foram encontradas. GH 18, que possui atividade quitinase (CAZY, 2013), constituiu cerca de 5% do proteoma de *T. harzianum*. As GH 18 clivam todas as formas de quitina a taxas variáveis,

dependendo da enzima e do substrato. Elas também atuam em quitosana com baixo grau de acetilação e alguns são conhecidas por degradar peptidoglicano (SØRBOTTEN et al., 2005; BOKMA et al., 1997).

Proteínas de atividade acessória (AA9), anteriormente classificadas como GH61 (CAZY, 2013), foi um importante grupo de enzimas encontrado no proteoma de *T. harzianum*, correspondendo a 1%. Proteínas AA9, ou monooxigenases polissacarídicas líticas (LPMOs), são uma classe recentemente descoberta de metalo-enzimas cobre-dependentes que oxidativamente clivam as ligações glicosídicas na superfície da celulose (AACHMANN et al., 2012). Estas enzimas requerem oxigênio molecular e equivalentes redutores de celobiose desidrogenase. Um redutor químico também pode ser utilizado para conduzir a reação. LPMOs mostraram aumentar a hidrólise da celulose por celulases, e um profundo entendimento mecanicista destas enzimas pode ser usado para reduzir ainda mais os custos dos biocombustíveis celulósicos (BEESON et al., 2011). A descoberta de monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) pode representar uma revolução no processamento enzimático da biomassa. De um ponto de vista científico, essas enzimas são interessantes porque elas representam um novo tipo de atividade enzimática. De um ponto de vista aplicado são de interesse porque podem acelerar a conversão enzimática da biomassa, reduzindo as cargas de enzima e os tempos de processamento. Um dos melhores preparados comerciais de celulose conhecidos hoje, Cellic CTec2, produzido pela Novozymes, contém LPMOs extras que contribuem para o melhor desempenho deste produto em relação aos seus antecessores (BEESON et al., 2011). Embora o conhecimento industrial sobre estas enzimas permaneça praticamente invisível para o mundo, parece que a pesquisa acumulada sobre LPMOs ainda é bastante limitada. É, portanto,

provável que outras melhorias na conversão da biomassa através da utilização dessas enzimas vão surgir nos próximos anos (HORN et al., 2012).

Foram também encontradas proteínas no secretoma de *T. harzianum* que não possuem atividade glicosil hidrolítica. Carboidrato esterases constituíram cerca de 2% do conteúdo total de proteínas. Essas enzimas são hidrolases que catalisam a clivagem de ésteres em um ácido e um álcool. Consideram-se duas classes de substratos para carboidrato esterases: aqueles em que o açúcar desempenha o papel de "ácido", tais como ésteres metílicos de pectina, e aqueles em que o açúcar comporta-se como o álcool, como xilana acetilada (CAZY, 2013). Pectinases, um conhecido tipo de carboidrato esterases, podem desempenhar um papel importante na hidrólise de paredes celulares secundárias de plantas abundantes em pectinas.

Um módulo de ligação ao carboidrato (*carbohydrate-binding module* ou CBM) é definido como uma sequência de aminoácidos dentro de uma enzima carboidrato-ativa como uma ”âncora” tendo atividade de ligação ao carboidrato (CAZY, 2013). Os CBMs, que são módulos ligados a enzimas maiores, diferem as proteínas carboidrato-ativas de outras proteínas não catalíticas que se ligam a açúcares, tais como lectinas e proteínas transportadoras de açúcar. No presente estudo, CBM constituiu 3% da amostragem proteômica.

Swolenina constituiu cerca de 1% das proteínas produzidas por *T. harzianum*. Esta proteína acessória é relevante porque facilita a hidrólise da celulose na etapa de amorfogênese. Uma característica interessante da swolenina é que ela tem em sua estrutura um CBM N-terminal com um domínio de ligação à celulose que é altamente conservado em outras CBMs fúngicas. Isto é esperado, considerando que o CBM facilita a ancoragem da

proteína ao seu substrato alvo (YAO et al., 2008). Estudo preliminar realizado por Saloheimo et al. (2002) mostrou que swolenina pode romper a estrutura da fibra de celulose de materiais como algodão ou da alga *Valonia macrophysa*. Assim, esta proteína pode ter um papel importante na degradação enzimática de material lignocelulósico através da desestruturação da fibra celulósica. Recentemente, Jäger et al. (2011) mostraram que o pré-tratamento com swolenina causou a desaglomeração da celulose bem como a amorfogênese (descristalização). Foi constatada uma significativa diminuição de tamanho de partícula, bem como a redução da cristalinidade de substratos celulósicos, aumentando substancialmente a adsorção máxima de celulases. O pré-tratamento dos substratos celulósicos com swolenina – mesmo em concentrações não saturantes – acelerou significativamente a hidrólise, além de levar ao aumento da eficiência de hidrólise enzimática.

Em relação às lipases, a porcentagem no secretoma de *T. harzianum* foi de aproximadamente 1%. Lipases pertencem ao grupo das hidrolases que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres, monoacil, diacil e glicerol. Nos microrganismos, as lipases podem apresentar atividade fosfolipídica. Quando secretadas, facilitam a digestão dos lipídeos e os ácidos graxos livres liberados auxiliam na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro (STEHR et al., 2003). Estas enzimas possuem significante potencial biotecnológico como catalisadores em reações de síntese orgânica em meio não aquoso utilizando processos simplificados com altos rendimentos (MESSIAS et al., 2011).

A proporção de proteases foi de 5%. Enzimas proteolíticas de fungos tem atraído a atenção dos pesquisadores devido a características tais como alta diversidade, especificidade pelo substrato, e estabilidade em condições

extremas. O seu papel funcional também é interessante, que inclui uma série de processos a partir da hidrólise de substratos macromoleculares sob baixo teor de nitrogênio (KUDRYAVTSEVA et al., 2008). Tem sido demonstrado que o papel de proteases de estirpes de *Trichoderma* pode estar relacionado à sua capacidade saprofítica competitiva (KREDICS et al., 2005).

Cerca de 10% do secretoma de *T. harzianum* foi de proteínas putativas (proteínas não-mapeadas).

Um interessante grupo de proteínas indentificado na análise proteômica foi o de hidrofobinas (0,51%). As hidrofobinas são proteínas pequenas (~ 100 aminoácidos) ricas em cisteína, que são expressas apenas por fungos filamentosos. Elas são conhecidas pela sua capacidade de formar um revestimento hidrófobo sobre a superfície de um objeto. Fungos elaboram estruturas aéreas complexas e esporos, mesmo em ambientes aquosos. As hidrofobinas são geralmente encontradas na superfície exterior de conídios e da parede de hifas, e podem estar envolvidas na mediação de contato e comunicação entre o fungo e o seu ambiente. Estas proteínas são o componente principal do revestimento hidrofóbico que cobre a superfície de muitos esporos fúngicos (SUNDE et al., 2008).

Outras proteínas também foram identificadas, como por exemplo: ceramidase (1,36%); tirosinase (0,32%); amino oxidase (0,73%); aminotransferase (0,10%); desidrogenase (0,40%); metiltransferase (0,20%); e fosfatidilinositol (0,32%).

Algumas das proteínas identificadas de *T. harzianum* expressas na presença de cana-de-açúcar estão envolvidas em outros tipos de metabolismo: de nucleótidos (ribonuclease, metiltransferase, proteína como beta transducina, proteínas contendo domínios ribonucleoproteína-RNP),

assimilação de fósforo (ácido fosfatase), proteínas de membrana (fosfolipase C, proteína de transferência fosfatidilglicerol/fosfatidilinositol), metabolismo de carboidratos (amidase, proteínas contendo domínio LysM), metabolismo energético (tirosinase, amino oxidase, aminotransferase, L-amino ácido oxidase, malato-desidrogenase, glucose sorbosone desidrogenase), metabolismo de ácidos carboxílicos (lipase, ceramidase, carboximuconato ciclase), metabolismo de ésteres (carboidrato esterase), proteínas de transporte (proteína extracelular soluto-ligante), metabolismo secundário, como auto-defesa (policetídeos sintases), e proteína da parede celular, sugerindo uma atuação metabólica bem diversificada em presença deste material lignocelulósico e demais componentes presentes no meio de cultivo.

A fim de verificar os percentuais aproximados dos grupos hidrolíticos preponderantes na hidrólise de celulose e hemicelulose, foram calculadas as proporções de celulases e hemicelulases, em relação ao conteúdo total de proteínas. O perfil obtido pode ser visto na figura 5.11a. O grupo majoritário dentre estas enzimas foi o de celulases, correspondendo a 38% do secretoma, enquanto que as hemicelulases também foram bem representativas, com teor de 23%. Outras proteínas, incluindo outros tipos de GH's ou proteínas que não possuem atividade hidrolítica abrangeram 39% das proteínas totais.

Quanto às celulases, particularmente, que são o tema deste trabalho, os resultados mostraram que *T. harzianum* IOC 3844 possui os três grupos principais de enzimas do modelo de sinergismo endo-exo para a degradação de celulose: endoglucanases, exoglucanases e beta-glucosidades. Dentre o total de celulases, as proporções aproximadas dos grupos enzimáticos frente aos resultados de caracterização proteômica são apresentadas na figura 5.11b.

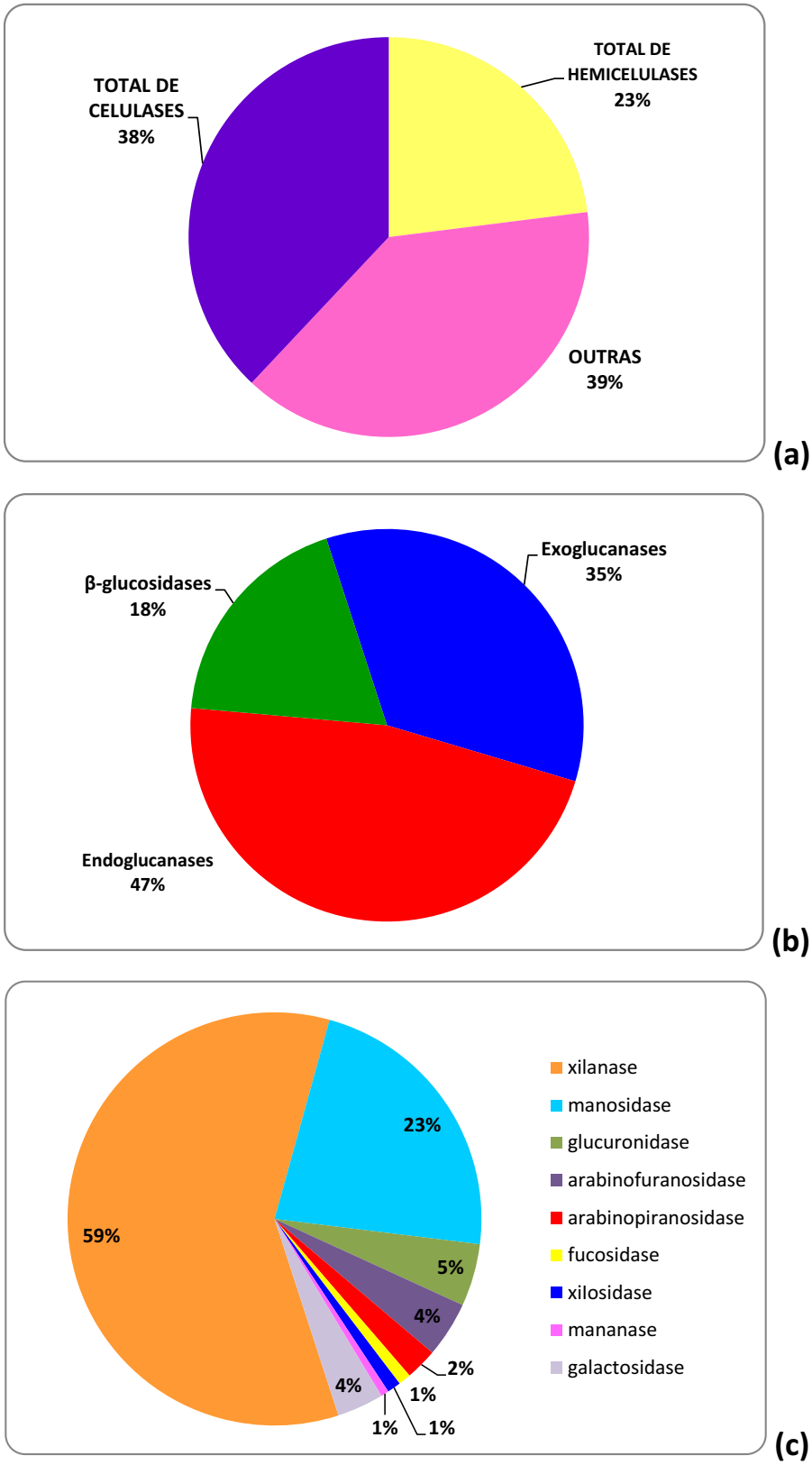


Figura 5.11. Proporções aproximadas do total de celulases e total de hemicelulases do proteoma de *T. harzianum* IOC 3844 (a). Proporções aproximadas dos grupos enzimáticos em relação ao total de celulases (b) e total de hemicelulases (c).

Notoriamente há uma predominância de endoglucanases (52%), e proporções menores de exoglucanases (22%) e beta-glucosidases (26%). Tal perfil foi coerente com estudos anteriores que evidenciaram a abundância da produção de CMCase por este microrganismo baseando-se nos dados de atividades enzimáticas (AHMED at al., 2009; CASTRO et al., 2010; ROCHA, 2010), e ainda está de acordo com os resultados de atividades celulásicas do presente estudo.

Considerando ainda os resultados de caracterização proteômica, dentre o total de hemicelulases, o maior percentual estimado foi de xilanases (59%). Por conseguinte o outro grupo mais abundante foi de manosidases (23%). Hemicelulases presentes em menores proporções foram: glucuronidase (5%), arabinofuranosidase (4%), galactosidase (4%), arabinopiranosidase (2%), mananase (1%), xilosidase (1%), e fucosidase (1%), como pode ser visualizado na figura 5.11c. O considerável conteúdo de xilanases condiz com a elevada atividade xilanásica previamente observada neste estudo.

Por fim, as proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua função biológica, conforme mostra detalhadamente a tabela 5.12.

Vale ressaltar também que no secretoma de *T. harzianum* foram detectadas proteínas que atualmente são grandes alvos de estudo em diversos países, devido a recentes descobertas da importância de tais proteínas na hidrólise enzimática: swolenina (proteína acessória na amorfogênese), GH 61 (monooxigenases polissacarídicas líticas cobre-dependentes (família AA9)) e CBM (módulo de ligação ao carboidrato).

Conclui-se, portanto, que os dados de composição proteômica apresentados aqui facilitaram a identificação de proteínas essenciais na hidrólise da biomassa lignocelulósica.

Tabela 5.12. Lista de proteínas do secretoma de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtidas a partir do cultivo em celulignina parcialmente deslignificada.

Descrição	Acesso NCBI	Espécie em que foi identificada proteína homológa	sequências de peptídeos	Nome	Família
Celulases					
Triha1|120460|estExt_Genewise1Plus.C_10_t10082	ADH04808.1	*[Trichoderma harzianum]*	15	celobiohidrolase	GH 7
Triha1|116784|estExt_Genewise1Plus.C_7_t10094	ADC83999.1	*[Trichoderma reesei]*	10	celobiohidrolase II	GH 6
Triha1|103209|estExt_Genewise1Plus.C_1_t10404	EHK22982.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	21	glucan 1,4-b-glucosidase (EC 3.2.1.74)	GH 3
Triha1|103206|estExt_Genewise1Plus.C_1_t10401	EHK22983.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	17	exo-1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.-)	GH 3
Triha1|116803|estExt_Genewise1Plus.C_7_t10116	AAR29981.1	*[Trichoderma sp. C-4]*	7	endo-1,4-beta-glucanase (EC 3.2.1.4)	GH 5
Triha1|106886|estExt_Genewise1Plus.C_2_t30451	EHK15362.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	15	endo-b-1,3-glucanase (EC 3.2.1.39)	GH 55
Triha1|109090|estExt_Genewise1Plus.C_3_t20235	EHK26379.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	6	exo-b-1,4-glucanase / celodextrinase (EC 3.2.1.74)	GH 5
Triha1|10798|gm1.10798_g	CAC80493.1	*[Trichoderma harzianum]*	7	a-1,3-glucanase (EC 3.2.1.59)	GH 71
Triha1|124815|estExt_Genewise1Plus.C_15_t10219	EHK18735.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	3	endo-b-1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73)	GH 7
Triha1|120448|estExt_Genewise1Plus.C_10_t10070	EHK20790.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	9	glucana endo-1,6-b-glucosidase (EC 3.2.1.75)	GH 5
Triha1|105251|estExt_Genewise1Plus.C_1_t60186	EHK20387.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	15	glucana 1,3-b-glucosidase (EC 3.2.1.58)	GH 3
Triha1|10756|gm1.10756_g	EHK46735.1	*[Trichoderma atroviride IMI 206040]*	12	b-glucosidase (EC 3.2.1.21)	GH 3
Triha1|229251|CE59402_203020	AFK32784.1	*[Trichoderma harzianum]*	4	endo-1,4-beta-glucanase	GH 55
Triha1|122234|estExt_Genewise1Plus.C_11_t20477	EHK17391.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	6	glucana endo-1,3-b-glucosidase (EC 3.2.1.39)	GH 17
Triha1|101618|e_gw1.35.67.1	CAA05375.1	*[Trichoderma harzianum]*	5	beta-1,3 exoglucanase	GH 55
Triha1|112872|estExt_Genewise1Plus.C_4_t50241	EHK21591.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	exo-b-1,3-glucanase (EC 3.2.1.58)	GH 55
Triha1|123352|estExt_Genewise1Plus.C_13_t10093	EHK27028.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	3	endo-1,3(4)-b-glucanase (EC 3.2.1.6)	GH 16
Triha1|100045|e_gw1.25.137.1	EHK21128.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	a-1,3-glucanase (EC 3.2.1.59)	GH 71
Triha1|10869|gm1.10869_g	EHK21040.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	4	celulose b-1,4-celobiosidase (EC 3.2.1.91)	GH 5
Triha1|120932|estExt_Genewise1Plus.C_10_t20161	EHK20867.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	b-1,3-glucanase (EC 3.2.1.39)	GH 64
Triha1|110321|estExt_Genewise1Plus.C_3_t50111	EGR49603.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	3	endo-b-1,3-glucanase (EC 3.2.1.39)	GH 81
Triha1|119342|estExt_Genewise1Plus.C_8_t30165	ACM42428.1	*[Trichoderma harzianum]*	2	beta-1,6-glucanase BG16.1	GH 5
Triha1|101123|e_gw1.31.168.1	EHK21005.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	3	b-1,3-glucanase (EC 3.2.1.39)	GH 64
Triha1|184212|CE14363_62673	EHK22586.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	a-1,3-glucanase (EC 3.2.1.59)	GH 71

Tabela 5.12. Lista de proteínas do secretoma de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtidas a partir do cultivo em celulignina parcialmente deslignificada (continuação).

Hemicelulases					
Triha1|120402|estExt_Genewise1Plus.C_10_t10012	EHK16138.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	14	endo-1,3-b-xilanase (EC 3.2.1.32)	GH 10
Triha1|112835|estExt_Genewise1Plus.C_4_t50187	EHK24192.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	15	a-manosidase (EC 3.2.1.24)	GH 92
Triha1|323801|CE153952_415	EHK46770.1	*[Trichoderma atroviride IMI 206040]*	3	xilanase (EC 3.2.1.8)	GH 11
Triha1|115098|estExt_Genewise1Plus.C_6_t10226	ACF40831.1	*[Trichoderma harzianum]*	3	endo-1,4-beta-xilanase (EC 3.2.1.8)	GH 11
Triha1|10694|gm1.10694_g	EHK46786.1	*[Trichoderma atroviride IMI 206040]*	12	xilan 1,4-b-xilosidase (EC 3.2.1.37)	GH 3
Triha1|113626|estExt_Genewise1Plus.C_5_t20203	EHK23412.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	15	a-1,2-manosidase (EC 3.2.1.-)	GH 92
Triha1|100767|e_gw1.29.47.1	EHK21505.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	7	a-manosidase (EC 3.2.1.113)	GH 47
Triha1|122945|estExt_Genewise1Plus.C_12_t20196	EHK19501.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	11	b-manosidase (EC 3.2.1.25)	GH 2
Triha1|10796|gm1.10796_g	EHK20487.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	4	a-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	GH 62
Triha1|105272|estExt_Genewise1Plus.C_1_t60207	EHK20380.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	7	manosil-oligosacarídeo a-1,3-manosidase (EC 3.2.1.-)	GH 92
Triha1|114950|estExt_Genewise1Plus.C_6_t10046	EHK25848.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	4	manana endo-b-1,4-manosidase (EC 3.2.1.78)	GH 5
Triha1|119253|estExt_Genewise1Plus.C_8_t30050	EHK18603.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	5	xiloglucanase (EC 3.2.1.151)	GH 74
Triha1|117656|estExt_Genewise1Plus.C_7_t30138	EHK18217.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	4	b-L-arabinopiranosidase (EC 3.2.1.88)	GH 27
Triha1|123243|estExt_Genewise1Plus.C_12_t30056	EHK21668.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	a-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	GH 62
Triha1|10486|gm1.10486_g	EHK20957.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	xilanase (EC 3.2.1.8)	GH 11
Triha1|10005|gm1.10005_g	EHK21440.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	3	a-1,2-L-fucosidase (EC 3.2.1.63)	GH 95
Triha1|105248|estExt_Genewise1Plus.C_1_t60183	EHK20391.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	b-xilosidase (EC 3.2.1.37)	GH 54
Triha1|104790|estExt_Genewise1Plus.C_1_t50176	EHK22230.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	a-1,6-mananase (EC 3.2.1.101)	GH 76

Monooxigenases polissacarídicas líticas cobre-dependentes (família AA9)					
Triha1|10692|gm1.10692_g	ACH92573.1	*[Trichoderma sp. SSL]*	2	endoglucanase IV	GH 61
Triha1|101705|e_gw1.36.19.1	ACD36971.1	*[Hypocrea rufa]*	1	endoglucanase VII	GH 61

CBM					
Triha1|10693|gm1.10693_g	EHK46785.1	*[Trichoderma atroviride IMI 206040]*	3	módulo de ligação ao carboidrato família 1 (proteína)	CBM 1
Triha1|124136|estExt_Genewise1Plus.C_14_t10128	EHK48447.1	*[Trichoderma atroviride IMI 206040]*	1	módulo de ligação ao carboidrato família 13 (proteína)	CBM 13

Tabela 5.12. Lista de proteínas do secretoma de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtidas a partir do cultivo em celulignina parcialmente deslignificada (continuação).

Outras glicosil hidrolases					
Triha1|112350|estExt_Genewise1Plus.C_4_t40153	EHK25059.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	10	glucoamilase (EC 3.2.1.3)	GH 15
Triha1|101028|e_gw1.30.34.1	AEF28840.1	*[Trichoderma harzianum]*	9	endoquitinase 42	GH 18
Triha1|122852|estExt_Genewise1Plus.C_12_t20082	EHK19699.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	7	b-1,3-glucanosiltransglicosilase (EC 2.4.1.-)	GH 72
Triha1|103903|estExt_Genewise1Plus.C_1_t30220	EHK22641.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	8	b-galactosidase (EC 3.2.1.23)	GH 2
Triha1|36212|gw1.11.37.1	EHK17396.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	4	quitinase (EC 3.2.1.14)	GH 18
Triha1|118988|estExt_Genewise1Plus.C_8_t20244	EHK18477.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	endo-b-N-acetilglucosaminidase (EC 3.2.1.96)	GH 18
Triha1|111066|estExt_Genewise1Plus.C_4_t10191	EHK25053.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	endo-b-1,3-galactanase (EC 3.2.1.181)	GH 16
Triha1|125509|estExt_Genewise1Plus.C_16_t10292	EHK24055.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	3	lisozima	GH 25
Triha1|111860|estExt_Genewise1Plus.C_4_t30078	EHK24618.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	quitosanase (EC 3.2.1.132)	GH 5
Triha1|123183|estExt_Genewise1Plus.C_12_t20468	EHK19401.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	b-1,3-glucanosiltransglicosilase (EC 2.4.1.-)	GH 72
Triha1|108008|estExt_Genewise1Plus.C_2_t60214	EHK16564.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	b-N-acetilhexosaminidase (EC 3.2.1.52)	GH 3
Triha1|114917|estExt_Genewise1Plus.C_6_t10004	EHK25869.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	b-glucuronidase (EC 3.2.1.31)	GH 2
Triha1|120905|estExt_Genewise1Plus.C_10_t20131	EHK20848.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	concanavalina B	GH 18
Triha1|105375|estExt_Genewise1Plus.C_1_t60323	EHK20432.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	liqueninase (EC 3.2.1.73)	GH 17
Triha1|110801|estExt_Genewise1Plus.C_3_t60148	AAM93195.1	*[Trichoderma harzianum]*	1	quitinase 37 kDa	GH 18
Proteína acessória na amorfogênese					
Triha1|120451|estExt_Genewise1Plus.C_10_t10073	CAB92328.1	*[Trichoderma reesei]*	5	swolenina	Swolenina
Carboidrato esterases					
Triha1|114953|estExt_Genewise1Plus.C_6_t10049	EHK25849.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	6	4-O-metil-glucuronoil metilesterase	CE 15
Triha1|102504|e_gw1.84.3.1	EHK19842.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	2	acetil xilana esterase	CE 1
Triha1|118641|estExt_Genewise1Plus.C_8_t10278	EHK18653.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	carboxilesterase	CE 5
Lipases					
Triha1|103359|estExt_Genewise1Plus.C_1_t20096	EJT70228.1	*[Gaeumannomyces graminis var. tritici R3-111a-1]*	2	lipase 4	Lipase
Triha1|109639|estExt_Genewise1Plus.C_3_t30332	EGR49340.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	1	lipase extracelular	Lipase
Triha1|120371|estExt_Genewise1Plus.C_9_t30151	EIT79876.1	*[Aspergillus oryzae 3.042]*	2	fosfolipase C	Lipase

Tabela 5.12. Lista de proteínas do secretoma de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtidas a partir do cultivo em celulignina parcialmente deslignificada (continuação).

Oxidases					
Triha1|117620|estExt_Genewise1Plus.C_7_t30096	CAL90884.1	*[Trichoderma reesei]*	3	tirosinase 2	Oxidase
Triha1|120579|estExt_Genewise1Plus.C_10_t10254	EFY94324.1	*[Metarhizium anisopliae ARSEF 23]*	4	amino oxidase (contendo flavina)	Oxidase
Triha1|120582|estExt_Genewise1Plus.C_10_t10257	AAQ11414.1	*[Trichoderma pseudokoningii]*	1	L-amino ácido oxidase	Oxidase
Desidrogenases					
Triha1|110997|estExt_Genewise1Plus.C_4_t10115	EGR46829.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	1	Glicose sorbosone dehidrogenase	Desidrogenase
Triha1|481865|fgenesh1_pg.6_#_237	EFZ01950.1	*[Metarhizium anisopliae ARSEF 23]*	1	malato desidrogenase	Desidrogenase
Peptidases					
Triha1|103020|estExt_Genewise1Plus.C_1_t10143	CAC80694.2	*[Trichoderma harzianum]*	6	tripsina-protease	Protease
Triha1|404041|CE234192_10125	EFY88756.1	*[Metarhizium acridum CQMa 102]*	6	carboxipeptidase	Protease
Triha1|101773|e_gw1.37.44.1	EJT74184.1	*[Gaeumannomyces graminis var. tritici R3-111a-1]*	6	carboxipeptidase A	Protease
Triha1|41275|gw1.7.251.1	EIW86974.1	*[Coniophora puteana RWD-64-598 SS2]*	6	aspártico proteinase	Protease
Triha1|110776|estExt_Genewise1Plus.C_3_t60120	CAL25580.1	*[Trichoderma harzianum]*	3	serina endopeptidase	Protease
Triha1|128354|estExt_Genewise1Plus.C_250332	EFY85058.1	*[Metarhizium acridum CQMa 102]*	2	precursor da aspártico protease	Protease
Triha1|101392|e_gw1.33.60.1	EFY96733.1	*[Metarhizium anisopliae ARSEF 23]*	1	serina proteinase	Protease
Triha1|100200|e_gw1.26.164.1	EFX03716.1	*[Grosmannia clavigera kw1407]*	1	subtilisina-protease	Protease
Triha1|111837|estExt_Genewise1Plus.C_4_t30052	CAL25577.1	*[Trichoderma harzianum]*	1	serina endopeptidase	Protease
Triha1|122108|estExt_Genewise1Plus.C_11_t20332	CCF41773.1	*[Colletotrichum higginsianum]*	2	metaloprotease família M6	Protease

Tabela 5.12. Lista de proteínas do secretoma de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtidas a partir do cultivo em celulignina parcialmente deslignificada (continuação).

Outras				
Triha1|114654|estExt_Genewise1Plus.C_5_t40336	EGR47244.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	11	ceramidase
Triha1|115790|estExt_Genewise1Plus.C_6_t20484	EGR45612.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	6	proteína de parede celular
Triha1|100219|e_gw1.26.8.1	CCD34913.1	*[Botryotinia fuckeliana]*	2	BcPKS5, poliquetídeo sintase
Triha1|124605|estExt_Genewise1Plus.C_14_t20143	EFQ25967.1	*[Glomerella graminicola M1.001]*	6	proteína de ligação ao soluto extracelular (família 1)
Triha1|477275|fgenesh1_pg.1_#_851	EJT77670.1	*[Gaeumannomyces graminis var. tritici R3-111a-1]*	6	3-carboximuconato ciclase
Triha1|111400|estExt_Genewise1Plus.C_4_t20068	AAL47843.1	*[Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici]*	1	proteína precursora da matrix extracelular
Triha1|123807|estExt_Genewise1Plus.C_13_t20107	EGR44626.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	3	amidase
Triha1|123382|estExt_Genewise1Plus.C_13_t10124	EFY99487.1	*[Metarhizium anisopliae ARSEF 23]*	3	aminotransferase
Triha1|10063|gm1.10063_g	EFX03752.1	*[Grosmannia clavigera kw1407]*	1	ribonuclease t2
Triha1|105825|estExt_Genewise1Plus.C_2_t10269	EGR50745.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	2	proteína ácido fosfatase
Triha1|120707|estExt_Genewise1Plus.C_10_t10400	EGY17007.1	*[Verticillium dahliae VdLs.17]*	2	proteína contendo domínio LisM
Triha1|249865|CE80016_16439	EFQ29980.1	*[Glomerella graminicola M1.001]*	1	metiltransferase
Triha1|121060|estExt_Genewise1Plus.C_10_t20319	CAC80491.1	*[Trichoderma harzianum]*	1	P4
Triha1|105299|estExt_Genewise1Plus.C_1_t60237	EFZ00744.1	*[Metarhizium anisopliae ARSEF 23]*	1	fosfatidilglicerol / fosfatidilinositol transfer proteína
Triha1|100399|e_gw1.27.128.1	ABS59365.1	*[Trichoderma atroviride]*	1	hidrofobina
Triha1|110662|estExt_Genewise1Plus.C_3_t50488	EKG20858.1	*[Macrophomina phaseolina MS6]*	1	Six-hairpin glicosidase
Triha1|486703|fgenesh1_pg.18_#_23	AAL37300.1	*[Podospora anserina]*	1	beta transducina
Triha1|112544|estExt_Genewise1Plus.C_4_t40361	XP_747744.1	*[Aspergillus fumigatus Af293]*	1	transportador multidroga MFS
Triha1|118360|estExt_Genewise1Plus.C_7_t40399	AAL37301.1	*[Podospora anserina]*	1	beta transducina
Triha1|105351|estExt_Genewise1Plus.C_1_t60298	EFY86053.1	*[Metarhizium acridum CQMa 102]*	1	proteína de domínio RNP

Tabela 5.12. Lista de proteínas do secretoma de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 obtidas a partir do cultivo em celulignina parcialmente deslignificada (continuação).

Proteínas hipotéticas				
Triha1|115344|estExt_Genewise1Plus.C_6_t10494	EHK25695.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	16	proteína hipotética
Triha1|122900|estExt_Genewise1Plus.C_12_t20137	EHK19700.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	4	proteína hipotética
Triha1|118477|estExt_Genewise1Plus.C_8_t10082	EGR53026.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	7	proteína hipotética
Triha1|3036|gm1.3036_g	EHK26144.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	4	proteína hipotética
Triha1|117935|estExt_Genewise1Plus.C_7_t30448	EHK17489.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	3	proteína hipotética
Triha1|10757|gm1.10757_g	EHK20526.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	3	proteína hipotética
Triha1|119245|estExt_Genewise1Plus.C_8_t30036	CCF32086.1	*[Colletotrichum higginsianum]*	1	proteína hipotética
Triha1|116772|estExt_Genewise1Plus.C_7_t10081	EHK17819.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	proteína hipotética
Triha1|106935|estExt_Genewise1Plus.C_2_t40001	EHK15790.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	proteína hipotética
Triha1|118476|estExt_Genewise1Plus.C_8_t10081	EFQ35944.1	*[Glomerella graminicola M1.001]*	1	proteína hipotética
Triha1|118193|estExt_Genewise1Plus.C_7_t40221	EHK17587.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	proteína hipotética
Triha1|116081|estExt_Genewise1Plus.C_6_t30300	EHK25379.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	proteína hipotética
Triha1|15070|estExt_Genemark1.C_4_t10151	EGR52153.1	*[Trichoderma reesei QM6a]*	1	proteína hipotética
Triha1|420195|CE250346_13697	EHK23954.1	*[Trichoderma virens Gv29-8]*	1	proteína hipotética

5.9 Hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum*

5.9.1 Efeito do grau de deslignificação da celulignina

Na literatura há controvérsias em relação à necessidade de deslignificar o material lignocelulósico, uma vez que o conceito de Biorrefinaria está muito associado a produção de biocombustíveis que se enquadram no grupo de produtos de baixo valor agregado. O agente alcalino utilizado no pré-tratamento do bagaço possui eficiente função, mas pode onerar o custo de produção. Em contrapartida, algumas pesquisas têm apontado que a deslignificação melhora a acessibilidade das enzimas à fibra celulósica (KAYA *et al*., 2000; KRISTENSEN *et al*., 2007; BARCELOS et. al., 2012).

No presente estudo, avaliou-se experimentalmente o efeito da deslignificação na hidrólise enzimática usando celulases de *T. harzianum*. Para isso, utilizou-se diferentes estoques de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) tratados com diferentes concentrações de NaOH: 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2% e 4%. Os experimentos foram conduzidos com elevada carga de sólidos (100 g de substrato/L), objetivando simular o bioprocesso em escala industrial, visto que altos teores de sólidos geralmente são mais convenientes em bioprocessos em grande escala porque possibilitam maior aproveitamento da biomassa em um mesmo biorreator (VASQUEZ *el al.*, 2007).

Os resultados mostraram que as maiores eficiências de hidrólise ocorreram para os tratamentos de 1%, 2% e 4% de NaOH (Figura 5.12). O pré-tratamento das amostras com hidróxido de sódio 0,5% proporcionou um bom desempenho hidrolítico nas primeiras 12 horas, contudo, após este período

houve uma redução na eficiência hidrolítica, gerando concentrações mais reduzidas de glicose. Já na hidrólise enzimática de CPD após tratamento com 0,25% de NaOH foram observados concentrações de glicose mais reduzidas que a anterior, enquanto que para 0,10% de NaOH foram obtidas as menores concentrações de glicose dentre todos os tratamentos.

Após 72 horas de hidrólise as concentrações de glicose foram de 13,9 g/L (NaOH 0,1%); 14,7 g/L (NaOH 0,25%); 22,0 g/L (NaOH 0,50%); 27,7 g/L (NaOH 1%); 28,1 g/L (NaOH 2%); 28,3 g/L (NaOH 4%). Quanto ao experimento controle, em que utilizou-se bagaço de cana sem pré-tratamento, o máximo valor de glicose obtido em 72 horas foi de 2,5 g/L.

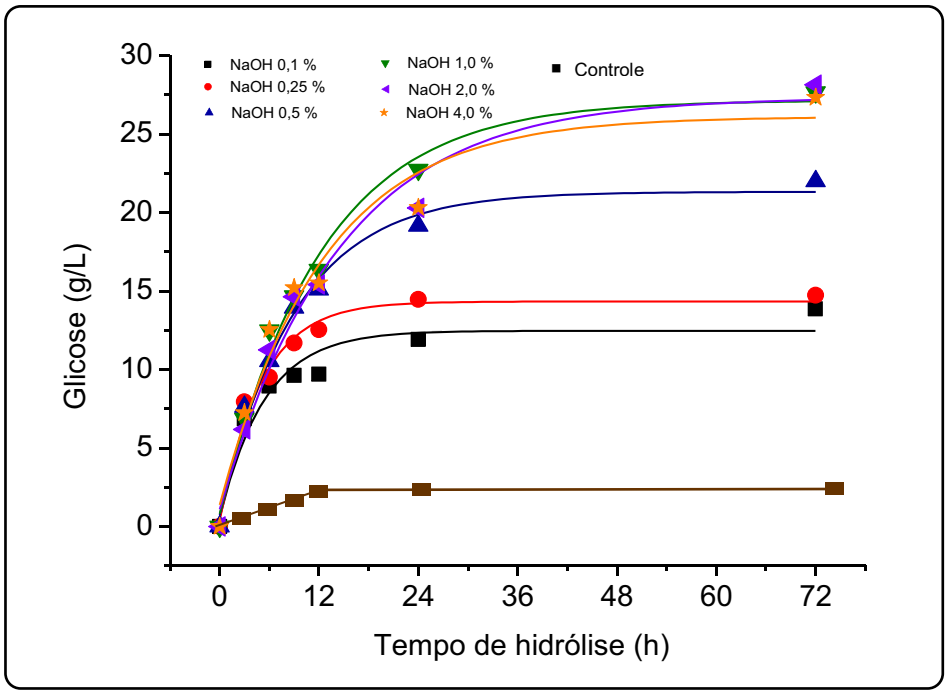


Figura 5.12. Glicose liberada durante a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) com diferentes graus de deslignificação utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum* (temperatura: 50°C; agitação: 200 rpm; concentração de substrato: 100 g/L; carga enzimática: 25 FPU/g de substrato).

O mesmo padrão observado neste estudo foi relatado por Barcelos et al. (2012), que mostraram a imprescindibilidade da deslignificação na hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada utilizando a enzima comercial *Multifect*®. Os autores constataram que a concentração de glicose liberada a partir da hidrólise enzimática de bagaço de cana foi significativamente maior após pré-tratamento alcalino em relação à hidrólise enzimática de amostras não tratadas, mesmo com o aumento da carga de enzimas.

Em outro trabalho, Maeda et al. (2011) avaliaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com diferentes graus de deslignificação utilizando uma mistura de celulases. Os autores mostraram as taxas de hidrólise de celulignina pré-tratada com 1% ou 4% de NaOH foram comparáveis, ao passo que pré-tratamento das amostras com hidróxido de sódio a 0,5% levaram a eficiência de hidrólise ligeiramente reduzida, e 0,1% foi pouco eficiente.

A literatura relata que a lignina residual pode adsorver as celulases irreversivelmente, diminuindo a carga enzimática disponível para a hidrólise (SUTCLIFFE & SADDLER, 1986). Kaya et al. (2000) verificaram que durante a hidrólise enzimática da celulignina, β-glucosidases têm mais afinidade de ligação com lignina do que com carboidratos, gerando ligações improdutivas, o que resulta em menor eficiência de sacarificação. Atualmente, tem sido demonstrado que a adição de surfactantes não iônicos na hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos aumenta a conversão da celulose em açúcares fermentáveis (KRISTENSEN *et al.*, 2007). Esta seria uma solução recomendada para melhorar a hidrólise da celulose quando materiais lignocelulósicos contendo vestígios de lignina são usados.

Adicionalmente, deve-se considerar que nas condições de maior deslignificação, a celulose é mais amorfa. Estudos tem mostrado que a celulose amorfa é mais facilmente atacada por enzimas do que a celulose cristalina. A arquitetura altamente ordenada das microfibrilas de celulose é uma das principais barreiras enfrentadas por celulases que limita o seu acesso à grande parte da celulose. Em algumas regiões, as cadeias de celulose são agregadas com tanta força que pequenas moléculas como a água não podem penetrar nessas estruturas, e apenas as moléculas de celulose localizadas na superfície seriam suscetíveis à ação de enzimas degradadoras (ARANTES & SADLER, 2010; KRÄSSING, 1993). Possivelmente por isso foram obtidas concentrações similares de açúcares às 3 horas de reação, independente da carga enzimática utilizada. Nessa etapa, ocorre ainda o ataque da celulose de superfície. Mansfield *et al*. (1999) mostraram que a capacidade de celobiohidrolase *T. reesei* para alcançar as cadeias de celulose dentro das microfibrilas é significativamente limitada, possivelmente devido à acessibilidade das enzimas apenas às camadas superficiais das microfibrilas. Quando a hidrólise ocorre apenas na superfície da celulose, a área superficial disponível determina a taxa de hidrólise máxima que pode ser alcançada (ARANTES & SADLER, 2010).

Quanto aos açúcares redutores totais, os perfis cinéticos podem ser observados na figura 5.13 Após 72 horas de hidrólise foram obtidas as seguintes concentrações de açúcares redutores: 20,9 g/L (NaOH 0,1%); 24,3 g/L (NaOH 0,25%); 32,2 g/L (NaOH 0,50%); 38,3 g/L (NaOH 1%); 38,1 g/L (NaOH 2%) e 38,4 g/L (NaOH 4%). Na condição controle (sem pré-tratamento), a concentração de açúcares redutores totais após 72 horas foi de 3,4 g/L. A presença destes açúcares remete à presença de celobiose e outros oligassacarídeos que permaneceram durante a hidrólise, e que não geraram

glicose. De fato, a produção de açúcares redutores foi menor quanto menos deslignificada foi a amostra. Certamente a lignina residual agiu como uma barreira física dificultando o acesso das enzimas à celulose, corroborando os resultados obtidos por pesquisadores do LADEBIO/UFRJ (BARCELOS et. al., 2012), e confirmando a importância do pré-tratamento dessa biomassa lignocelulósica para a produção de glicose.

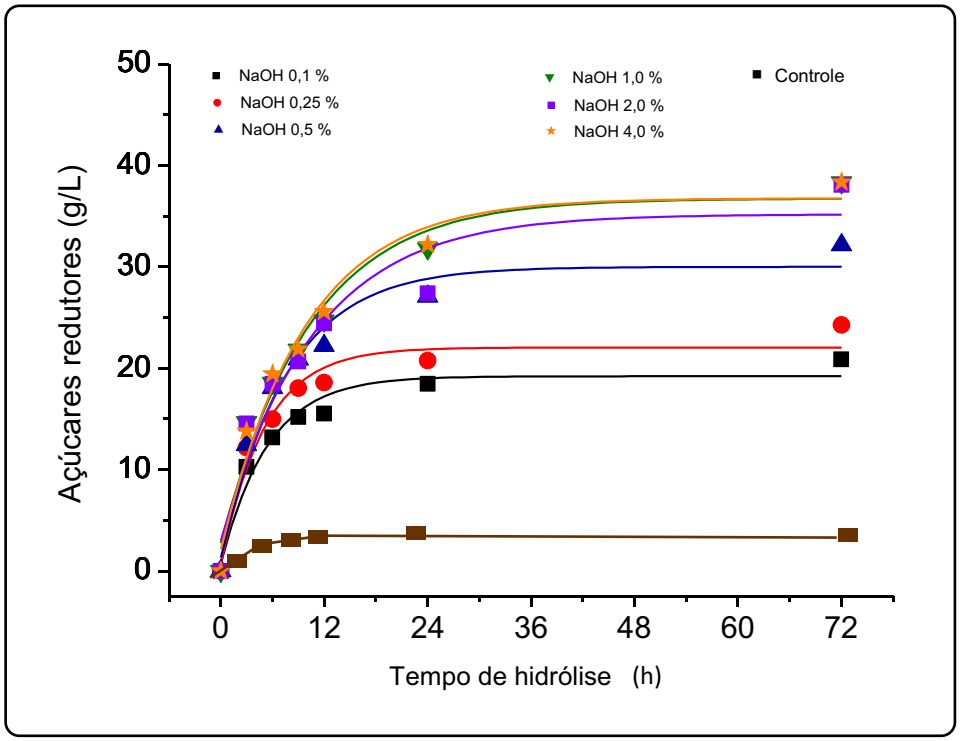


Figura 5.13. Açúcares redutores liberados durante a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) com diferentes graus de deslignificação utilizando o preparado celulásico de *T. harzianum* (temperatura: 50°C; agitação: 200 rpm; concentração de substrato: 100 g/L; carga enzimática: 25 FPU/g de substrato).

5.9.2 Comparação com um preparado celulásico comercial e efeito da adição de β-glucosidase

Comparando-se os perfis cinéticos da hidrólise enzimática do preparado *Ladebio Th* e da enzima comercial *Multifect*® observa-se que tais preparados enzimáticos apresentaram desempenho catalítico semelhante. Após 24 horas de hidrólise, as concentrações de glicose foram: 34,2 g/L (*Ladebio Th* em CPD) e 38,9 g/L (*Multifect*® em CPD). A figura 5.14 ilustra os perfis cinéticos da liberação de glicose durante a hidrólise enzimática com ambos preparados celulásicos.

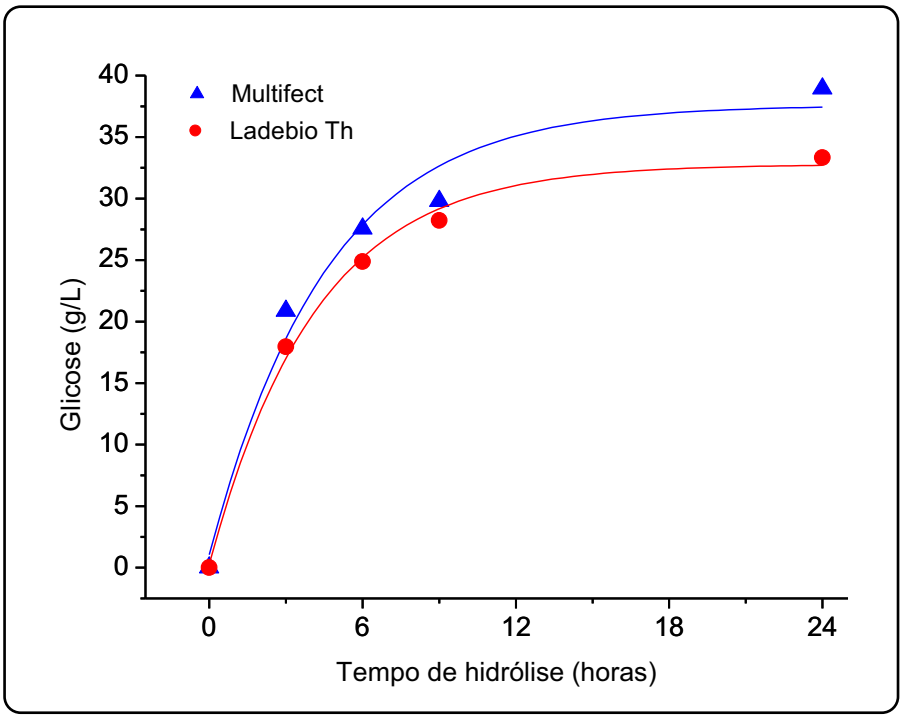


Figura 5.14. Glicose liberada durante a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) utilizando os preparados celulásicos *Ladebio Th* (de *Trichoderma harzianum*) e *Multifect*, ambos com adição de β-glucosidase comercial (temperatura: 50°C; agitação: 200 rpm; concentração de substrato: 100 g/L; carga enzimática: 25 FPU/g de substrato).

Os valores de eficiência de hidrólise indicaram que *T. harzianum* tem um competitivo complexo celulolítico para a hidrólise de CPD em comparação com o preparado enzimático comercial *Multifect*®. Após 24 horas, as eficiências de hidrólise foram de 42% (*Ladebio Th* em CPD) e 48% (*Multifect*® em CPD). Estes resultados foram similares aos encontrados por Juhász et al. (2005) que, ao procederem com a hidrólise de sabugo de milho pré-tratado (20 g/L) usando a enzima comercial Celuclast, em 24 horas, obtiveram eficiência de hidrólise de 41%. Em outro estudo, Martins et al. (2008) estudaram a hidrólise polpa de papel (20 g/L), com Celuclast, em 24 horas, obtendo uma eficiência de hidrólise de 32%. Já considerando a aplicação de celulases de *T. reesei* em substratos como celulose cristalina, sabugo de milho pré-tratado e abeto (todos em 20 g/L), Juhász *et al*. (2005) encontraram eficiências de hidrólise de 31, 59, 23 %, respectivamente. Gottschalk et al. (2010) avaliaram a hidrólise de bagaço de cana pré tratado (20 g/L), e relataram que a aplicação de celulases de *T. reesei*, após 24 horas, gerou eficiência de hidrólise de 40%. Contudo, em tais estudos previamente citados, as eficiências de hidrólise foram obtidos sobre cargas de sólidos mais reduzidas, cerca de 5 vezes menor. Assim, no presente estudo foram obtidas maiores concentrações de glicose (considerando a concentração inicial de substrato de 100 g/L), fator este relevante quando se visa à produção de etanol de segunda geração. Altas cargas de sólidos geralmente são requeridas por possibilitar maior aproveitamento da biomassa em um mesmo biorreator, desde que estejam em concentrações ótimas para o determinado bioprocesso. Contudo, é necessário observar o limite da concentração de sólidos de modo a não gerar restrições difusionais relacionadas à transferência de massa (PEREIRA Jr. et al., 2008).

A adição de β-glucosidase comercial aos meios de hidrólise enzimática gerou um efeito positivo. Especificamente para o experimento em que se utilizou a enzima de *T. harzianum*, houve um aumento de 41% na formação de glicose promovida pela adição de β-glucosidase comercial. As concentrações de glicose foram de 24,2 g/L (sem adição de β-glucosidase) e de 34,2 (com adição de β-glucosidase) após 24 horas de reação a 50°C e 200 rpm.

Tem sido mostrado que a etapa de sacarificação de celulose pode ser comprometida pelo excesso de celobiose remanescente no meio, a qual acentua a inibição da ação das enzimas endoglucanase e exoglucanase. A suplementação do meio com a enzima β-glucosidase evita, desta forma, o acúmulo de celobiose e, portanto reduz o efeito inibitório na etapa de sacarificação, contribuindo para uma maior conversão da biomassa em glicose (FERREIRA et al., 2010). No presente estudo, portanto, foi confirmada a contribuição de β-glucosidase comercial no desempenho do preparado enzimático de *T. harzianum* sobre a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada.

5.9.3 Avaliação de diferentes concentrações de substrato e diferentes cargas enzimáticas

Visando verificar o efeito da concentração de substrato e da carga enzimática na *performance* hidrolítica do preparado enzimático de *T. harzianum*, diferentes condições de hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada foram avaliadas. Para cada concentração de substrato (25 g/L, 50 g/L, ou 100 g/L) foram avaliadas três cargas enzimáticas (25 FPU/g, 50 FPU/g, ou 75 FPU/g).

Os resultados mostraram que quanto maior a concentração de substrato inicial e maior a carga enzimática, maior a produção de glicose (Figura 5.15). Após 48 h de hidrólise, as concentrações mais elevadas de glicose foram obtidas utilizando 100 g/L de substrato: 38,7 g/L (100 g/L - 25 FPU/g); 45,1 g/L (100 g/L - 50 FPU/g); 49,4 g/L (100 g/L - 75 FPU/g). Isto mostra que o extrato enzimático de *T. harzianum* é capaz de atuar sobre altas cargas de substrato, gerando concentrações de glicose mais elevadas. Quando se avaliou a concentração de substrato de 50 g/L, os teores de glicose gerados foram: 16,0 g/L (50 g/L - 25 FPU/g); 21,0 g/L (50 g/L - 25 FPU/g); 24,9 g/L (50 g/L - 75 FPU/g). Tais valores foram relativamente baixos quando comparados aos resultados de 100 g/L. E por fim, a menor concentração de substrato (25 g/L) produziu, proporcionalmente, concentrações de glicose mais reduzidas, que foram: 7,4 g/L (25 g/L - 25 FPU/g); 9,8 g/L (25 g/L - 50 FPU/g); 12,5 g/L (25 g/L - 75 FPU/g). Estas concentrações de substrato mais reduzidas (25 g/L e 50 g/L), mostraram-se menos adequadas para futuras aplicações industriais, devido aos baixos conteúdos de glicose obtidos. Como esperado, no experimento controle (sem adição de celulases), as concentrações de açúcares foram bastante reduzidas, de no máximo 2 g/L, e não foram adicionadas no gráfico a fim de facilitar a plotagem dos dados.

A produtividade volumétrica máxima de glicose foi de 1,03 $g/L.h^{-1}$, como mostra a tabela 5.13. Um resultado importante observado neste trabalho foi a alta produtividade volumétrica de glicose obtida em todos os tratamentos com alta concentração de PDC, que é um dado notável para futuras aplicações industriais.

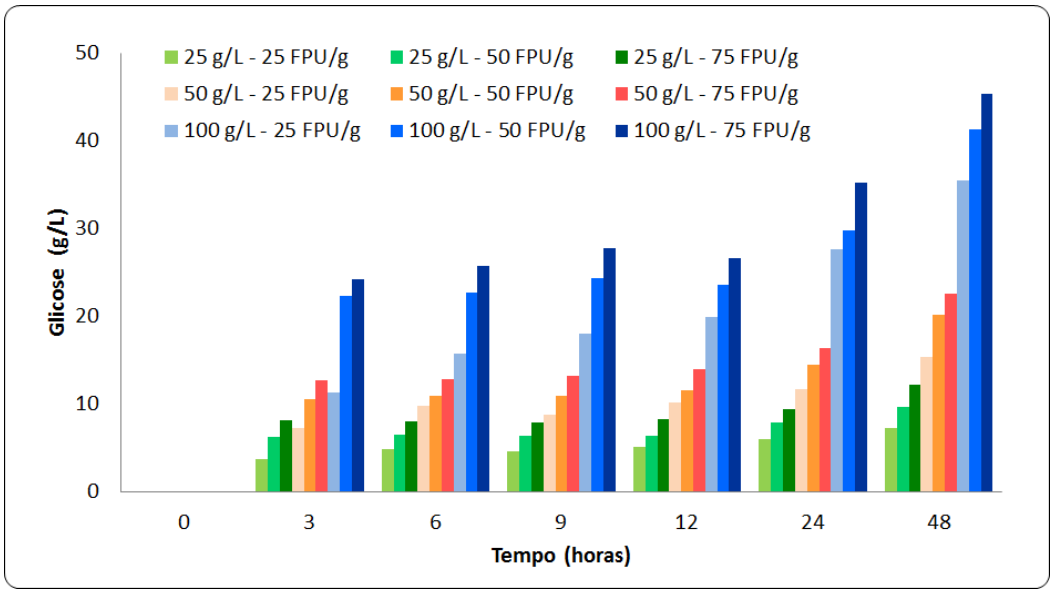


Figura 5.15. Glicose liberada durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado utilizando diferentes concentrações de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) e diferentes cargas enzimáticas de celulases de *T. harzianum* (temperatura: 50°C; agitação: 200 rpm).

Tabela 5.13 Concentração de glicose, o rendimento da hidrólise e produtividade volumétrica de glicose durante a hidrólise enzimática de lignocelulose parcialmente deslignificada (PDC) usando a enzima *T. harzianum* em diferentes concentrações de PDC (25 g/L, 50 g/L ou 100 g/L) ou cargas diferentes de enzimas (25 FPU/g, 50 FPU/g ou 75 FPU/g) ao longo de 48 horas de hidrólise enzimática.

Tratamento	Glicose (g/L)	Eficiência de hidrólise* (%)	Produtividade volumétrica ($g/L.h^{-1}$)
25 g/L - 25 FPU/g	7,44	39,81	0,16
25 g/L - 50 FPU/g	9,84	52,61	0,20
25 g/L - 75 FPU/g	12,49	66,81	0,26
50 g/L - 25 FPU/g	16,00	42,77	0,33
50 g/L - 50 FPU/g	21,01	56,19	0,44
50 g/L - 75 FPU/g	24,87	66,50	0,52
100 g/L - 25 FPU/g	38,67	51,69	0,81
100 g/L - 50 FPU/g	45,05	60,22	0,94
100 g/L - 75 FPU/g	49,40	66,04	1,03

* A eficiência de hidrólise foi calculada considerando-se 68% de celulose em CPD.

Em relação às concentrações de celobiose, pode-se observar que houve um pequeno acúmulo deste dissacarídeo nas primeiras horas de hidrólise, que foi hidrolisado a glicose na sequência, chegando a concentrações bastante

reduzidas (< 1 g/L) nas últimas horas da reação enzimática (Figura 5.16). As concentrações de celobiose foram: 0,1 g/L (25 g/L - 25 FPU/g); 0,1 g/L (25 g/L - 50 FPU/g); 0,1 g/L (25 g/L - 75 FPU/g); 0,4 g/L (50 g/L - 25 FPU/g); 0,2 g/L (50 g/L - 50 FPU/g); 0,1 g/L (50 g/L - 75 FPU/g); 1,0 g/L (100 g/L - 25 FPU/g); 0,6 g/L (100 g/L - 50 FPU/g); 0,2 g/L (100 g/L - 75 FPU/g).

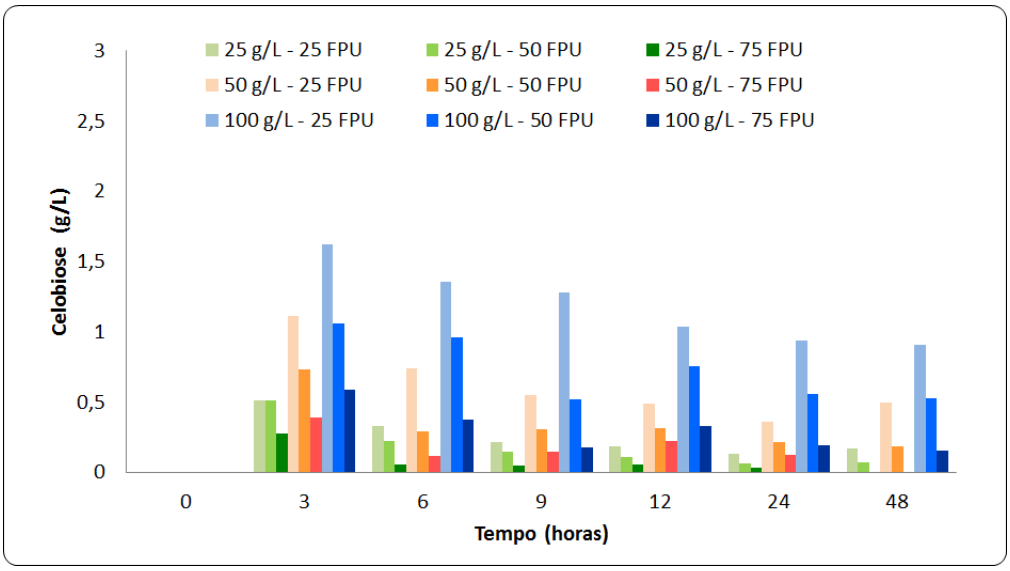


Figura 5.16. Celobiose liberada durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado utilizando diferentes concentrações de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) e diferentes cargas enzimáticas de celulases de *T. harzianum* (temperatura: 50°C; agitação: 200 rpm).

O perfil de eficiência de hidrólise enzimática (em glicose) para as diferentes condições avaliadas pode ser observado na figura 5.17.

Os valores máximos de eficiência de hidrólise atingidos em 48 horas ao avaliar diferentes concentrações de substrato e diferentes cargas enzimáticas variaram de 38% a 67%, a saber: 39,8% (25 g/L - 25 FPU/g); 52,6% (25 g/L - 50 FPU/g); 66,8% (25 g/L - 75 FPU/g); 42,8% (50 g/L - 25 FPU/g); 56,2% (50 g/L - 50 FPU/g); 66,5% (50 g/L - 75 FPU/g); 51,7% (100 g/L - 25 FPU/g); 60,2% (100 g/L - 50 FPU/g); 66,0% (100 g/L - 75 FPU/g).

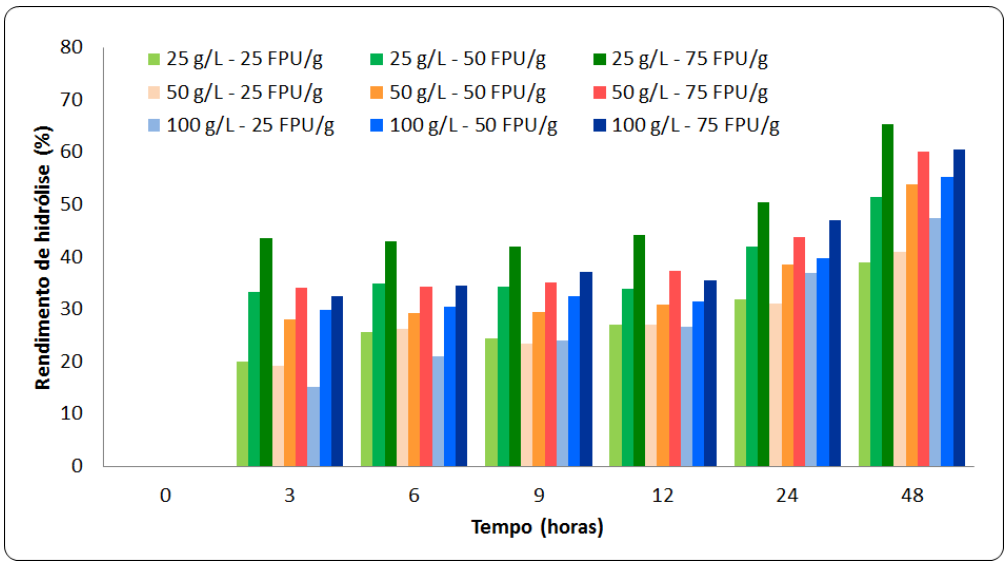


Figura 5.17. Eficiência de hidrólise (em glicose) durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado utilizando diferentes concentrações de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) e diferentes cargas enzimáticas de celulases de *T. harzianum* (temperatura: 50°C; agitação: 200 rpm).

A análise estatística mostrou que a diferença da carga enzimática foi significativa para a eficiência de hidrólise dentro de cada uma das concentrações de substrato avaliadas (tabela 5.14). Em outras palavras, quanto

Tabela 5.14. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes cargas enzimáticas dentro de cada concentração de substrato. DMS (Tukey) = 2,1526

Amostra	Tratamento	Média de eficiência de hidrólise (%)
B (ENZIMA) DENTRO DE A1 (SUBSTRATO 25 g/L)	3	41,3 A
	2	32,8 B
	1	24,0 C
B (ENZIMA) DENTRO DE A2 (SUBSTRATO 50 g/L)	3	34,9 A
	2	30,0 B
	1	24,0 C
B (ENZIMA) DENTRO DE A3 (SUBSTRATO 100 g/L)	3	35,3 A
	2	31,3 B
	1	24,5 C

Tratamentos: (1) 25 FPU/g; (2) 50 FPU/g; e (3) 75 FPU/g. Letras diferentes (A, B ou C) indicam que há diferença estatística.

maior a carga enzimática, maior a eficiência de hidrólise. Nota-se que os valores máximos foram logrados no tratamento 3, referente a maior carga enzimática (75 FPU/g).

Avaliando-se estatisticamente as diferentes concentrações de substrato (Tabela 5.15), verificou-se que não houve diferença significativa para a eficiência de hidrólise dos experimentos com 25, 50 ou 100 g/L quando foi testada a carga enzimática de 25 FPU/g. Já para a carga enzimática de 75 FPU/g, ao aumentar a concentração de substrato de 25 g/L para 50 g/L e 100 g/L, ocorreu uma redução significativa da eficiência de hidrólise, possivelmente devido às limitações de transferência de massa geradas pela menor área superficial acessível de substrato (ARANTES & SADLER, 2010), ou por ligações improdutivas das celulases com a lignina (KAYA et al., 2000). Esse mesmo perfil foi observado para a carga enzimática de 50 FPU/g.

Tabela 5.15. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes concentrações de substrato dentro de cada carga enzimática. DMS (Tukey) = 2,1526

Amostra	Tratamento	Média de eficiência de hidrólise (%)
A (SUBSTRATO) DENTRO DE B1 (ENZIMA 25 FPU/g)	3	24,5 A
	1	24,0 A
	2	24,0 A
A (SUBSTRATO) DENTRO DE B2 (ENZIMA 50 FPU/g)	1	32,8 A
	3	31,3 AB
	2	30,0 B
A (SUBSTRATO) DENTRO DE B3 (ENZIMA 75 FPU/g)	1	41,3 A
	3	35,3 B
	2	34,9 B

Tratamentos: (1) 25 g/L; (2) 50 g/L; e (3) 100 g/L. Letras diferentes (A, B ou C) indicam que há diferença estatística.

Apesar da eficiência de hidrólise ter sido reduzido com o aumento da concentração de sólidos, foi notório que quanto mais substrato presente, maior foi a quantidade de glicose liberada. Esse fenômeno pode ser melhor observado graficamente na figura 5.18. Observa-se que a eficiência de hidrólise tende a diminuir quando cargas de sólidos mais elevadas são utilizadas. No entanto, o aumento da carga de sólidos levou ao aumento expressivo da concentração de glicose para as três concentrações de substrato avaliadas (25 g/L, 50 g/L e 100 g/L), denotando que dentro da faixa de estudo, em termos de quantidade de glicose produzida, é interessante usar altas concentrações de substrato.

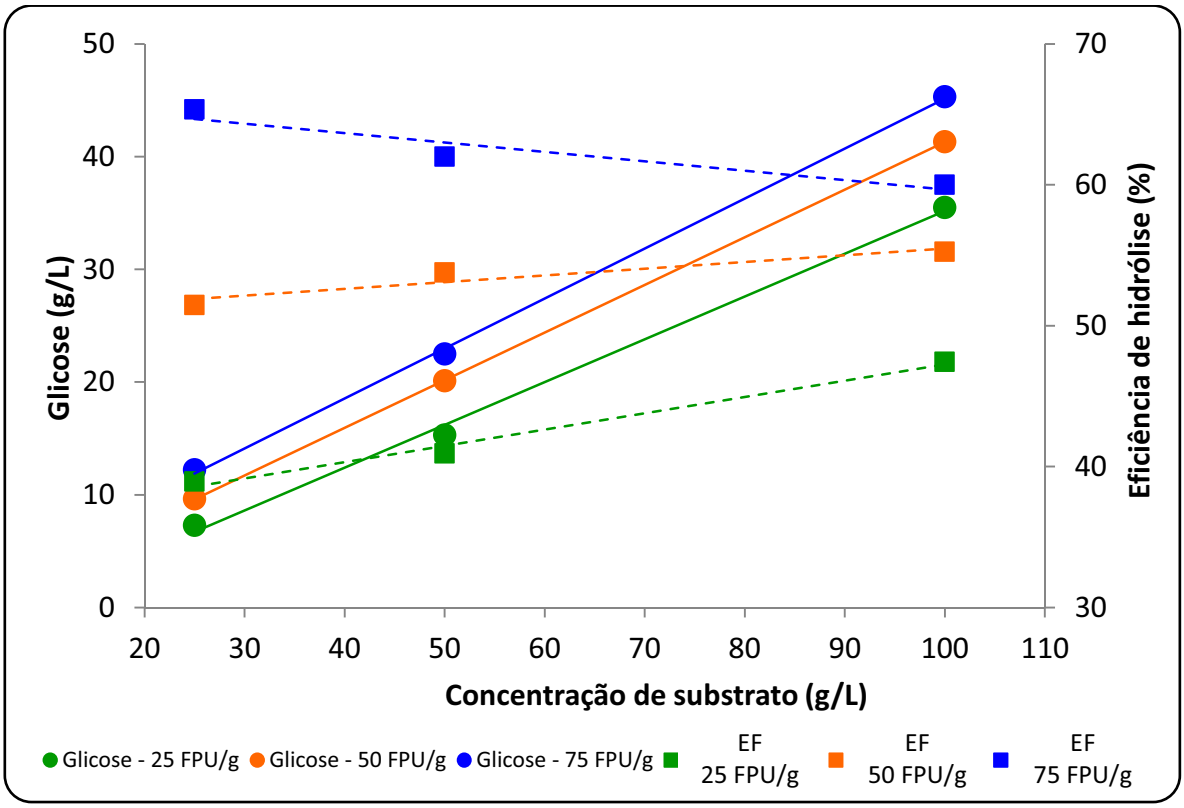


Figura 5.18. Correlação entre a concentração de substrato inicial *versus* a concentração de glicose produzida e eficiência de hidrólise. EF: eficiência de hidrólise.

Tendo em vista o tempo de hidrólise (Tabelas 5.16 e 5.17), de modo geral, tanto para as diferentes cargas enzimáticas, assim como para as distintas concentrações de substrato, a eficiência de hidrólise aumentou gradualmente até 12 horas de hidrólise enzimática. De 12 horas para 24 horas houve um aumento significativo, assim com de 24 horas para 48 horas. As eficiências de hidrólise máximos depois de 48 horas foram de: 65,3% (25 g/L- 75 FPU/g), 60,2% (50 g/L- 75 FPU/g) e 60,6% (100 g/L- 75 FPU/g).

Tabela 5.16. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes tempos dentro de cada carga enzimática. DMS (Tukey) = 4,2290

Amostra	Tratamento	Média de eficiência de hidrólise (%)
C1 (TEMPO) DENTRO DE B (ENZIMA 25 FPU/g)	7	42,4 A
	6	33,3 B
	5	26,9 C
	3	24,3 C
	4	24,0 C
	2	18,1 D
	1	0 E
C2 (TEMPO) DENTRO DE B (ENZIMA 50 FPU/g)	7	53,5 A
	6	40,1 B
	4	32,1 C
	5	32,1 C
	3	31,5 C
	2	30,4 C
	1	0 D
C3 (TEMPO) DENTRO DE B (ENZIMA 75 FPU/g)	7	62,0 A
	6	47,1 B
	5	39,0 C
	4	38,1 C
	3	37,3 C
	2	36,7 C
	1	0 D

Tratamentos: (1) 0 h; (2) 3 h; (3) 6 h; (4) 9 h; (5) 12 h; (6) 24 h; (7) 48 h. Letras diferentes (A, B, C ou D) indicam que há diferença estatística.

Tabela 5.17. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes tempos dentro de cada concentração de substrato. DMS (Tukey) = 4,2290

Amostra	Tratamento	Média de eficiência de hidrólise (%)
C (TEMPO) DENTRO DE A1 (SUBSTRATO 25 g/L)	7	51,9 A
	6	41,5 B
	5	35,0 C
	3	34,5 C
	4	33,6 C
	2	32,3 C
	1	0 D
C (TEMPO) DENTRO DE A2 (SUBSTRATO 50 g/L)	7	51,6 A
	6	37,8 B
	5	31,7 C
	3	30,0 CD
	4	29,3 CD
	2	27,1 D
	1	0 E
C (TEMPO) DENTRO DE A3 (SUBSTRATO 75 g/L)	7	54,4 A
	6	41,3 B
	4	31,3 C
	5	31,2 C
	3	28,6 CD
	2	25,8 D
	1	0 E

Tratamentos: (1) 0 h; (2) 3 h; (3) 6 h; (4) 9 h; (5) 12 h; (6) 24 h; (7) 48 h. Letras diferentes (A, B ou C) indicam que há diferença estatística.

E por fim, considerando apenas as concentrações obtidas ao final da hidrólise (48 horas), não houve diferença significativa da eficiência de hidrólise entre as diferentes concentrações de substrato estudadas (25, 50 ou 100 g/L). As médias de eficiência de hidrólise após 48 horas foram de: 51,9% (25 g/L), 51,6% (50 g/L) e 54,4% (100 g/L).

Contudo, tais eficiências foram significativamente diferentes quando se utilizou diferentes cargas enzimáticas, como mostra a tabela 5.18. As médias de eficiência de hidrólise lograram-se: 42,4%, 53,5% e 62,0% para 25 FPU/g, 50 FPU/g, e 75 FPU/g, respectivamente.

Tabela 5.18. Teste de Tukey para os valores médios de eficiência de hidrólise utilizando diferentes concentrações de substrato ou cargas enzimáticas dentro do tempo final de hidrólise (48 horas). DMS (Tukey) = 3,2882

Amostra	Tratamento	Média de eficiência de hidrólise (%)
A (SUBSTRATO) DENTRO DE C7 (TEMPO 48 h)	3	55,9 A
	1	55,2 A
	2	54,4 A
B (ENZIMA) DENTRO DE C7 (TEMPO 48 h)	3	62,0 A
	2	53,5 B
	1	42,4 C

Tratamentos: A: (1) 25 g/L; (2) 50 g/L; e (3) 100 g/L. B: (1) 25 FPU/g; (2) 50 FPU/g; e (3):75 FPU/g. Letras diferentes (A, B ou C) indicam que há diferença estatística.

Fazendo a correlação do aumento da carga enzimática *versus* o aumento da eficiência de hidrólise, verificou-se que o aumento da carga enzimática foi consideravelmente superior ao aumento da eficiência de hidrólise (Tabela 5.19). Esse padrão foi observado para todas as concentrações de substrato (25, 50 ou 100 g/L). Por exemplo, aumentando a carga de enzima de 25 para 50 FPU/g, o incremento de carga enzimática foi de 100%, enquanto que o ganho máximo na hidrólise foi de 37, 25 e 28% (para 25, 50 e 100 g/L, respectivamente). Comparando-se os experimentos de 25 FPU/g e 75 FPU/g, houve um incremento de carga enzimática de 200%, ao passo que os aumentos de eficiência de hidrólise foram de 72, 46 e 44% para as concentrações de 25, 50 e 100 g/L, respectivamente. E o aumento de enzima de 50 FPU/g para 75 FPU/g foi de 50%, gerando aumentos de eficiência de hidrólise de 26, 17, 13% (para 25, 50 e 100 g/L). Obviamente que esses aumentos de eficiência de hidrólise não poderiam ser diretamente proporcionais ao aumento de carga enzimática. No entanto devido ao alto teor de enzimas no sistema, ganhos maiores poderiam ter sido alcançados.

Tabela 5.19. Aumento da carga enzimática *versus* aumento da eficiência de hidrólise em termos percentuais.

		Média	(Aumento %) De 25 para 50 FPU/g		(Aumento %) De 25 para 75 FPU/g		(Aumento %) De 50 para 75 FPU/g	
Concentração de Substrato (g/L)	**Enzima (FPU/g)**	**Rendimento Hidrólise (%)**	**Enzima**	**Rendimento de Hidrólise**	**Enzima**	**Rendimento de Hidrólise**	**Enzima**	**Rendimento de Hidrólise**
25 g/L	75	41,25	100	37	200	72	50	26
	50	32,81						
	25	24,02						
50 g/L	75	34,95	100	25	200	46	50	17
	50	29,99						
	25	24,00						
100 g/L	75	35,30	100	28	200	44	50	13
	50	31,33						
	25	24,47						

Face a esses dados, constata-se que em termos operacionais, em um primeiro momento, não seria recomendável o aumento da carga enzimática do preparado celulásico de *T. harzianum* na hidrólise, visto que os ganhos obtidos na hidrólise foram consideravelmente menores.

Uma solução para a maior eficiência das enzimas poderia ser a hidrólise por batelada alimentada, uma vez que neste modo de operação o substrato pode ser adicionado ao processo continuamente (PEREIRA Jr. et al., 2008b). Desta forma, as enzimas podem agir sobre quantidades menores de substrato hidrolisando-o, sendo liberadas após certo tempo para a hidrólise de substrato adicionado.

5.9.4 Considerações gerais sobre a hidrólise enzimática

Conclusivamente, considerando os resultados das análises estatísticas da hidrólise enzimática utilizando diferentes concentrações de substrato e diferentes cargas enzimáticas de celulases de *T. harzianum*, verificou-se que,

dentro da faixa estudada, em termos de aplicação industrial, seria interessante utilizar a concentração de substrato de 100 g/L, uma vez que apesar de a eficiência de hidrólise ter sido estatisticamente semelhante para as diferentes concentrações de substrato, a quantidade de glicose liberada foi mais elevada para tal concentração, o que é um fator de grande relevância quando se almeja obter hidrolisados com altas concentrações de açúcares fermentáveis para a produção de etanol de segunda geração. O aumento da carga enzimática do preparado celulásico de *T. harzianum* na hidrólise não forneceu ganhos proporcionalmente efetivos no aumento da eficiência de hidrólise. E quanto ao tempo, os dados mostraram que 48 horas de hidrólise foi o melhor tempo dentre as condições avaliadas, visto que gerou eficiência de hidrólise significativamente superior ao de 24 horas, principalmente quando foram utilizados 100 g/L de substrato.

No que se refere ao efeito do grau de deslignificação da celulignina, foi observado que a celulignina tratada com 1%, 2% ou 4% de NaOH (m/v) obteve resultados similares e os mais elevadas eficiências de hidrólise. Desta forma optou-se por utilizar 2% de NaOH para a deslignificação.

A adição de β-glucosidase comercial aos meios de hidrólise enzimática com celulases *T. harzianum* mostrou uma contribuição no eficiência hidrolítica. E comparativamente ao preparado enzimático comercial *Multifect*®, os valores de eficiência de hidrólise indicaram que *T. harzianum* tem um competitivo complexo celulolítico para a hidrólise de bagaço de cana.

Em termos gerais, as celulases de *T. harzianum* foram capazes de hidrolisar bagaço de cana pré-tratado, assim, estas enzimas têm potencial para conversão de celulose em açúcares fermentáveis para a produção de etanol de segunda geração.

5.10 Produção de swolenina recombinante para futura aplicação na amorfogênese da celulose

Estudos têm mostrado que além da influência das enzimas, a hidrólise enzimática da celulose pode ser limitada por suas propriedades físicas. Estas propriedades referem-se principalmente ao grau de polimerização, à acessibilidade e à cristalinidade. Segundo estudos prévios, a acessibilidade da celulose, que é determinada pelo tamanho das partículas de celulose (área de superfície externa) e porosidade (área de superfície interna), é o fator mais importante para a hidrólise (MANSFIELD et al., 1999; CHANDRA et al., 2007). Esta acessibilidade reflete a área superficial total disponível para o contato físico direto entre celulase e celulose e, portanto, influencia a adsorção de celulase bem como a velocidade e a duração da hidrólise da celulose. Além disso, a cristalinidade é um fator relevante para hidrólise, uma vez que influencia a reatividade de celulases adsorvidas (WANG et al., 2006; ARANTES & SADLER, 2010).

Assim sendo, celulases não geram taxas máximas de hidrólise a partir de celulose natural, que é majoritariamente constituída de celulose cristalina, porque a maioria das cadeias de celulose é localizada nas regiões altamente ordenadas e hermeticamente agregadas de microfibrilas e são em grande parte inacessíveis às enzimas e água (ARANTES E SADDLER, 2010). Se algumas cadeias de celulose não são acessíveis, até mesmo celulases com alta atividade não podem hidrolisá-las. A ruptura eficaz das regiões cristalinas, para convertê-los em regiões facilmente hidrolisáveis é muito importante para a degradação eficiente por celulases (WANG et al., 2011).

Sabe-se que atualmente existem muitos tipos de tecnologias de pré-tratamento da biomassa: físicos, fisicoquímicos, químicos, biológicos, ou

combinações destes métodos. Considerando que esses pré-tratamentos podem ser caros e demandar alta entrada de energia, é plausível que seja feita a seleção da técnica mais conveniente a ser aplicada (KUMAR et al., 2009). Nos últimos anos, tem sido investigado o uso de proteínas não-disruptivas no pré-tratamento da celulose sob condições brandas. Alguns estudos sugerem que estas proteínas não-hidrolisantes podem ser adicionadas durante a hidrólise de celulose após o pré-tratamento regular da lignocelulose, ou podem ser utilizadas numa segunda etapa de pré-tratamento em que a celulose é o substrato (ARANTES & SADLER, 2010). Nesta segunda etapa de pré-tratamento, a celulose é incubada sob condições brandas com proteínas não-disruptivas que se ligam à celulose. Como resultado, as microfibrilas de celulose (diâmetro de cerca de 10 nm) são dispersas e as macrofibrilas de celulose mais espessas ou fibras (diâmetro de cerca de 0,5 a 10 µm) incham, diminuindo a cristalinidade e aumentando a acessibilidade, fenômeno este nomeado amorfogênese. Estas proteínas podem também causar a desaglomeração de agregados de fibras de celulose (diâmetro> 0,1 mm), separando as fibras de celulose umas das outras e, consequentemente, aumentando a acessibilidade à celulose. Tanto a amorfogênese quanto a desaglomeração promovem a hidrólise da celulose (ZHAO et al., 2007; ARANTES & SADLER, 2010).

Alguns exemplos de proteínas não-disruptivas utilizadas no pré-tratamento da celulose são: swolenina, loosenina, expansinas e CBMs da Família 1 e Família 2. Tem sido constatado que estas proteínas afrouxam não hidroliticamente e rompem as ligações de hidrogênio das redes de celulose (SALOHEIMO et al., 2002; KIM et al., 2009; WANG et al., 2011; QUIROZ-CASTANEDA et al., 2011; HALL et al., 2011).

Diferente de expansinas de plantas, swolenina tem características estruturais de proteínas de fungos, um módulo de ligação N-terminal (CBM) que se liga à celulose, conectada por uma região ligante ao domínio homólogo a expansina (YAO et al., 2008).

Uma vez que a importância das swoleninas na etapa de amorfogênese está relacionada ao afrouxamento das cadeias de celulose antes da ação das celulases, facilitando a ação de tais enzimas durante a hidrólise enzimática (SALOHEIMO *et al*., 2002), esta proteína acessória pode contribuir consideravelmente para o aumento da eficiência de hidrólise. Contudo, em contraste com as celulases, os níveis de produção de swolenina em condições nativas, como em *T. reesei*, são relativamente baixas (1 mg/L) (SALOHEIMO et al., 2002). Além disso, atualmente muitos dos preparados enzimáticos comerciais possuem proteínas acessórias em sua composição, além das convencionais e imprescenéveis celulases que fazem parte do sinergismo hidrolítico. Desta forma, o presente estudo teve como um dos objetivos produzir swolenina recombinante de *T. harzianum* por expressão heteróloga em *A. niger* visando à produção desta proteína em maior concentração e futura aplicação na amorfogênese da celulose.

A swolenina recombinante foi produzida com êxito como mostram os resultados a seguir. Esta etapa do trabalho foi realizada durante o período de doutorado sanduíche na University of York, Inglaterra.

5.10.1 Clonagem do gene de swolenina de *T. harzianum*

Nesta etapa, inicialmente foi feita a extração do RNA de *T. harzianum* a partir da biomassa fúngica do meio de cultivo otimizado, conforme descrito na

metodologia. Devido à otimização do meio, foi produzida elevada quantidade de biomassa fúngica, o que contribuiu para a extração do RNA do microrganismo.

Foram avaliadas diferentes concentrações de biomassa de *T. harzianum*: 25, 50, 75 e 100 mg. A figura 5.19 mostra o gel com os resultados da extração de RNA. Nas duplicatas, as condições experimentais de 25 mg foram as que apresentaram a maior similaridade. Nas demais amostras, houve alguma perda do conteúdo de RNA em uma das duplicatas. Nota-se que houve a degradação total do RNA na condição 75A. Apesar do procedimento de extração do RNA ter sido realizado cuidadosamente em nitrogênio líquido, podem ocorrer perdas do RNA devido à grande facilidade de degradação de tal molécula.

A melhor condição de extração do RNA foi 100 mg de biomassa fúngica (100A), pois foi aquela que apresentou maior concentração de RNA e aspecto íntegro no gel. Assim, esta amostra foi selecionada para a produção do DNA complementar (cDNA).

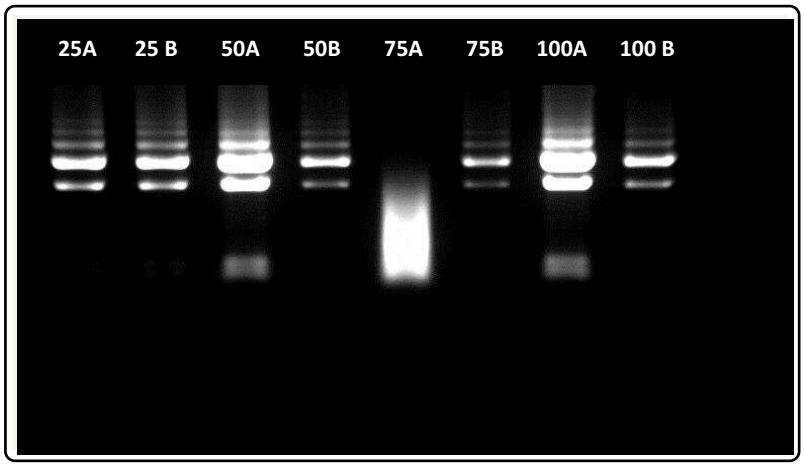


Figura 5.19. Gel com RNA de *T. harzianum* extraído a partir de diferentes concentrações de biomassa fúngica: 25, 50, 75 e 100 mg. A e B são duplicatas das diferentes condições.

Em seguida, foi realizada a produção de cDNA. A figura 5.20 mostra os resultados obtidos. Foram avaliados dois diferentes primers (UTR e ATG), a fim de maximizar a amplificação específica de cDNA codificador da swolenina, além de serem testados dois tampões de amostra de alta afinidade (HF e GC). Os tamanhos de fragmentos esperados no gel foram de: 1541 pb/UTR e 1500 pb/ATG, que inclui a sequência da swolenina. A viabilidade do transcrito foi verificada através da corrida em gel de agarose. Os resultados mostraram que ambos os primers e tampões funcionaram na transcrição. Contudo, o tampão GC permitiu a formação de bandas com maior teor de cDNA. Desta forma, optou-se por utilizar este tampão para as próximas análises.

Os dois primers avaliados, UTR e ATG, funcionaram na produção de cDNA, e desta forma, ambos foram utilizados nas etapas seguintes.

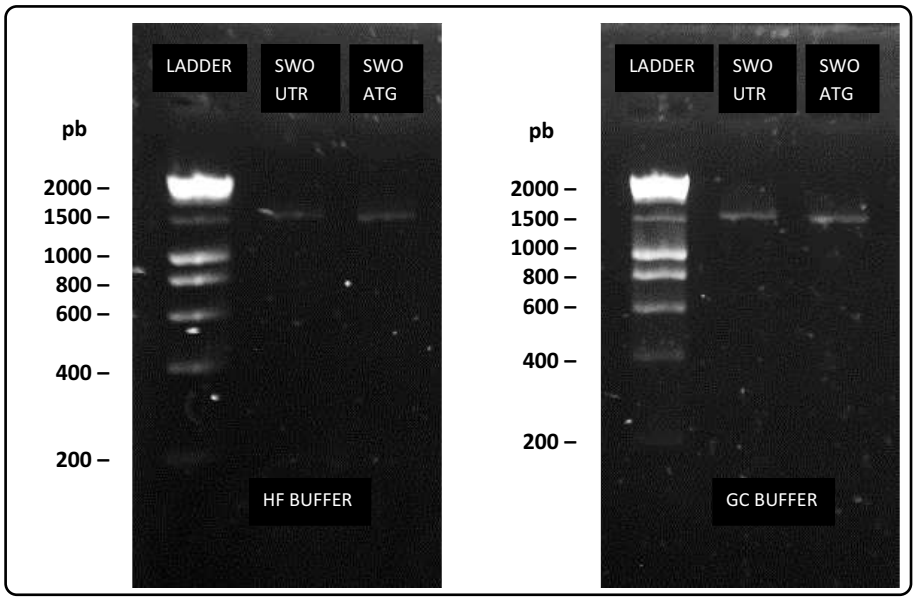


Figura 5.20. Gel da produção de cDNA de *T. harzianum* utilizando dois diferentes primers (UTR e ATG) e dois tampões de amostra (HF e GC).

Posteriormente foi feita a ligação do cDNA de *T. harzianum* no plasmídeo pSC-B de *E. coli*. O produto da ligação foi transformado em células

termocompetentes de *E. coli*, que foram repicadas. A figura 5.21 mostra o aspecto das colônias obtidas. As células hospedeiras em que foi inserido o gene de swolenina (positivas) possuem coloração branca, enquanto que as negativas possuem coloração azul. Foram selecionadas 8 colônias (positivas) de *E.coli* a partir do cultivo em placa e o DNA foi extraído. Este procedimento foi realizado tanto para as colônias contendo o primer SWO UTR, quanto para o SWO ATG.

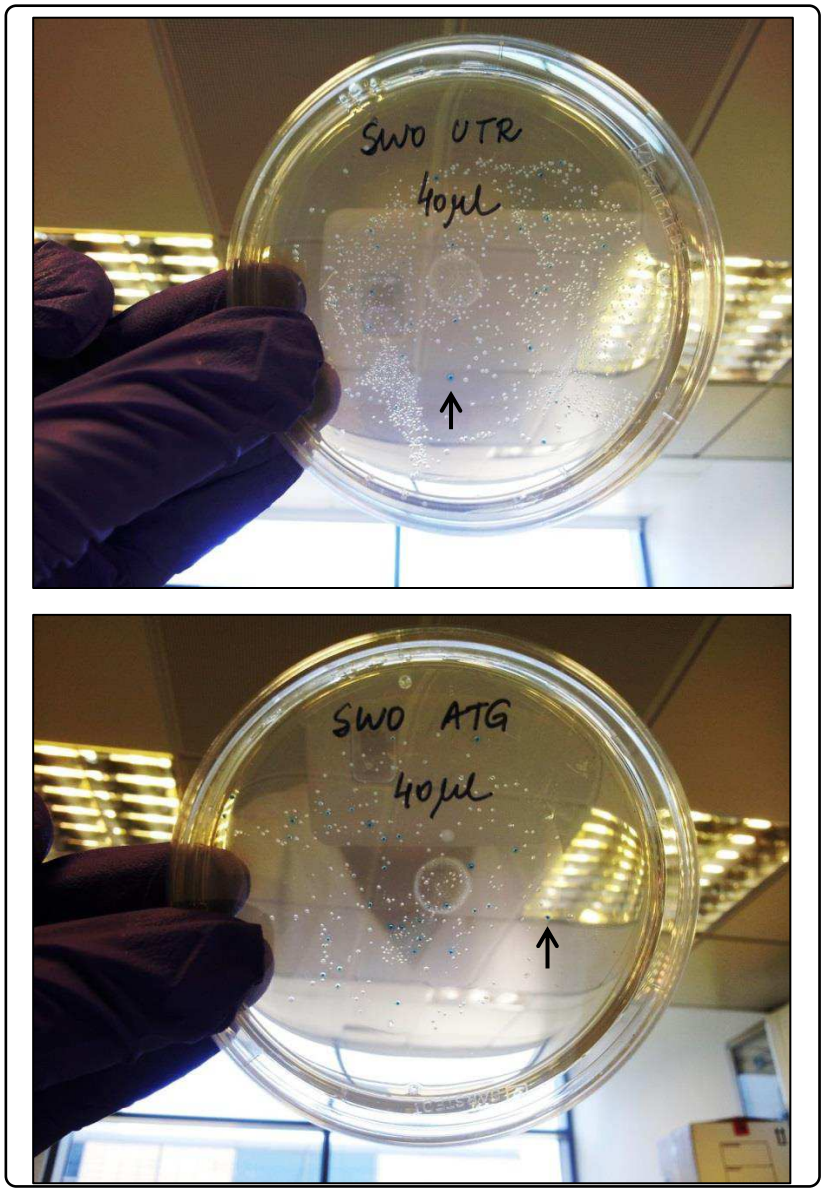


Figura 5.21. Aspecto das colônias de *E. coli* obtidas após a ligação de cDNA de *T. harzianum* no plasmídeo pSC-B. As células em que foi inserido o gen de swolenina (positivas) possuem coloração branca, enquanto que as negativas possuem coloração azul (exemplo indicado pela seta).

Visando à seleção das colônias, foi observado que para SWO UTR, das 8 colônias avaliadas, 5 foram positivas, com 1541 pares de base, incluindo a sequência da swolenina. Assim como para a SWO ATG, 5 colônias foram positivas, com 1500 pares de base (figura 5.22a). A partir desse gel, foram selecionadas as colônias 1, 4 e 5 de SWO UTR e as colônias 3, 4 e 5 de SWO ATG. Subsequentemente, a fim de se confirmar a ligação dos produtos de PCR ao vetor pSC-B, o fragmento contendo a sequência de swolenina foi amplificado a partir do DNA dos plasmídeos selecionados e o tamanho em pares de base (pb) foi comprovado usando a enzima de restrição *Eco*RI. Todas

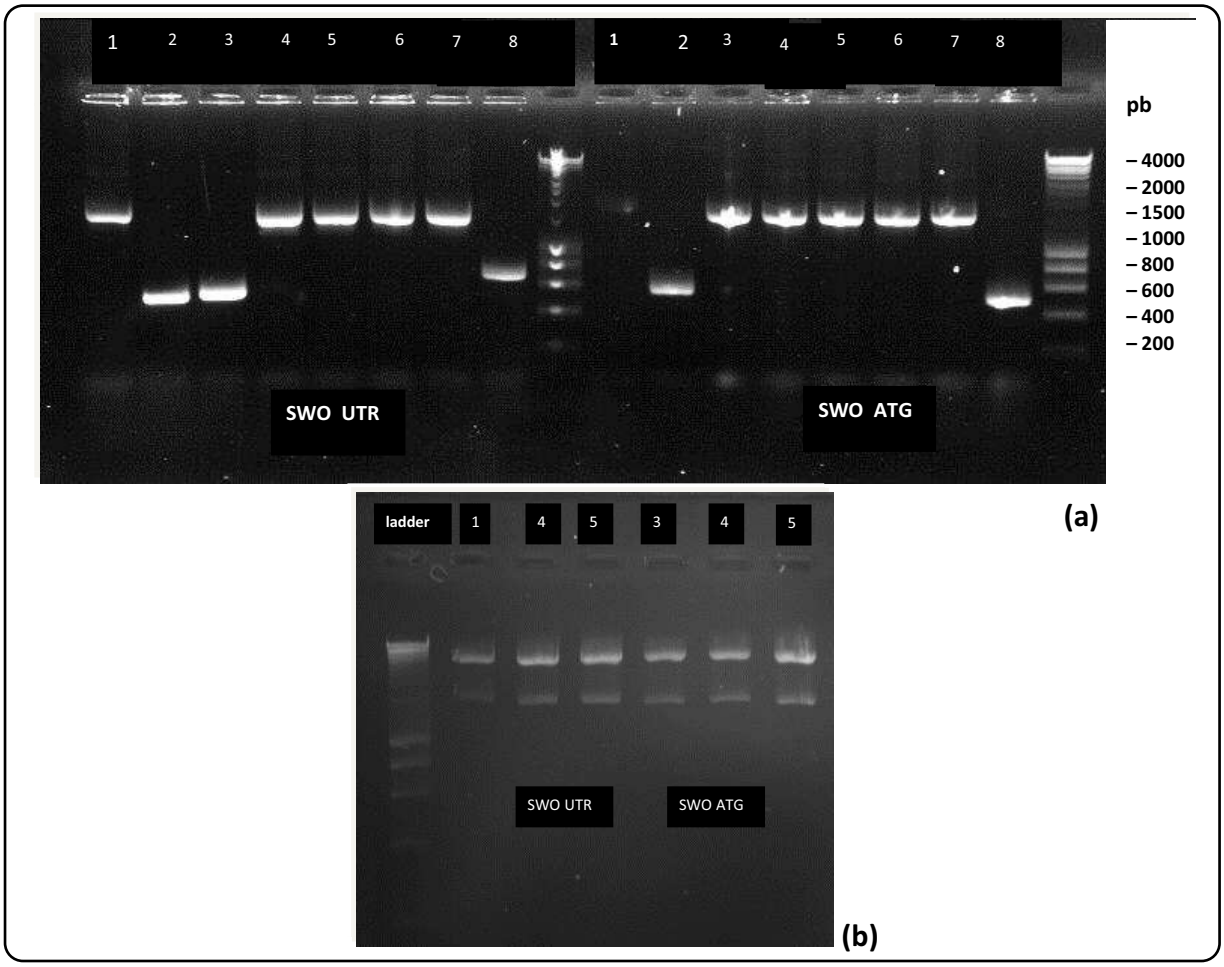


Figura 5.22. (a) Gel com DNA de 8 colônias de *E.coli* selecionadas a partir do cultivo em placa (primers SWO UTR e SWO ATG); (b) Gel com DNA das colônias de *E.coli* positivas após reação com enzima de restrição EcoRI.

estas colônias apresentaram o fragmento de restrição (figura 5.22b), o que confirma a ligação do inserto *SWO*. Foi feito o repique das colônias positivas. O DNA foi purificado e quantificado e as amostras foram então enviadas para o sequenciamento.

O sequenciamento do DNA plasmidial (Figura 5.23) revelou que, dentre todas as amostras avaliadas, SWO UTR 1 e SWO ATG 3 foram as que apresentaram melhores resultados. Ambas apresentaram grande similaridade com a sequência padrão de swolenina de *T. harzianum* obtida da base de dados do NCBI, o que está representado pela região em amarelo na figura.

O plasmídeo SWO UTR 1, doravante chamado *E. coli* pSC-B::*SWO1*, teve seu DNA escolhido para a ligação ao vetor pIGF de *A. niger*.

```
                    1                                                  50
 SWO2PCR      (1)  CCCAAATAGTCGTAATAGCCGGAATGGCTCGTAAACTTAGTCTACTGGCT
SWO_UTR1      (1)  -----------------------ATGGCTCGTAAACTTAGTCTACTGGCT
SWO_ATG3      (1)  ------------------------TGGCTCGTAAACTTAGTCTACTGGCT
                    51                                                100
 SWO2PCR     (51)  CTTGCAAGCCTTATTTCGCTGTCAGTTCAGCAGAATTGCGCAGCATTATT
SWO_UTR1     (28)  CTTGCAAGCCTTATTTCGCTGTCAGTTCAGCAGAATTGCGCAGCATTATT
SWO_ATG3     (27)  CTTGCAAGCCTTATTTCGCTGTCAGTTCAGCAGAATTGCGCAGCATTATT
                    101                                               150
 SWO2PCR    (101)  TGGCCAATGTGGAGGTAATGGATGGACCGGCTCAACATGCTGCGTTTCTG
SWO_UTR1     (78)  TGGCCAATGTGGAGGTAATGGATGGACCGGCTCAACATGCTGCGTTTCTG
SWO_ATG3     (77)  TGGCCAATGTGGAGGTAATGGATGGACCGGCTCAACATGCTGCGTTTCTG
                    151                                               200
 SWO2PCR    (151)  GCGCCCAGTGCACTTACGTGAACGACTTCTATTCTCAGTGTCTTGCCTCA
SWO_UTR1    (128)  GCGCCCAGTGCACTTACGTGAACGACTTCTATTCTCAGTGTCTTGCCTCA
SWO_ATG3    (127)  GCGCCCAGTGCACTTACGTGAACGACTTCTATTCTCAGTGTCTTGCCTCA
                    201                                               250
 SWO2PCR    (201)  ACTGGTGGCGGCAGTACTACTAGTAGATCATCAACTTCATCCAGCTCAGT
SWO_UTR1    (178)  ACTGGTGGCGGCAGTACTACTAGTAGATCATCAACTTCATCCAGCTCAGT
SWO_ATG3    (177)  ACTGGTGGCGGCAGTACTACTAGTAGATCATCAACTTCATCCAGCTCAGT
                    251                                               300
 SWO2PCR    (251)  CTCAAGATCTTCATCTACTAGCTCAGTTTCCAGATCCTCATCTGCCGGCT
SWO_UTR1    (228)  CTCAAGATCTTCATCTACTAGCTCAGTTTCCAGATCCTCATCTGCCGGCT
SWO_ATG3    (227)  CTCAAGATCTTCATCTACTAGCTCAGTTTCCAGATCCTCATCTGCCGGCT
                    301                                               350
 SWO2PCR    (301)  CCTCGCCTGGGGGCGGCTCACCAACTGGTGGCGCTTCTACGTATACAACG
SWO_UTR1    (278)  CCTCGCCTGGGGGCGGCTCACCAACTGGTGGCGCTTCTACGTATACAACG
SWO_ATG3    (277)  CCTCGCCTGGGGGCGGCTCACCAACTGGTGGCGCTTCTACGTATACAACG
                    351                                               400
 SWO2PCR    (351)  ACTGATACTGCTACGGTTGCTCCTCATTCCCAGTCTCCTTACCCCAGTAT
SWO_UTR1    (328)  ACTGATACTGCTACGGTTGCTCCTCATTCCCAGTCTCCTTACCCCAGTAT
SWO_ATG3    (327)  ACTGATACTGCTACGGTTGCTCCTCATTCCCAGTCTCCTTACCCCAGTAT
                    401                                               450
 SWO2PCR    (401)  TGCTGCCTCCAGCTGCGGGTCCTGGACTCTAGTGGATAATGTTTGCTGTC
SWO_UTR1    (378)  TGCTGCCTCCAGCTGCGGGTCCTGGACTCTAGTGGATAATGTTTGCTGTC
SWO_ATG3    (377)  TGCTGCCTCCAGCTGCGGGTCCTGGACTCTAGTGGATAATGTTTGCTGTC
                    451                                               500
 SWO2PCR    (451)  CATCATATTGTGCCACCGATGACACATCCGAGTTCTGCACGGGCGGCTGC
SWO_UTR1    (428)  CATCATATTGTGCCACCGATGACACATCCGAGTTCTGCACGGGCGGCTGC
SWO_ATG3    (427)  CATCATATTGTGCCACCGATGACACATCCGAGTTCTGCACGGGCGGCTGC
                    501                                               550
 SWO2PCR    (501)  ACCTGTGCCACGCCACCTTCGGCGGATTGCAAATCAGGAACTATGTACCC
SWO_UTR1    (478)  ACCTGTGCCACGCCACCTTCGGCGGATTGCAAATCAGGAACTATGTACCC
SWO_ATG3    (477)  ACCTGTGCCACGCCACCTTCGGCGGATTGCAAATCAGGAACTATGTACCC
                    551                                               600
 SWO2PCR    (551)  AGAAGTCCACCATGTAACTAGCAATGAGACTTGGCACTACAGCAGATCTA
SWO_UTR1    (528)  AGAAGTCCACCATGTAACTAGCAATGAGACTTGGCACTACAGCAGATCTA
SWO_ATG3    (527)  AGAAGTCCACCATGTAACTAGCAATGAGACTTGGCACTACAGCAGATCTA
                    601                                               650
 SWO2PCR    (601)  CGCATTTCGGCTTGACAAGCGGCGGAGCTTGTGGCTTTGGCCTCTATGGT
SWO_UTR1    (578)  CGCATTTCGGCTTGACAAGCGGCGGAGCTTGTGGCTTTGGCCTCTATGGT
SWO_ATG3    (577)  CGCATTTCGGCTTGACAAGCGGCGGAGCTTGTGGCTTTGGCCTCTATGGT
                    651                                               700
 SWO2PCR    (651)  CTCTGCACAAAAGGCAGTGTTACCGCGAGCTGGACAGATCCTATGTTGGG
SWO_UTR1    (628)  CTCTGCACAAAAGGCAGTGTTACCGCGAGCTGGACAGATCCTATGTTGGG
SWO_ATG3    (627)  CTCTGCACAAAAGGCAGTGTTACCGCGAGCTGGACAGATCCTATGTTGGG
                    701                                               750
 SWO2PCR    (701)  ATCAACCTGTGATGCTTTCTGCACAGCCTACCCCTTACTTTGCAAAGATC
SWO_UTR1    (678)  ATCAACCTGTGATGCTTTCTGCACAGCCTACCCCTTACTTTGCAAAGATC
SWO_ATG3    (677)  ATCAACCTGTGATGCTTTCTGCACAGCCTACCCCTTACTTTGCAAAGATC
                    751                                               800
 SWO2PCR    (751)  CTACGGGCACTACTCTTCGCGGCAACTTTGCAGCACCAAACGGAGATTAT
SWO_UTR1    (728)  CTACGGGCACTACTCTTCGCGGCAACTTTGCAGCACCAAACGGAGATTAT
SWO_ATG3    (727)  CTACGGGCACTACTCTTCGCGGCAACTTTGCAGCACCAAACGGAGATTAT
                    801                                               850
 SWO2PCR    (801)  TATTCGCAGTTTTGGTCTTCTCTGCCAGGAGCCCTAGATAACTACCTGTC
SWO_UTR1    (778)  TATTCGCAGTTTTGGTCTTCTCTGCCAGGAGCCCTAGATAACTACCTGTC
SWO_ATG3    (777)  TATTCGCAGTTTTGGTCTTCTCTGCCAGGAGCCCTAGATAACTACCTGTC
```

Figura 5.23. Sequência do DNA plasmidial para expressão de swolenina (*E. coli*).

```
851                                                 900
  SWO2PCR    (851) TTGTGGCGAATGCATTGAACTCATTCAGACGAAACCAGACGGAACCGACT
 SWO_UTR1    (828) TTGTGGCGAATGCATTGAACTCATTCAGACGAAACCAGACGGAACCGACT
 SWO_ATG3    (827) TTGTGGCGAATGCATTGAACTCATTCAGACGAAACCAGACGGAACCGACT
                   901                                             950
  SWO2PCR    (901) ATGCTGTAGGGGAAGCTGGCTACACTGATCCGATCACTCTGGAGATAGTA
 SWO_UTR1    (878) ATGCTGTAGGGGAAGCTGGCTACACTGATCCGATCACTCTGGAGATAGTA
 SWO_ATG3    (877) ATGCTGTAGGGGAAGCTGGCTACACTGATCCGATCACTCTGGAGATAGTA
                   951                                            1000
  SWO2PCR    (951) GACAGCTGCCCTTGTAGCGCAAATTCCAAGTGGTGCTGTGGCCCCGGTGC
 SWO_UTR1    (928) GACAGCTGCCCTTGTAGCGCAAATTCCAAGTGGTGCTGTGGCCCCGGTGC
 SWO_ATG3    (927) GACAGCTGCCCTTGTAGCGCAAATTCCAAGTGGTGCTGTGGCCCCGGTGC
                   1001                                           1050
  SWO2PCR   (1001) CGATCATTGCGGAGAGATCGATTTTAAATATGGCTGCCCTCTTCCGGCCG
 SWO_UTR1    (978) CGATCATTGCGGAGAGATCGATTTTAAATATGGCTGCCCTCTTCCGGCCG
 SWO_ATG3    (977) CGATCATTGCGGAGAGATCGATTTTAAATATGGCTGCCCTCTTCCGGCCG
                   1051                                           1100
  SWO2PCR   (1051) ACAGCATTCATCTCGATCTCTCAGACATTGCCATGGGCCGCTTACAGGGC
 SWO_UTR1   (1028) ACAGCATTCATCTCGATCTCTCAGACATTGCCATGGGCCGCTTACAGGGC
 SWO_ATG3   (1027) ACAGCATTCATCTCGATCTCTCAGACATTGCCATGGGCCGCTTACAGGGC
                   1101                                           1150
  SWO2PCR   (1101) AACGGTTCACTCACTAATGGTGTGATTCCAACTCGATACAAGAGAGTTCC
 SWO_UTR1   (1078) AACGGTTCACTCACTAATGGTGTGATTCCAACTCGATACAAGAGAGTTCC
 SWO_ATG3   (1077) AACGGTTCACTCACTAATGGTGTGATTCCAACTCGATACAAGAGAGTTCC
                   1151                                           1200
  SWO2PCR   (1151) TTGCCCCAAACTTGGAAATGTTTATATATGGCTTCGAAATGGCGGGGGGC
 SWO_UTR1   (1128) TTGCCCCAAACTTGGAAATGTTTATATATGGCTTCGAAATGGCGGGGGGC
 SWO_ATG3   (1127) TTGCCCCAAACTTGGAAATGTTTATATATGGCTTCGAAATGGCGGGGGGC
                   1201                                           1250
  SWO2PCR   (1201) CGTACTACTTTGCTCTGACAGCCGTGAATACTAATGGACCCGGATCGGTC
 SWO_UTR1   (1178) CGTACTACTTTGCTCTGACAGCCGTGAATACTAATGGACCCGGATCGGTC
 SWO_ATG3   (1177) CGTACTACTTTGCTCTGACAGCCGTGAATACTAATGGACCCGGATCGGTC
                   1251                                           1300
  SWO2PCR   (1251) ACCAAGATTGAGATCAAGGGTGCAGGCACAGATACTTGGGTTGCTTTGGA
 SWO_UTR1   (1228) ACCAAGATTGAGATCAAGGGTGCAGGCACAGATACTTGGGTTGCTTTGGA
 SWO_ATG3   (1227) ACCAAGATTGAGATCAAGGGTGCAGGCACAGATACTTGGGTTGCTTTGGA
                   1301                                           1350
  SWO2PCR   (1301) ACATGATCCAAACTACACCAGCAGTCGCCCACAAGAACGATATGGAAGCT
 SWO_UTR1   (1278) ACATGATCCAAACTACACCAGCAGTCGCCCACAAGAACGATATGGAAGCT
 SWO_ATG3   (1277) ACATGATCCAAACTACACCAGCAGTCGCCCACAAGAACGATATGGAAGCT
                   1351                                           1400
  SWO2PCR   (1351) GGGTAATTCCACAGGGGTCAGGACCTTTCAATCTGCCCGTTGGAATACGC
 SWO_UTR1   (1328) GGGTAATTCCACAGGGGTCAGGACCTTTCAATCTGCCCGTTGGAATACGC
 SWO_ATG3   (1327) GGGTAATTCCACAGGGGTCAGGACCTTTCAATCTGCCCGTTGGAATACGC
                   1401                                           1450
  SWO2PCR   (1401) CTTACTAGCCCAACGGGAGAGCAGATTGTTAATGAACAAGCCATAAAGAC
 SWO_UTR1   (1378) CTTACTAGCCCAACGGGAGAGCAGATTGTTAATGAACAAGCCATAAAGAC
 SWO_ATG3   (1377) CTTACTAGCCCAACGGGAGAGCAGATTGTTAATGAACAAGCCATAAAGAC
                   1451                                           1500
  SWO2PCR   (1451) ATTTACTCCACCAGCGACAGCAGATCCTAACTTCTATTACATCGACATCG
 SWO_UTR1   (1428) ATTTACTCCACCAGCGACAGCAGATCCTAACTTCTATTACATCGACATCG
 SWO_ATG3   (1427) ATTTACTCCACCAGCGACAGCAGATCCTAACTTCTATTACATCGACATCG
                   1501                                        1542
  SWO2PCR   (1501) GCGTACAGTTTAGTCAAAACTAAGAATGGACGCTTGAACCA-
 SWO_UTR1   (1478) GCGTACAGTTTAGTCAAAACTAAGAATGGACGCTTGAACCAA
 SWO_ATG3   (1477) GCGTACAGTTTAGTCAAAACTAA------------------
```

Figura 5.23. Sequência do DNA plasmidial para expressão de swolenina (*E. coli*) (continuação).

5.10.2 Clonagem do gene de swolenina de *T. harzianum* no vetor de expressão para *A. niger*

Nesta etapa utilizou-se o plasmídeo *E. coli* pSC-B::*SWO1* derivado dos clones previamente selecionados. O gene da swolenina foi clonado neste vetor usando os sítios de restrição *Xba*I (na extremidade 5') e *Hpa*I (na extremidade 3'), e a expressão do gene foi conduzida pelo promotor Gla A.

O DNA do plasmídeo *E. coli* pSC-B::*SWO1* foi amplificado utilizando-se duas DNA polimerases: *Phusion* e *Expand* a fim de testar a que apresentava o melhor desempenho. O tamanho de pares de base esperado no gel foi de 1541 pb (UTR), incluindo a sequência da swolenina. A figura 5.24 apresenta o gel do DNA produzido com as diferentes polimerases. Pode-se observar no gel que a polimerase *Expand* produziu maior quantidade de DNA por volume de amostra, sendo então escolhida para a continuidade dos experimentos.

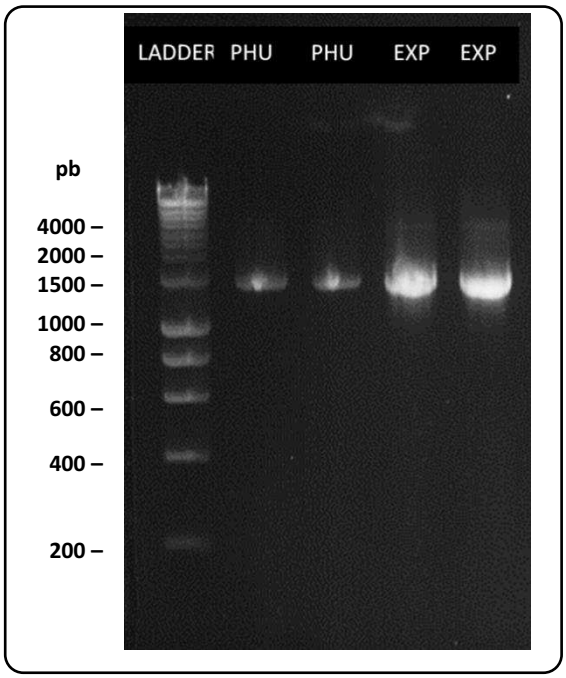


Figura 5.24. Gel com DNA da colônia positiva de *E.coli* após reação com as DNA polimerases *Phusion* e *Expand*.

O DNA purificado foi digerido com enzimas de restrição *Hpa*I and *Xba*I e o fragmento resultante da digestão foi purificado. Em seguida foi feita a ligação deste fragmento ao vetor de expressão para *A. niger*.

Após a ligação, a transformação do fragmento ligado ao vetor foi realizada utilizando células termocompetentes de *E. coli*, que foram posteriormente repicadas em placa. A figura 5.25 mostra o aspecto das colônias de *E. coli* contendo gen de swolenina de *T. harzianum* após ligação ao vetor de *A. niger*.

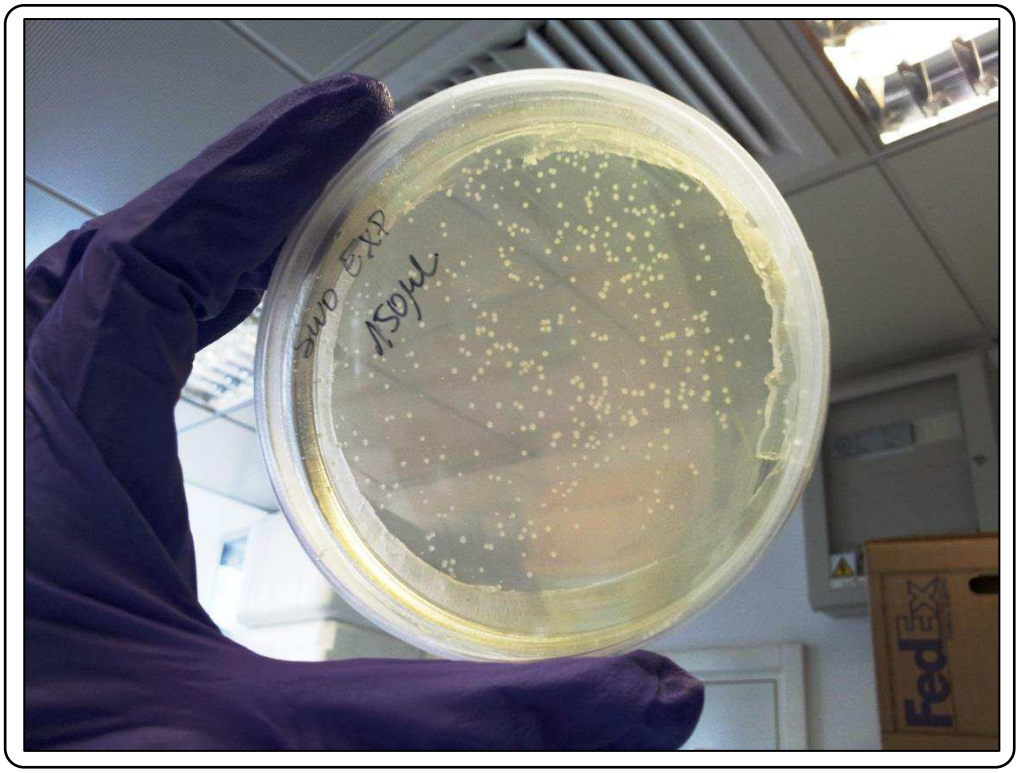


Figura 5.25. Aspecto das colônias de *E. coli* contendo gen de swolenina de *T. harzianum* após ligação ao vetor de *A. niger* e cultivo *overnight*.

Desta placa, 24 colônias foram escolhidas. O DNA foi extraído, amplificado e purificado. A viabilidade do DNA foi avaliada em gel. O tamanho estimado de pares de base dos produtos de PCR foi de 900 pb, incluindo a sequência da swolenina. Destes 24 clones, 20 foram positivos, com bandas de

tamanho de 900 pb, como mostra a figura 5.26a. Selecionou-se então 10 destes 20 plasmídeos para a digestão do DNA com enzimas de restrição *Hpa*I and *Xba*I, sendo que todos apresentaram os fragmentos de restrição (Figura 5.26b), confirmando a clonagem do gene da swolenina recombinante.

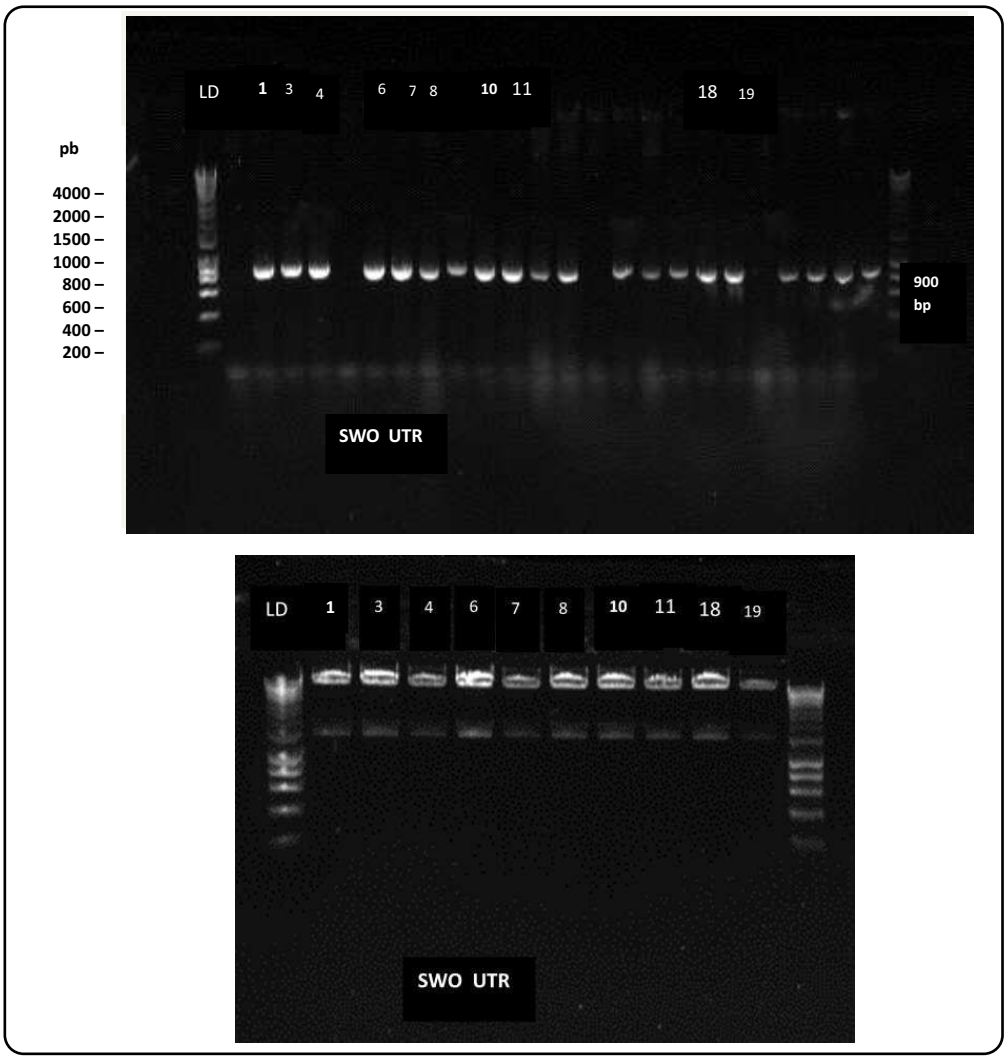


Figura 5.26. Gel com DNA da colônias positivas de *E.coli* após ligação ao vetor de *A. niger* (acima). Gel com DNA da colônias positivas de *E.coli* após reação com enzimas de restrição *Hpa*I and *Xba*I (abaixo).

Dentre estas 10 colônias, 4 foram enviadas para o sequenciamento do DNA plasmidial (colônias 1, 3, 4 e 6). As sequências de DNA do plasmídios para expressão de swolenina em *A. niger* são apresentadas na figura 5.27. A

avaliação do sequenciamento do DNA foi realizada utilizando-se como padrão a sequência de DNA do clone SWO UTR 1 (plasmídeo *E. coli* pSC-B::*SWO1*), que foi selecionado na etapa de "Clonagem do DNA de *T. harzianum*". Na figura, as regiões em amarelo representam a similaridade da sequência em relação à swolenina padrão, as regiões em azul localizadas no meio da sequência também indicam a homologia em relação à proteína padrão, enquanto que as áreas em verde no meio da sequência indicam a diferença. Já na região inicial da sequência referente ao *primer*, situada de 1 a 25 pares de base, as áreas em azul referem-se à homologia apenas entre os clones avaliados.

Baseando-se nos resultados de sequenciamento do DNA, verificou-se que as colônias 1, 4 e 6 apresentaram grande homologia do DNA com a swolenina padrão, sendo estes clones positivos denominados "plasmídeos pIGF-pyrG-GlaSS". Ao passo que o DNA do clone 3 teve algumas diferenças a partir de 100 pares de base, não sendo adequado para a utilização nas etapas seguintes.

Desta forma, o DNA do plasmídeo pIGF-pyrG-GlaSS 1 (colônia 1) foi escolhido, aleatoriamente, para a inserção em *A. niger*. Foi feito o repique desta colônia, o DNA foi extraído, e concentrado. Foi possível obter a concentração adequada de DNA para a etapa posterior de transformação (>1 µg/µL).

Um importante fator a ser ressaltado é que a cauda de histidina (representada por "H") foi eficientemente adicionada ao DNA de todos os clones, como pode ser observado ao final das sequências na figura 5.27. Esse fator é essencial para a etapa adiante de purificação desta proteína em FPLC, que a ocorre pela ligação desta cauda de histina à coluna de níquel, promovendo consequentemente a separação da proteína de interesse.

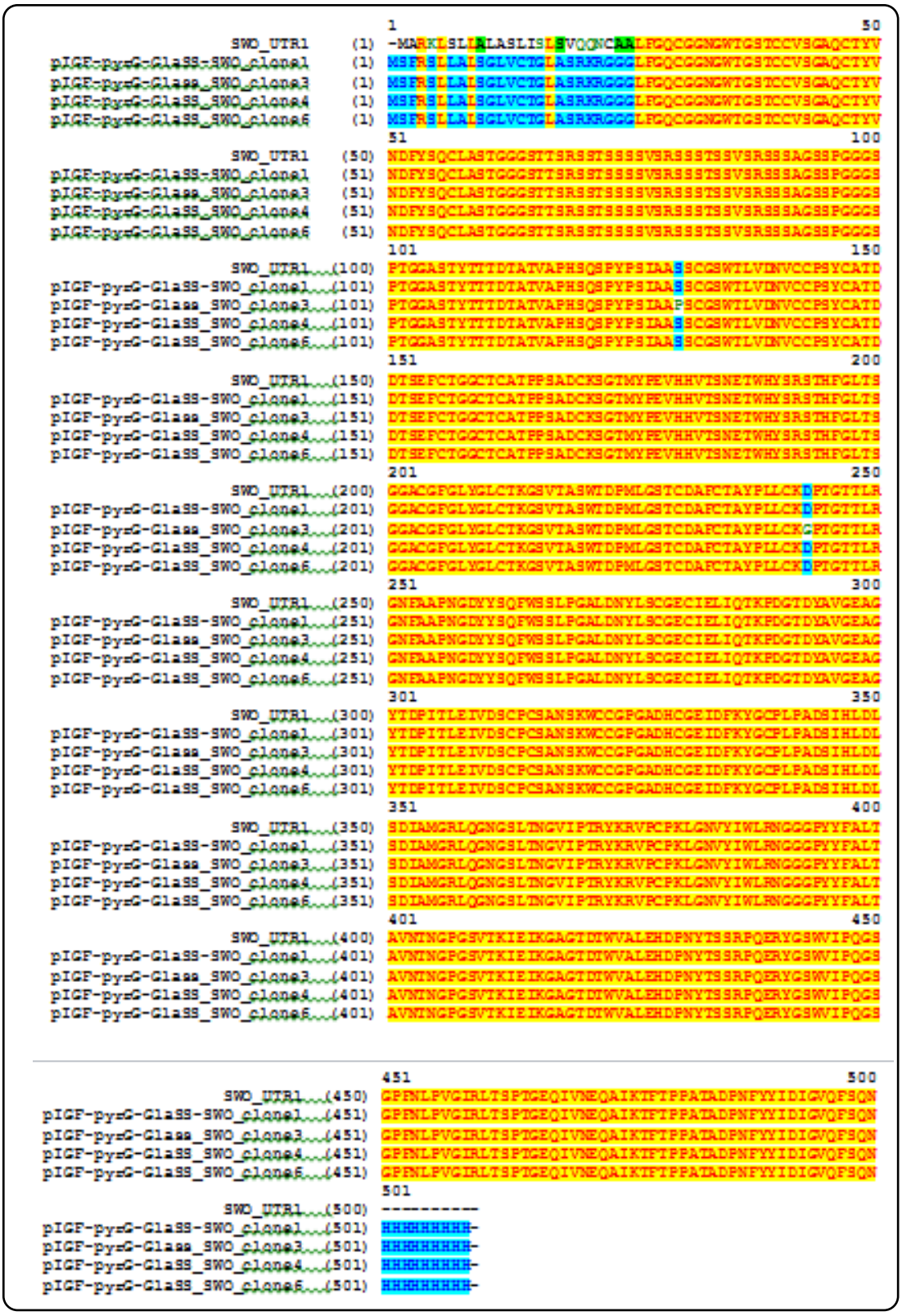


Figura 5.27. Alinhamento das sequências primárias do DNA plasmidial para expressão de swolenina em *A. niger*. A região em azul representada por ”H” ao final da sequência representa a cauda de histidina.

5.10.3 Transformação: Inserção do gene de swolenina de *T. harzianum* em *A. niger*

Após a clonagem, a swolenina recombinante foi expressa de forma heteróloga, utilizando o fungo filamentoso *A. niger* como hospedeiro da expressão. A extração do protoplasto de *A. niger* para transformação foi feita através da digestão da membrana celular deste fungo utilizando enzimas, como descrito na metodologia. A figura 5.28 mostra o processo de rompimento da membrana celular em diferentes tempos de incubação com as enzimas de digestão: 0h, 1:30 h, 2 h e 2:30 h. É possível verificar que após 1:30 h o rompimento da membrana já havia sido iniciado, acentuando-se ao longo do tempo. Após 2:30 h a membrana estava consideravelmente rompida e o protoplasto já extraído.

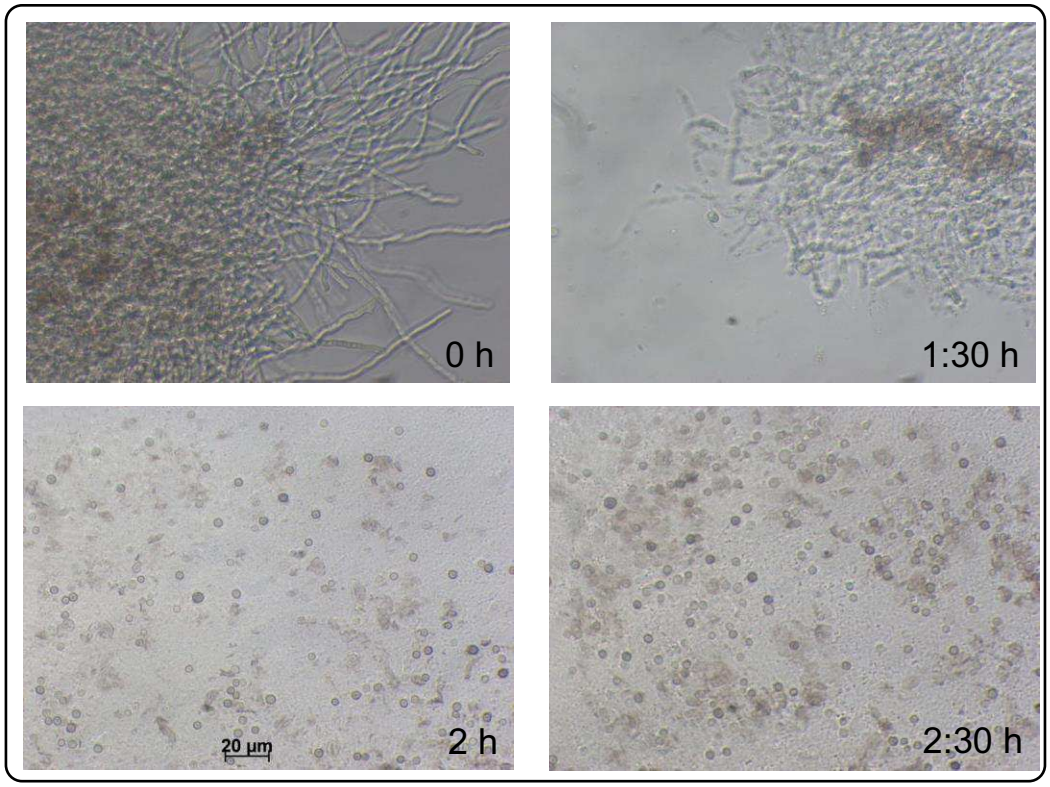


Figura 5.28. Microscopia óptica da extração do protoplasto de *A. niger* durante diferentes tempos de digestão da membrana celular.

Para a transformação de *A. niger*, foi então adicionado ao protoplasto o DNA extraído de *E. coli* contendo o gen de swolenina com o vetor de ligação pIGF. Como detalhado na metodologia, foram realizadas dezesseis combinações protoplasto mais DNA visando aumentar a probabilidade de obter o fungo transformado. Em seguida, essas amostras foram repicadas individualmente em diferentes placas de Petri formando depois de 3 dias de cultivo os esporos de *A. niger* transformante para a produção de swolenina.

Posteriormente ao repique em placas, foram feitos repiques de *A. niger* transformante em tubos inclinados. A figura 5.29 mostra o aspecto dos esporos de *Aspergillus niger* transformante.

Figura 5.29. Aspecto dos esporos de *Aspergillus niger* transformante.

O DNA dos 16 transformantes foi extraído a partir das respectivas biomassas fúngicas, como descrito no item metodologia. Verificou-se que após o PCR, 8 destes transformantes foram positivos, contendo o gene recombinante *SWO1*, apresentando bandas no gel com tamanho de 900 pares de base (Figura 5.30a). Destes 8 clones positivos foi extraído o RNA, cuja integridade e presença do gene *SWO1* foram confirmadas pelo gel (Figura 5.30b). A presença de transcritos do gene *SWO1* (cDNA) foi testada por meio

de PCR usando primers gene-específicos. Para os 8 clones com RNA íntegro foi produzido o cDNA, utilizando-se 2 diferentes primers: SEQ e UBIQUITIN. O primer SEQ teve como alvo a sequência de swolenina de *T. harzianum* presente no DNA de *A. niger* recombinante, enquanto que o primer PIGFR anela na regiao 3' downstream ao gene *SWO1.* Os primers para UBIQUITIN foram

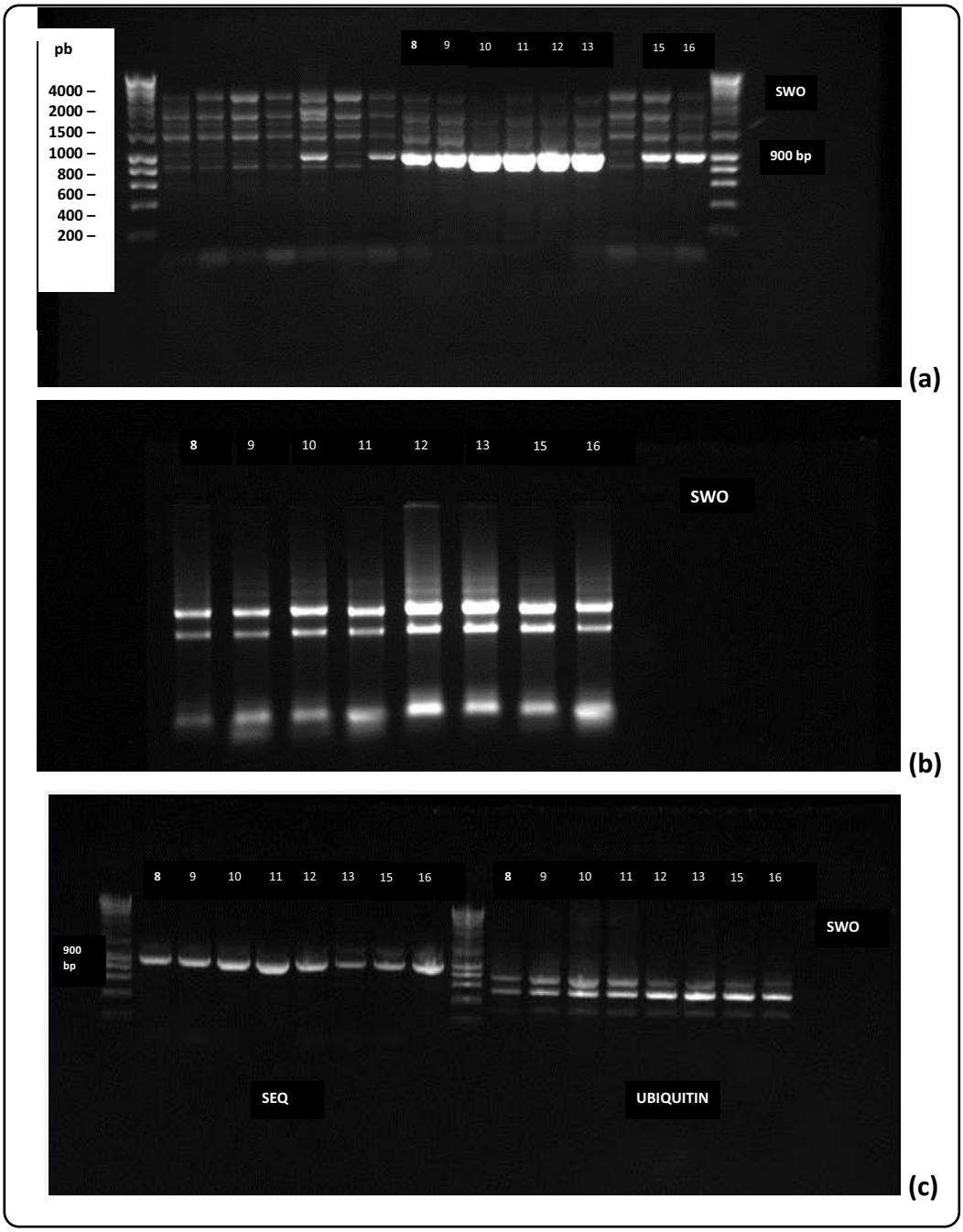


Figura 5.30. DNA (a), RNA (b) e cDNA (c) do *Aspergillus niger* transformante.

utilizados como controle da eficiência de transcrição reversa, pois o gene codificador de ubiquitina é transcrito constitutivamente no sistema de *A. niger* utilizado.

Todos os 8 clones apresentaram cDNA com tamanho de banda esperado, de 900 pares de base, incluindo a sequência da swolenina (Figura 5.30c), atestando a inserção do gene de swolenina de *T. harzianum* em *A. niger*.

5.10.4 Avaliação de diferentes condições de cultivo de *A. niger* transformante em meio de fermentação

A fim de verificar quais transformantes são capazes de produzir a swolenina recombinante, foram avaliadas 96 condições de produção em meio de fermentação (8 transformantes X 3 temperaturas x 4 dias). A figura 5.31 mostra o aspecto de *Aspergillus niger* transformante no meio de fermentação.

Figura 5.31. Aspecto de *Aspergillus niger* transformante no meio de fermentação.

A figura 5.32 apresenta o *Dot blot* e *Western blot* dos 8 transformantes (8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16), nos diferentes dias (1, 2, 3 e 4) e temperaturas (30,

25 e 20 °C). Através do *Dot blot* é possível verificar que houve produção de proteínas por todos os transformantes, em todos os dias e em todas as

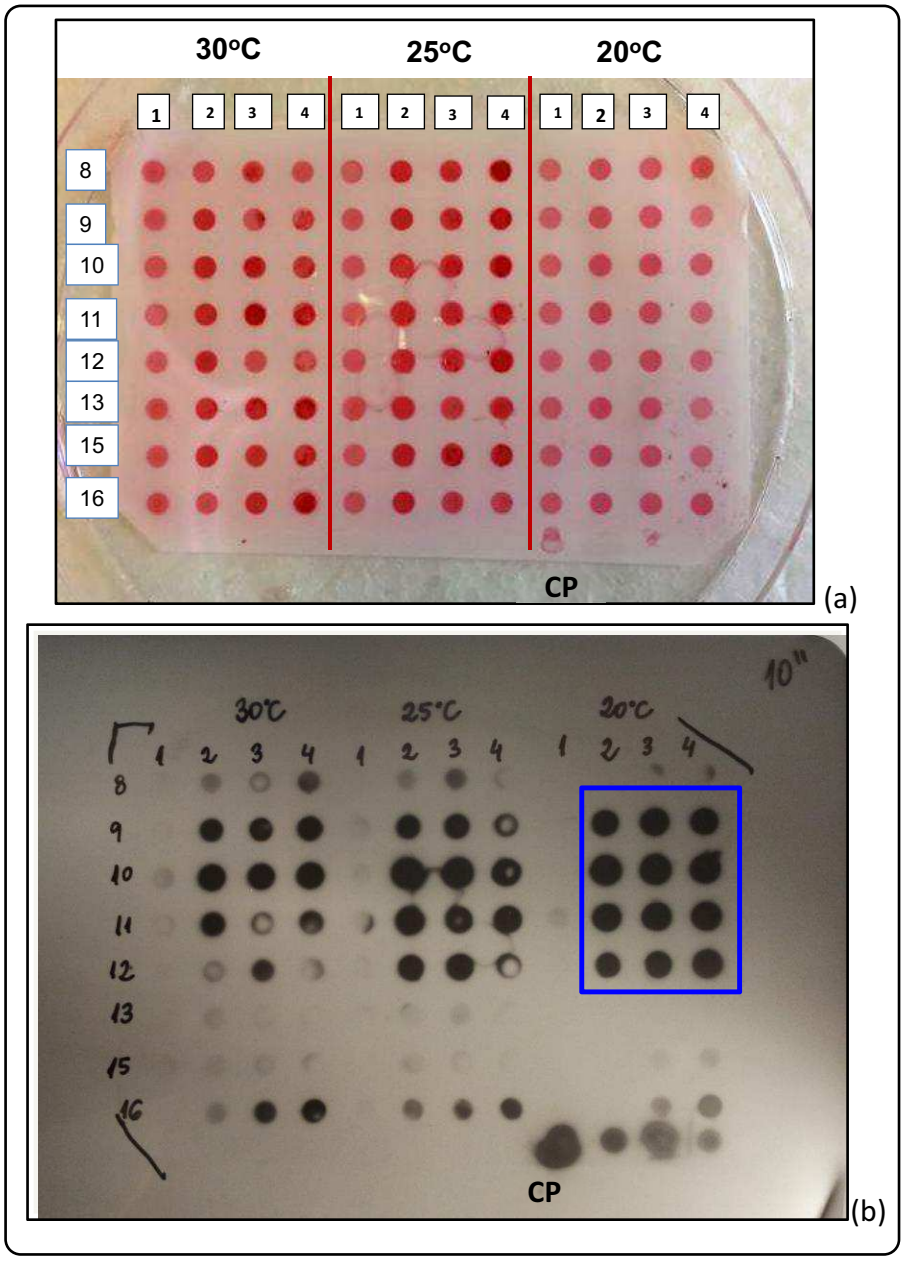


Figura 5.32. *Dot blot* e *Western blot* dos 8 transformantes de *A. niger* (8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16), nos diferentes dias (1, 2, 3, 4) e temperaturas (30, 25 e 20°C). (a) *Dot blot*: a produção de proteínas em geral por todos os transformantes, em todos os dias e todas as temperaturas avaliadas foi confirmada pela coloração avermelhada produzida após a adição do reagente de Ponceau. (b) *Western blot*: a produção da swolenina recombinante ocorreu nas amostras onde foi detectada flurescencia (coloração preta na fotografia). CP: Controle positivo (proteína conhecida contendo a cauda de histidina).

temperaturas avaliadas, o que é confirmado pela coloração avermelhada produzida após a adição do reagente de *Ponceau* (Figura 5.32a). De igual maneira, o controle positivo (amostra de proteína conhecida) também apresentou esta coloração, o que comprova o funcionamento do ensaio.

Contudo, no *Western blot* observou-se que a swolenina foi produzida apenas por alguns dos transformantes, em determinadas condições de temperatura e tempo (Figura 5.32b). Nas 96 condições avaliadas, verificou-se que a proteína recombinante foi produzida basicamente a partir do 2º dia de fermentação nas 3 diferentes temperaturas, e que esta produção foi mais intensa no 3º dia. Os transformantes produtores da proteína recombinante foram: 9, 10, 11 e 12. A melhor temperatura para a produção da swolenina recombinante foi 20°C, visto que nesta condição foram obtidas maiores concentrações de swolenina por volume de amostra, como confirmado pela mais intensa fluorescência no *Western blot* (marcado em azul na figura). O controle positivo, constituído por uma proteína conhecida contendo a cauda de histidina, também apresentou fluorescência, demonstrando que a análise foi processada em condições adequadas.

A temperatura de 20°C, provada ser a mais apropriada para a produção de swolenina de *T. harzianum* nas condições do presente trabalho, mostrou-se coerente com os resultados de outros estudos. Wang et al. (2011), ao avaliarem diferentes temperaturas para a produção de swolenina recombinante, constataram que 22°C foi a melhor temperatura, gerando a mais alta concentração de proteína, ainda que tal proteína tenha sido também produzida em temperatura mais elevada (26°C). Outros estudos têm revelado que 20°C é uma temperatura adequada para a produção de proteína recombinante (KERN et al., 2013). Quanto ao tempo de cultivo, a literatura tem

relatado 72 horas (3 dias), o que condiz com os resultados obtidos (JÄGER et al., 2011). Em alguns casos, foram utilizados tempos mais longos, de 4 dias (CHEN et al., 2010) e de 7 dias (YAO et el., 2008).

5.10.5 Purificação da swolenina recombinante

O sobrenadante do meio de fermentação, contendo a proteína recombinante, foi concentrado e purificado por cromatografia de afinidade com íons metálicos em FPLC. A figura 5.33 ilustra o pico de purificação da swolenina (indicado pela seta em azul) através do gradiente de sais. A separação desta proteína se deu nas frações B5 até a fração B11, geradas pelo FPLC. Considerando que haviam outras proteínas no meio de fermentação produzidas pelo microrganismo, evidencia-se que foi possível separar de modo eficiente a proteína recombinante através desta metodologia. O princípio envolvido na purificação é a ligação da proteína recombinante contendo a cauda de histidina à coluna de níquel, retendo apenas a proteína de interesse.

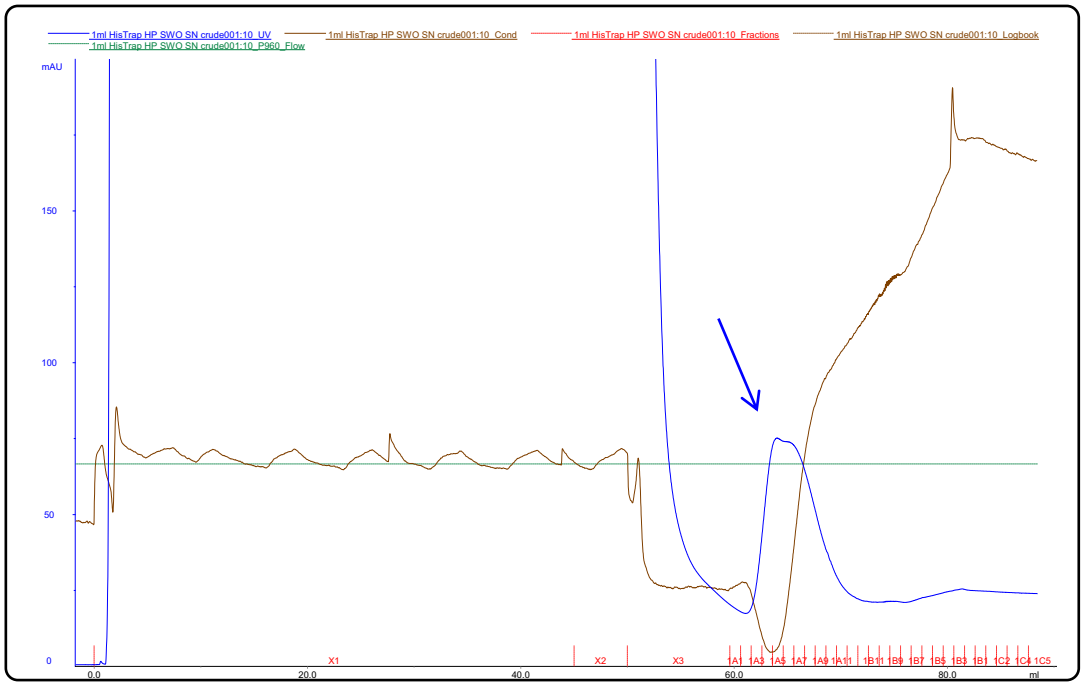


Figura 5.33. Pico de swolenina purificada no FPLC (indicado pela seta em azul) através do gradiente de sais.

Com objetivo de confirmar a purificação da swolenina recombinante, as amostras provenientes do FPLC, antes e após a purificação, foram avaliadas em gel SDS-PAGE (figura 5.34a). Nas primeiras colunas do gel SDS-PAGE referentes ao sobrenadante da cultura concentrado (1 e 2), pode-se observar a presença de diferentes bandas de proteínas, sendo duas majoritárias. Na canaleta de amostra não retida na coluna de níquel (3), semelhantemente, diferentes bandas foram identificadas, ao contrário da amostra oriunda da lavagem da coluna (4), em que não apareceram bandas. No entanto, nas frações purificadas por FPLC (5 a 11) apenas uma intensa banda foi identificada, presumindo-se ser esta banda a proteína recombinante.

A massa molecular calculada da estrutura básica da swolenina de *T. harzianum* é de 52 kDa. Contudo, alguns artigos sobre swolenina descrevem que esta é uma proteína altamente glicosilada (SALOHEIMO et al., 2002; CHEN et al., 2010; JÄGER et al., 2011). Utilizou-se, portanto, um kit específico (Thermo Scientific) a fim de verificar se a swolenina recombinante purificada é glicosilada, assim também como as demais amostras (antes da purificação). Foi confirmada a glicosilação da swolenina recombinante (figura 5.34b), que por conta da glicosilação, apresenta uma massa molecular de aproximadamente 100 kDa. Estudos sugerem que a diferença entre a massa molecular calculada e a massa molecular observada pode ser explicada pela glicosilação e outras modificações pós-traducionais. Isto porque a região de ligação de celulases ou de proteínas relacionadas com celulases é altamente O-glicosilada, e a swolenina contém sítios potenciais de O-glicosilação dentro da região ligante (STALS et al., 2004; JÄGER et al., 2011). Em relação ao sobrenandante antes da purificação por FPLC, verificou-se a presença de duas bandas de proteínas glicosiladas. Possivelmente, essa segunda banda pode referir-se a uma proteína

abundante produzida pelo fungo hospedeiro da expressão (*A. niger*). A análise de *Western blot* confirmou que a banda glicosilada é a swolenina recombinante marcada por histidina (figura 5.34c). Esta análise detectou a

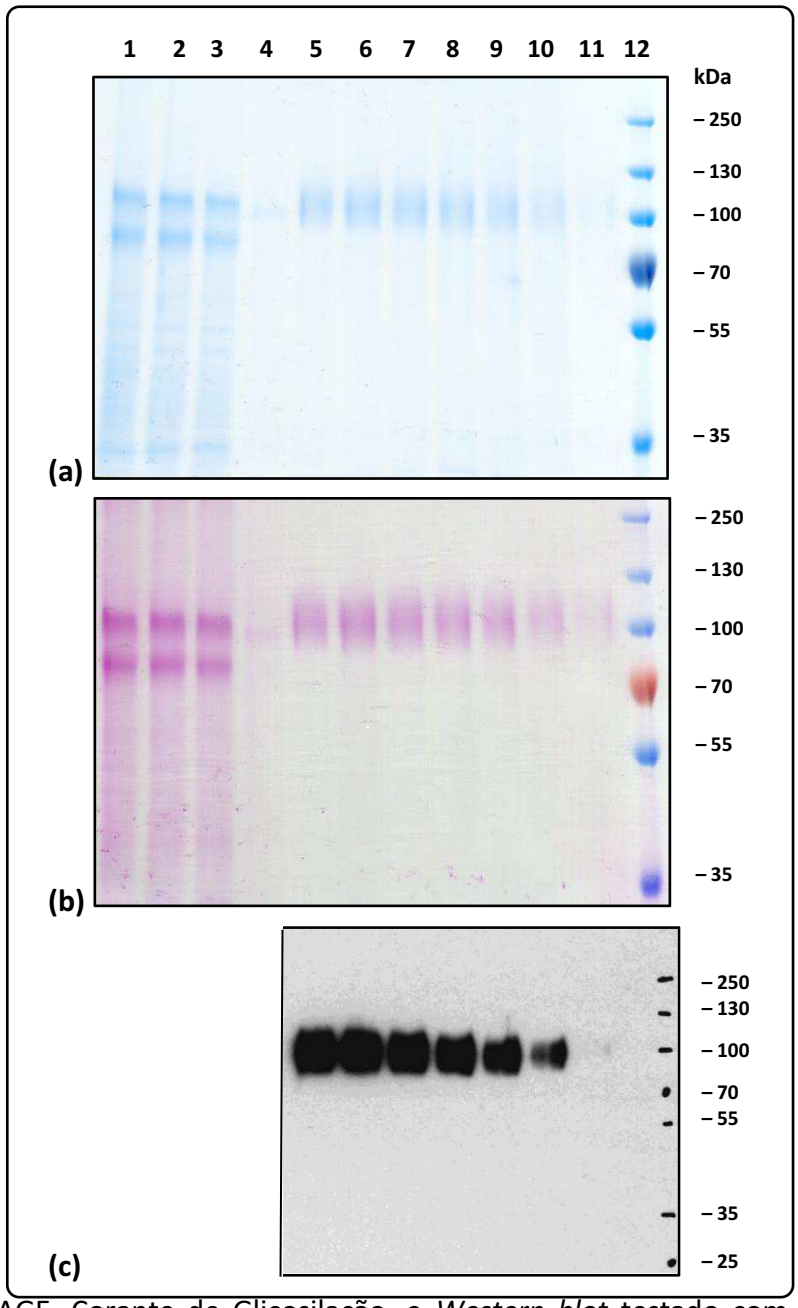


Figura 5.34. SDS-PAGE, Corante de Glicosilação, e *Western blot* testado com exposição à anti-his 30 s. A ordem da amostra é a mesma em todos os géis: (1) sobrenadante da cultura concentrado; (2) sobrenadante da cultura concentrado e centrifugado a 1000 g; (3) não-retido na coluna de níquel; (4) lavado da coluna de níquel; (5) fração eluída B5; (6) fração eluída B6; (7) fração eluída B7; (8) fração eluída B8; (9) fração eluída B9; (10) fração eluída B10; (11) fração eluída B11; (12) marcador de peso molecular.

proteína recombinante em todas as frações purificadas através da coluna de níquel no FPLC.

A quantificação da swolenina recombinante purificada por FPLC revelou que a concentração desta proteína foi de 197,1 mg/L.

A porcentagem de swolenina presente no preparado celulásico *in natura* de *T. harzianum* foi de 0,81%, o que representa 2,1 mg/L de proteína se considerado o conteúdo total de proteínas. Portanto, houve um aumento de 93 vezes da concentração de swolenina do fungo recombinante em relação ao preparado celulásico de *T. harzianum* obtido em condições nativas (Tabela 5.20). Esse foi um grande avanço obtido no presente trabalho, visto que swolenina é uma das proteínas acessórias atualmente bastante estudadas para a composição de coquetéis enzimáticos de hidrólise da biomassa celulósica.

Tabela 5.20. Aumento da concentração de swolenina do fungo recombinante em relação ao preparado celulásico de *T. harzianum* obtido em condições nativas.

Proteína	**mg/L**
Swolenina condição nativa	2,1
Swolenina recombinante	197,1
Aumento (X)	**93**

A concentração de 2,1 mg/L de swolenina de *T. harzianum* obtida na condição nativa (não recombinante) é compatível com a concentração de swolenina de 1 mg/L para *T. reesei* em condições nativas (SALOHEIMO et al., 2002). A concentração levemente superior desta proteína de *T. harzianum* aqui

verificada pode estar relacionada à condição otimizada do meio de cultivo, que, assim como promoveu o aumento do teor de proteínas totais, possivelmente gerou o aumento da concentração individual de swolenina.

Quanto ao teor de swolenina recombinante produzida no presente estudo, a concentração de 197,1 mg/L foi superior aquelas registradas na literatura para swolenina expressa por produção heteróloga. Swolenina de *T. reesei* foi expressa heterologamente em *Aspergillus niger* (SALOHEIMO et al., 2002), *Aspergillus oryzae* (WANG et al., 2010), *Kluyveromyces lactis* (JÄGER et al., 2011) e *Saccharomyces cerevisiae* (SALOHEIMO et al., 2002). *A. oryzae* foi capaz de produzir swollenina em concentrações de 50 mg/L (WANG et al., 2010). Já a levedura *K. lactis* produziu cerca de 30 mg/L (JÄGER et al., 2011). Contudo, os níveis de expressão em *S. cerevisiae* foram baixos, de 25 µg/L (SALOHEIMO et al., 2002). Recentemente, Kang et al. (2013) isolaram swolenina do fungo filamentoso *Penicillium oxalicum*, e esta proteína foi eficientemente produzida por expressão heteróloga em *T. reesei*, com uma eficiência de 105 mg/L. Tal resultado foi compatível ao do presente trabalho. Este estudo ainda mostrou atividade disruptiva significante desta proteína recombinante sobre celulose cristalina (KANG et al., 2013).

Apesar da concentração de swolenina recombinante do presente estudo ter sido consideravelmente superior a maioria dos trabalhos citados, tal concentração é coerente com a de outras proteínas recombinantes relatadas na literatura, como as obtidas pelos pesquisadores da University of York (Inglaterra), em que foram logrados altos níveis de concentração (>200 mg/L) (KERN et al., 2013).

Avaliando-se o alinhamento da sequência da swolenina de *T. reesei* e *T. harzianum* gerado através do programa *vector NTI*, revela-se que há

significante identificação entre ambas as swoleninas (figura 5.35). As regiões em amarelo indicam similaridade da sequência de aminoácidos, enquanto que as regiões em verde referem-se às diferenças. Houve 95% de homologia entre a sequência da swolenina de *T. harzianum* IOC 3844 e a da swolenina *T. reesei* produzida por Saloheimo et al. (2002). Esta similaridade sugere que assim como swolenina de *T. reesei* tem demonstrado importante função como proteína acessória na etapa de amorfogênese da celulose, swolenina de *T. harzianum* possivelmente pode realizar tal contribuição na hidrólise enzimática.

```
                                1                                                  50
T.harzianum swolenin      (1)   MARKLSLLALASLISLSVQQNCAALFGQCGGNGWTGSTCCVSGAQCTYVN
       T.reesei swo1      (1)   MAGKLILVALASLVSLSIQQNCAALFGQCGGIGWSGTTCCVAGAQCSFVN
                                51                                                100
T.harzianum swolenin     (51)   DFYSQCLASTGGG--------STTSRSSTSSSSVSRSS--------STSS
       T.reesei swo1     (51)   DWYSQCLASTGGNPPNGTTSSSLVSRTSSASSSVGSSSPGGNSPTGSAST
                                101                                               150
T.harzianum swolenin     (85)   VSRSSSAGSSPGGGS----------------------------PTSEFCT
       T.reesei swo1    (101)   YTTTDTATVAPHSQSPYPSIAASSCGSWTLVDNVCCPSYCANDDTSESCS
                                151                                               200
T.harzianum swolenin    (107)   GGCTCATPPSADCKSGTMYPEVHHVTSNETWHYSRSTHFGLTSGGACGFG
       T.reesei swo1    (151)   GCGTCTTPPSADCKSGTMYPEVHHVSSNESWHYSRSTHFGLTSGGACGFG
                                201                                               250
T.harzianum swolenin    (157)   LYGLCTKGSVTASWTDPMLGSTCDAFCTAYPLLCKDPTGTTLRGNFAAPN
       T.reesei swo1    (201)   LYGLCTKGSVTASWTDPMLGATCDAFCTAYPLLCKDPTGTTLRGNFAAPN
                                251                                               300
T.harzianum swolenin    (207)   GDYYSQFWSSLPGALDNYLSCGECIELIQTKPDGTDYAVGEAGYTDPITL
       T.reesei swo1    (251)   GDYYTQFWSSLPGALDNYLSCGECIELIQTKPDGTDYAVGEAGYTDPITL
                                301                                               350
T.harzianum swolenin    (257)   EIVDSCPCSANSKWCCGPGADHCGEIDFKYGCPLPADSIHLDLSDIAMGR
       T.reesei swo1    (301)   EIVDSCPCSANSKWCCGPGADHCGEIDFKYGCPLPADSIHLDLSDIAMGR
                                351                                               400
T.harzianum swolenin    (307)   LQGNGSLTNGVIPTRYKRVPCPKLGNVYIWLRNGGGPYYFALTAVNTNGP
       T.reesei swo1    (351)   LQGNGSLTNGVIPTRYRRVQCPKVGNAYIWLRNGGGPYYFALTAVNTNGP
                                401                                               450
T.harzianum swolenin    (357)   GSVTKIEIKGAGTDTWVALEHDPNYTSSRPQERYGSWVIPQGSGPFNLPV
       T.reesei swo1    (401)   GSVTKIEIKGADTDNWVALVHDPNYTSSRPQERYGSWVIPQGSGPFNLPV
                                451                                       493
T.harzianum swolenin    (407)   GIRLTSPTGEQIVNEQAIKTFTPPATADPNFYYIDIGVQFSQN
       T.reesei swo1    (451)   GIRLTSPTGEQIVNEQAIKTFTPPATGDPNFYYIDIGVQFSQN
```

Figura 5.35. Alinhamento da sequência da swolenina de *T. reesei* e *T. harzianum.* Fonte (sequência de *T. reesei)* : Saloheimo *et al*., (2002).

Um ponto interessante a ser ressaltado é que o presente estudo apresentou, pela primeira vez, uma forma de produzir swolenina recombinante de *T. harzianum*. Adicionalmente, a elevada concentração alcançada é um fator positivo a fim de gerar swolenina suficiente para aplicações industriais.

A aplicação desta proteína tem sido caracterizada como uma forma segura e ambientalmente amigável de pré-tratamento da celulose para gerar biocombustíveis. Para produzí-la em quantidade suficiente para aplicações industriais, a produção swolenina recombinante tem sido relatada como uma solução (WANG et al., 2010; JÄGER et al., 2011).

Além da conhecida aplicação de swolenina em substratos comerciais como a celulose cristalina, pesquisas mais recentes têm utilizado swolenina na hidrólise da biomassa lignocelulósica. Gourlay et al., (2013) avaliaram o efeito da swolenina em palha de milho pré-tratada a vapor. A adição desta proteína acessória contribui na etapa de amorfogênese durante a hidrólise enzimática dessa biomassa pré-tratada. Interessantemente, os autores mostraram que a swolenina agiu principalmente na acessibilidade da fração hemicelulósica, promovendo a solubilização dos açúcares monoméricos e oligoméricos. Foi constatado um sinergismo pronunciado de swolenina com xilanases, resultando na liberação de significativamente mais xilose (> 300%). Swolenina, que anteriormente tinha sido conhecida por promover amorfogênese de substratos celulósicos modelo, também foi capaz de atuar na biomassa, como palha de milho pré-tratada a vapor (GOURLAY et al., 2013). Isto pode ser um indicativo importante que esta proteína tem grande potencial de aplicação no bagaço de cana pré-tratado e em outras biomassas lignocelulósicas.

5.10.6 Considerações gerais sobre a produção de swolenina recombinante de *T. harzianum*

Swolenina é uma proteína recém-descoberta (cerca de uma década) e estudos têm mostrado a importância desta proteína na etapa de amorfogênese da celulose, e consequentemente seu efeito no aumento do redimento de hidrólise enzimática (ARANTES e SADLER, 2010; JÄGER et al., 2011). No presente estudo, através de técnicas de Biologia molecular, a produção de swolenina recombinante de *T. harzianum* realizada na University of York (Inglaterra) foi bem-sucedida. Por questões de cumprimento de prazo do doutorado, não houve tempo hábil de realizar experimentos para avaliação do efeito desta proteína na hidrólise enzimática. Contudo, a similaridade no sequenciamento da swolenina de *T. harzianum* obtida no presente estudo àquela de *T. reesei* produzida por Saloheimo et al. (2002) sinaliza o potencial de aplicação e efeito desta proteína na amorfogênese de biomassas celulósicas.

Durante este doutoramento, foi possível produzir um preparado celulásico de *Trichoderma harzianum* IOC 3844 a partir de celulignina parcialmente deslignificada, com alto conteúdo de glicosil hidrolases, capaz de hidrolisar celulose. Este preparado enzimático tem um grande potencial para aplicação na conversão da celulose em açúcares fermentáveis para a produção de etanol de segunda geração, e sua aplicação pode ser aprimorada através da amorfogênese da celulose por ação de swoleninas.

Ressalta-se, portanto, a grande importância da pesquisa em colaboração realizada na University of York (Inglaterra), que enriqueceu e complementou a pesquisa iniciada na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Iniciativas como esta, de apoio governamental a trocas científicas internacionais, têm grande relavância para o desenvolvimento tecnológico do Brasil.

Capítulo 6

6. CONCLUSÕES

- O presente trabalho mostrou que o fungo hiper-celulolítico *Trichoderma harzianum* IOC 3844 tem grande potencial para a produção de celulases a partir de bagaço de cana;
- Esta estirpe mostrou ser um potencial agente produtor de celulases quando cultivado em biorreator instrumentado sob condições ótimas, apresentando elevada produção enzimática e alta produtividade volumétrica (CMCase, 27.000 U/L; FPase, 1.200 U/L e β-glucosidase, 600 U/L em 42 horas). Uma comparação dos resultados obtidos no biorreator contendo meio otimizado com aqueles obtidos com meio não-otimizado revelou que houve um aumento significativo nas atividades enzimáticas (CMCase, 5 vezes; beta-glucosidase,3 vezes; e FPase, 9 vezes);
- A composição ótima do meio de produção de celulases por *T. harzianum* IOC 3844 foi a seguinte: celulignina parcialmente deslignificada 15,0 g/L, uréia 2,24 g/L, extrato de levedura 1,14 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 3,42 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5,0 mg/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1,6 mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,4 mg/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2,0 mg/L;

- A análise proteômica identificou 117 proteínas e revelou a seguinte composição do secretoma de *T. harzianum* IOC 3844 crescido em bagaço de cana: glicosil hidrolases 67%, proteínas de atividade acessória (AA9; 1%); módulo de ligação ao carboidrato (CBM; 1%), swolenina 1%, carboidrato esterase 1%, protease 5%, lipase 1%, proteínas desconhecidas 10%, dentre outras;
- Os resultados sugerem que a exposição de *T. harzianum* ao bagaço de cana-de-açúcar foi capaz de induzir o metabolismo para a expressão de glicosil hidrolases, porque este co-produto agroindustrial possui em sua composição alto teor de celulose, além de hemicelulose. A elevada concentração de glicosil hidrolases observada (67%) é um importante fator para a hidrólise da biomassa;
- As glicosil hidrolases observadas neste estudo foram distribuídas em 26 famílias, a saber: GH7, GH6, GH3, GH10, GH15, GH5, GH55, GH92, GH11, GH71, GH47, GH2, GH62, GH17, GH72, GH61, GH74, GH18, GH27, GH16, GH64, GH81, GH95, GH54, GH25, GH76. Dentre as glicosil hidrolases com atividade sobre a celulose, os grupos mais abundantes foram: GH 5 (11%), GH 6 (6%), GH 7 (10%), GH 3 (17 %) e GH 55 (6%);
- Os principais grupos de proeteínas verificados foram: celulases, hemicelulases, monooxigenases polissacarídicas líticas cobre-dependentes (família AA9), outras glicosil hidrolases, CBM, proteína acessória na amorfogênese, carboidrato esterases, lipases, oxidases, desidrogenases, peptidases, proteínas hipotéticas, dentre outras;
- Em relação ao conteúdo total de proteínas, o grupo majoritário foi o de celulases (38%), enquanto que as hemicelulases também foram bem

representativas (23%), e as demais proteínas constituíram 39% do proteoma;

- As proporções aproximadas dos grupos enzimáticos dentre o total de celulases de *T. harzianum* IOC 3844 frente aos resultados de caracterização proteômica foram de: endoglucanases (52%), exoglucanases (22%) e beta-glucosidases (26%);
- Quanto ao total de hemicelulases, o maior percentual estimado foi de xilanases (59%), seguido por manosidases (23%), glucuronidase (5%), arabinofuranosidase (4%), galactosidase (4%), arabinopiranosidase (2%), mananase (1%), xilosidase (1%), e fucosidase (1%);
- O extrato enzimático de *T. harzianum* concentrado apresentou elevadas atividades enzimáticas: 1.034.801,1 U/L (CMCase), 46.661,5 U/L (FPase), 23.750,7 U/L (β-glucosidase) e 21.200,5 U/L (avicelase);
- O extrato enzimático concentrado de *T. harzianum* IOC 3844 apresentou um grande potencial para ser aplicado na conversão de celulose em açúcares fermentáveis para a produção de etanol de segunda geração. A máxima eficiência de hidrólise obtida neste estudo foi de 65%;
- A análise estatística da hidrólise enzimática utilizando diferentes concentrações de substrato e diferentes cargas enzimáticas de celulases de *T. harzianum* indicou que dentro da faixa estudada, em termos de aplicação industrial, seria interessante utilizar a concentração de substrato de 100 g/L, uma vez que apesar de a eficiência de hidrólise ter sido estatisticamente semelhante para as diferentes concentrações de substrato, a quantidade de glicose liberada foi mais elevada para tal concentração;

- O aumento da carga enzimática do preparado celulásico de *T. harzianum* gerou aumento significativo na eficiência de hidrólise. Contudo, fazendo a correlação do aumento da carga enzimática *versus* o aumento da eficiência de hidrólise, verificou-se que a porcentagem do aumento de carga enzimática foi consideravelmente superior à porcentagem do aumento da eficiência de hidrólise, o que, em um primeiro momento, não seria indicado em termos operacionais;
- Quanto ao tempo, os dados mostraram que 48 horas de hidrólise foi o melhor tempo dentre as condições avaliadas, visto que proporcionou eficiência de hidrólise significativamente superior ao de 24 horas, principalmente quando foram utilizados 100 g/L de substrato;
- A adição de β-glucosidase comercial aos meios de hidrólise enzimática com celulases *T. harzianum* mostrou uma contribuição efetiva de tais enzimas à eficiência hidrolítica (aumento de 41% na eficiência de hidrólise);
- Comparativamente ao preparado enzimático comercial *Multifect*®, os valores de eficiência de hidrólise indicaram que *T. harzianum* tem um competitivo complexo celulolítico para a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (100 g/L; 25 FPU/g). Após 24 horas, as eficiências de hidrólise de celulignina em glicose foram de 42% (preparado enzimático de *T. harzianum*) e 48% (*Multifect*®);
- Ao avaliar o efeito do grau de deslignificação da celulignina parcialmente deslignificada (100 g/L; 25 FPU/g; 72 h), foi observado que o desempenho do preparado celulásico de *T. harzianum* sobre a celulignina tratada com 1%, 2% ou 4% (m/v) de NaOH levou a resultados similares [27,7 g/L (NaOH 1%); 28,1 g/L (NaOH 2%); 28,3 g/L (NaOH 4%)];

- Foi possível produzir swolenina recombinante de *T. harzianum* por expressão heteróloga. As melhores condições para a produção desta proteína acessória foram: temperatura 20°C e 3 dias de cultivo;
- A purificação da swolenina recombinante por FPLC foi confirmada por análise de *Western blot*, tendo sido constatado que se trata de uma proteína glicosilada;
- A concentração da swolenina recombinante foi de 197,1 mg/L, equivalendo à 93 vezes a concentração de swolenina do preparado celulásico de *T. harzianum* obtido em condições nativas. Esse foi um grande avanço obtido no presente trabalho, visto que swolenina é uma das proteínas acessórias atualmente bastante estudadas para a composição de preparados enzimáticos de hidrólise da biomassa celulósica;
- Verificou-se 95% de similaridade entre swolenina de *T. reesei* e *T. harzianum*, sinalizando o potencial de aplicação e efeito desta proteína na amorfogênese de biomassas celulósicas.

Capítulo 7

7. SUGESTÕES

O presente doutoramento gerou as seguintes sugestões para continuidade da pesquisa:

- Avaliar o efeito da concentração de celulignina parcialmente deslignificada na produção de celulases por *T. harzianum* IOC 3844;
- Elevar o teor de proteínas ao patamar de preparados comerciais (~50 mg/L) por meio da otimização da relação carbono-nitrogênio;
- Verificar o efeito de surfactantes durante a hidrólise enzimática;
- Avaliar o efeito da swolenina na eficiência de hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada;
- Realizar estudos estruturais da swolenina de *T. harzianum*.
- Realizar a superexpressão homóloga de enzimas-chave (como por exemplo β-glucosidase), de forma que o preparado celulásico de *T. harzianum* seja auto-suficiente;
- Estudar o processo de produção de etanol 2G utilizando o hidrolisado de celulignina parcialmente deslignificada obtido com celulases de *T. harzianum*.

Capítulo 8

8. REFERÊNCIAS

AACHMANN, F. L.; SØRLIE, M.; SKJÅK-BRÆK, G.; EIJSINK, V. G.; VAAJE-KOLSTAD, G. NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 109, n. 46, p. 18779-84, 2012. DOI:10.1073/pnas.1208822109

ADAV, S. S.; LI, A. A.; MANAVALAN, A.; PUNT, P.; SZE, S. K. Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 8, p. 3932–3940, 2010.

AHAMED, A. & VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.

AHMED, S.; BASHIR, A.; SALEEM, H.; SAADIA, M.; JAMIL, A. Production and purification of cellulose degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 1411-1419, 2009.

AIELLO, C.; FERRER, A.; LEDESMA, A. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 13-18, 1996.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Universidade Federal de Viçosa, 574p, Editora UFV, Minas Gerais, Brasil, 1998.

ARANTES, V. & SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n.4, 2010.

BAKER, J. O.; KING, M. R.; ADNEY, W. S.; DECKER, S. R.; VINZANT, T. B.; LANTZ, S. E.; NIEVES, R. E.; THOMAS, S. R.; LI, L. C.; COSGROVE, D. J.; HIMMEL, M. E. Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 217-223, 2000.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BARA, M. T.; LIMA, A. L.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an exo-beta-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, n. 1, p. 81-85, 2003.

BARCELOS, C. A.; MAEDA, R. N.; BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA Jr., N. The Essentialness of Delignification on Enzymatic Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse Cellulignin for Second Generation Ethanol Production. **Waste Biomass Valor**, v. 4, n. 2, p. 341-346, 2012. DOI 10.1007/s12649-012-9137-3

BEESON, W. T.; PHILLIPS, C. M.; CATE, J. H. D.; MARLETTA, M. A. Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 890-892, 2012. dx.doi.org/10.1021/ja210657t

BEKKER, C.; WIEBENGA, A.; AGUILAR, G.; WÖSTEN, H. A. B. An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, n. 3, p. 305-306, 2009.

BETANCUR, G. J. V. & PEREIRA Jr., N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3, 2010.

BETANCUR, G. J. V. **Avanços em Biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Pichia stipits*.** Rio de Janeiro, 123 f., 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

BOKMA, E.; VAN KONINGSVELD, G. A.; JERONIMUS-STRATINGH, M.; BEINTEMA, J. J. Hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, cleaves peptidoglycan between the C-1 of N-acetylglucosamine and C-4 of N-acetylmuramic acid and therefore is not a lysozyme. **FEBS Letters**, v. 411, n. 2-3, p. 161-163, 1997.

BOLLÓK, M. & RÉCZEY K. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. **Acta Alimentaria**, v. 29, n. 2, p. 155-168, 2000.

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. 75, p. 248-254, 1976.

BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene ugdh de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. Piracicaba, 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, 2007.

BROTMAN, Y; BRIFF, E; VITERBO, A; CHET, I. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. **Plant Physiology**, v. 147, p. 779–789, 2008.

CARVALHO, M. L. A. **Otimização da produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa**. Rio de Janeiro, 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentos, obtidas a partir de celulignina parcialmente deslignificada de açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006, 212 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

CASTRO, A. M.; FERREIRA, M. C.; CRUZ, J. C.; PEDRO, K. C. N. R.; CARVALHO, D. F.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA Jr., Nei. High-Yield Endoglucanase Production by

Trichoderma harzianum IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

CASTRO, A. M. & PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 1-12, 2010.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentos, obtidas a partir de celulignina parcialmente deslignificada de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.).** Rio de Janeiro, 2006. 212 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

CAZy, 2013. Disponível em: http://www.cazy.org

CHANDRA, R.P.; BURA, R.; MABEE, W.E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 108, p. 67-93, 2007.

CHEMICAL SCIENCES DIVISION. Pyrolysis of Biomass Model Compounds, 2009. Disponível em: http://web.ornl.gov/sci/csd/Research_areas/poc_rd_Pyrolysis.html

CHEN, X.; ISHIDA, N.; TODAKA, N.; NAKAMURA, R.; MARUYAMA, J.; TAKAHASHI, H. KITAMOTO, K. Promotion of Efficient Saccharification of Crystalline Cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swo1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2556–2561, 2010. doi: 10.1128/AEM.02499-09

CHUN, S.; CHOI, E.; LEE, E.; KIM, J. H.; LEE, S.; LEE, S. Eco-friendly cellulose nanofiber paper-derived separator membranes featuring tunable nanoporous network channels for lithium-ion batteries. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 16618-16626, 2012. DOI: 10.1039/C2JM32415F

CHUNDAWAT, S. P. S.; LIPTON, M. S.; PURVINE, S. O.; UPPUGUNDLA, N.; GAO, D.; BALAN, V.; DALE, B. E. Proteomics-based Compositional Analysis of Complex Cellulase Hemicellulase Mixtures. **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 4365-4372, 2011. dx.doi.org/10.1021/pr101234z

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

COLUSSI, F.; SERPA, V.; DELABONA, P. S.; MANZINE, L. R.; VOLTATÓDIO, M. L.; ALVES, R.; MELLO, B. L.; PEREIRA JR., N.; FARINAS, C. S.; GOLUBEV, A. M.; SANTOS, M. A. M.; POLIKARPOV, I. Purification, and Biochemical and Biophysical Characterization of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 808–817, 2011. doi: 10.4014/jmb.1010.10037

CONESSA, A.; PUNT, P.; VAN LUIJK, N.; VAN DEN HONDEL, C. The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. **Fungal Genetics and Biology**, v. 33, p. 155-171, 2001.

COSGROVE, D. J. New genes and new biological roles for expansins. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 73-78, 2000.

COSGROVE, D. J. Enhancement of accessibility of cellulose by expansins. United States Patent. Patent No. US 6,326,470 B1, 2001.

DAN, S.; MARTON, I.; DEKEL, M.; BRAVDO, B. A.; HE, S.; WITHERS, S. G.; SHOSEYOV, O. Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* beta-glucosidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n.7, p. 4973-80, 2000.

DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. L. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis Perniciosa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 33-38, 2003.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012.

DERRINGER, G. & SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219, 1980.

DIVNE, C; STÅHLBERG, J; REINIKAINEN, T; RUOHONEN, L; PETTERSSON, G; KNOWLES, J. K.; TEERI, T. T.; JONES, T. A. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 265, n. 5171, p. 524-528, 1994.

DSM IP Assets B.V.. **Method for improving the yield of a polypeptide**. International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PTC). International Publication Number WO2010/102982 A1, p. 35-36, 2010.

EL-NAWWI, S. A. & EL-KADER, A. A. Production of single cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: effect of culture factors. **Biomass and Bioenergy**, v. 11, n. 4, p. 361-364, 1996.

EMC, 2010. Diponível em: www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/

EPE, 2013. Empresa de Pesquisa Energética. Relatório Final do Balanço Energético Nacional. Ministério de Minas e Energia, 2013. Disponível em: https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2013.pdf

FENGEL, D. & WEGENER, G. **Woody chemistry, ultraestruture, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERREIRA, V.; FABER, M. O.; MESQUITA, S. S.; PEREIRA Jr., N. Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β-glucosidase gene. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 1-7, 2010.

FIESP/CIESP. Ampliação da oferta de energia através da biomassa. São Paulo: FIESP/CIESP, 2006. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/publicacoes/>.

FOREMAN, P. K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N. S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T. D.; ENGLAND, G. J.; KELLEY, A. S.; MEERMAN, H. J.; MITCHELL, T.; MITCHINSON, C.; OLIVARES, H. A.; TEUNISSEN, P. J. M.; YAO, J.; WARD, M. Transcriptional Regulation of Biomass-degrading Enzymes in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31988–31997, 2003.

FRY, S. C. Unzipped by expansins. Newly discovered plant proteins, known as expansins, break hydrogen bonds in the cell wall and may play an important role in plant growth. **Current Biology**, v. 4., n. 9, 1994.

GAUSS, W. F.; SUZUKI, S.; TAKAGI, M. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. U.S. Patent No.3,990,944, 1976.

GERVAIS, P. & MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72-78, 2010.

GOURLAY, K.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 51, 2012. doi:10.1186/1754-6834-5-51

GOURLAY, K.; HU, J.; ARANTES, V.; ANDBERG, M.; SALOHEIMO, M.; PENTTILÄ, M.; SADDLER, J. Swolenina aids in the amorfogênese step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 498–503, 2013.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W.; SUZUKI, D. T.; MILLER, J. H. **Introdução à Genética**. 8ª Ed. Editora Guanabara, 2006.

GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENGERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 173-178, 1999.

HALL, M.; BANSAL, P.; LEE, JH.; REALFF, M.J.; BOMMARIUS, A.S. Biological pretreatment of cellulose: Enhancing enzymatic hydrolysis rate using cellulose-binding domains from cellulases. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2910-2915, 2011.

HARRIS, P. V.; WELNER, D.; MCFARLAND, K. C.; RE, E.; NAVARRO POULSEN, J. C.; BROWN, K.; SALBO, R.; DING, H.; VLASENKO, E.; MERINO, S.; XU, F.; CHERRY, J.; LARSEN, S.; LO LEGGIO, L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305–3316, 2010.

HAYASHI, T. & MACLACHLAN, G. Pea Xyloglucan and Cellulose: I. Macromolecular Organization. **Plant Physiology**, v. 75, n. 3, p. 596–604, 1984.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309-316, 1991. [PMID: 1747104].

HEROLD, S.; BISCHOF, R.; METZ, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. Xylanase gene transcription in *Trichoderma reesei* is triggered by different inducers representing different hemicellulosic pentose polymers. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 3, p. 390-398. doi: 10.1128/EC.00182-12, 2013.

HIMMEL, M. Cellulase Animation. National Renewable Energy Laboratory, 2000.

HÖLKER, U. & LENS, J. Solid state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 45, 2012. doi:10.1186/1754-6834-5-45

IEA - International Energy Agency, 2013. Disponível em: www.iea.org

IKRAM-UL-HAQ; SHAHZADI, K.; HAMEED, U.; JAVED, M. M.; QADER, M. A. Solid-state fermentation of cellulases by locally isolated *Trichoderma harzianum* for the exploitation of agricutural byproducts. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1779-1782, 2006.

ISHIHAMA, Y.; ODA, Y.; TABATA, T.; SATO, T.; NAGASU, T.; RAPPSILBER, J.; MANN, M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 1265-1272, 2005.

IUBMB, 2013. Disponível em: http://www.iubmb.org

JÄGER, G.; GIRFOGLIO, M.; DOLLO, F.; RINALDI, R.; BONGARD, H.; COMMANDEUR, U.; FISCHER, R.; SPIESS, A. C.; BÜCHS, J. How recombinant swolenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 33, 2011.

JGI. Joint Genome Institute, 2013. Disponível em: www.jgi.com

JORGENSEN, A.; MORKEBERG, K. B. R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by trhee Penicillium species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electroforesis. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 36, p. 42-48, 2005.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; SZIJÁRTÓ, N.; RÉCZEY, K. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 201-211, 2004.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207-213, 2003.

KANG, K.; WANG, S.; LAI, G.; LIU, G.; XING, M. Characterization of a novel swolenina from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 42, 2013. doi:10.1186/1472-6750-13-42

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; THOMAS, W. J. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, v.80, p. 241-247, 2000.

KERFF, F.; AMOROSO, A.; HERMAN, R.; SAUVAGE, E.; PETRELLA, S.; FILEE, P.; CHARLIER, P.; JORIS, B.; TABUCHI, A.; NIKOLAIDIS, N.; COSGROVE, D.J. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, p. 16876–16881, 2008.

KERN, M.; MCGEEHAN, J. E.; STREETER, S. D.; MARTIN, R. N. A.; BESSER, K.; ELIAS, L.; EBORALL, W.; MALYON, G. P.; PAYNEC, C. M.; HIMMEL, M. E.; SCHNORR, K.; BECKHAM, G. T.; CRAGG, S. M.; BRUCE, N. C.; MCQUEEN-MASON, S. J. Structural characterization of a unique marine animal family 7 cellobiohydrolase suggests a mechanism of cellulase salt tolerance.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2013. doi: 10.1073/pnas.1301502110

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

KIRIHATA, J. Novozymes prepara nova fábrica no Brasil, 2010. Disponível em: <http://economia.ig.com.br/empresas/agronegocio/novozymes+prepara+nova+fabrica+no+brasil/n1237718319958.html> acesso em: 21/07/2010.

KNOWLES, J. K. C.; LEHTOVAARA, P.; MURRAY, M.; SINNOTT, M. L. Stereochemical course of the action of the cellobioside hydrolases I and II of *Trichoderma reesei*. **Journal of the Chemical Society**, 1401-1402, 1988. DOI: 10.1039/C39880001401

KOCHER, G.; KALRA, K.; BANTA, G. Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, 2008.

KOTCHONI, O. S.; SHONUKAN, O. O.; GACHOMO, W. E. *Bacillus pumilus* BpPRI 6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 140-146, 2003.

KRÄSSING, H. A. **Effect of structure and morphology on accessibility and reactivity**. In Cellulose: Structure, Accessibility, and Reactivity, v. 11. Edited by: Krässing HA. Gordon and Breach Science Publishers, p. 167-324, 1993.

KREDICS, L.; ANTAL, Z.; SZEKERES, A.; HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; VÁGVÖLGYI, C,; NAGY, E. Extracellular proteases of *Trichoderma* species. A review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 52, n. 2, p. 169-184, 2005.

KRISTENSEN, J. B.; B¨ORJESSON, J.; BRUUN, M. H.; TJERNELD, F.; JØRGENSEN, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 888-895, 2007.

KRUSZEWSKA, J.; BUTTERWECK, A. H.; KURZATKOWSKI, W.; MIGDALSKI, A.; KUBICEK, C. P.; PALAMARCZYK, G. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyl-phosphodolichol synthase encoding gene in *Trichoderma*

reesei results in the increased protein secretion and abnormal cell ultrastructure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2382-2387, 1999.

KUDRYAVTSEVA, O. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; KAMZOLKINA, O. V.; BELOZERSKY, M. A. Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes. **Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 643-653, 2008.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

LI, X. L.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; WU, Y. V.; SAHA, B. C. Profile of enzyme production by *Trichoderma reesei* grown on corn fiber fractions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 321-334, 2005.

LIMA, D. U. **Interação molecular entre celulose e hemiceluloses e suas implicações biológicas e tecnológicas**. Campinas, 2002, 101 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

LIMING, X. & XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 corn cob residue. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 259-262, 2004.

LODISH, H. **Molecular Cell Biology**. 5th Edition. New York (W. H.): Freeman and company, 2004.

LOMBARD, V.; RAMULU, H. G.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v.42, n. 1, D490-5, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1178

LYND, L. R.; WEMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACGREGOR, E. A. **An overview of clan GH-H and distantly-related families**. Biologia. 60/Suppl. v.16, p. 5-12, 2005.

MAEDA, R. N. **Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na**

produção de etanol de segunda geração. Rio de Janeiro, 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA JR., N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1196–1201, 2011.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA JR. N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 38-44, 2013.

MANDELS, M. & WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804-816, 1999.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2013/04/producao-de-cana-deve-ultrapassar-650-milhoes-de-toneladas

MARTINS, L. F. Perfil hidrolítico das celulases de *Penicillium echinulatum*. In: **Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Recife: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparation of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity agaist various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MASSADEH, M. I.; YUSOFF, W. M. W.; OMAR, O.; KADER, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1771-1774, 2001.

MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. **The Plant Cell**, v. 4, p. 1425-1433, 1992.

MDIC. Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior, 2010. Disponível em: www.mdic.gov.br

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, GOMES, V. M.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. **Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011. DOI: 10.5433/1679-0375.2011v32n2p213

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MME. Ministério de Minas e Energia, 2007. Plano Nacional de Energia 2030. Disponível em: www.mme.gov.br

MO, H.; ZHANG, X.; LI, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium* decumbens in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1293-1297, 2004.

MUSSATTO, I.S. **Influência do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz na Produção de Xilitol por *Candida guilliermondii*.** Lorena, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Curso de Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2002.

NCBI, 2013. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

NC-IUBMB. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2013. Disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. 2013.

NOGAWA, M.; GOTO, M.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. **Current Genetics**, v. 38, n. 6, p. 329-334, 2001.

NREL. National Renewable Energy Laboratory. SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **NREL Analytical Procedure** N. 004. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, 2005.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 1-14, 2008.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Jounal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PEREIRA, Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of Lignocellulosic Composition for Fuel Ethanol Production and the Context of Biorefinery**. Series on Biotechnology. Rio de Janeiro: Biblioteca Nacional, v. 2, 2008.

PEREIRA Jr, N.; BON, E.P.S. & FERRARA, M.A. **Tecnologia de Bioprocessos**. Séries em Biotecnologia. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, vol. 1, 2008b.

PETROBRAS. Petróleo Brasileiro S.A. (BR/RJ). MAEDA, R. N.; PEREIRA JR, N.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M.; GOMES, A. C.; SILVEIRA, C. J. G.; MOYSES, D. N. **Processo de produção de um preparado enzimático para hidrólise de celulose de resíduos lignocelulósicos e sua aplicação na produção de etanol** (BR. n. prot. dep. 020080158722), 2008.

PETROBRAS. Petróleo Brasileiro S.A. (BR/RJ). SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA JR, N.; GOMES, A.C.; PEÑUELA M. V. **Processo para a Produção de Etanol a partir de Materiais Lignocelulósicos por Via Enzimática**. BR n. PI0605017-4 A2, 2006.

PITSON S. M.; SEVIOUR R. J.; MCDOUGALL B. M.; WOODWARD J. R.; STONE B. A. Purification and characterization of three extracellular (1-->3)-beta-D-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. **Biochemical Journal**, v. 308, n.3, p. 733-741, 1995.

PRASERTSAN, P.; KITTIKUL, A. H.; KUNGHAE, A.; MANEESRI, J.; OI, S. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 555-559, 1997.

PUNT, P. J. & VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. [39] Transformation of filamentous fungi based on hygromycin b and phleomycin resistance markers. **Methods in Enzymology**, v. 216, p. 447-457, 1992.

QUIROZ-CASTANEDA, R.; MARTINEZ-ANAYA, C.; CUERVO-SOTO, L.; SEGOVIA, L.; FOLCH-MALLOL, J. Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 8, 2011.

RAMOS-FERNANDEZ, A.; PARADELA, A.; NAVAJAS, R.; ALBAR, J. P. Generalized method for probability-based peptide and protein identification from tandem mass spectrometry data and sequence database searching. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 1748-1754, 2008.

ROCHA, V. A. L. **Produção de celulases por *Trichoderma harzianum* e aplicação do preparado celulásico na hidrólise de bagaço de cana de açúcar**. Rio de Janeiro, 2010. 137 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

ROCHA, V. A. L.; MAEDA, R. N.; SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA Jr., N. Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, 2013.

RODRIGUES, M.I. & IEMMA A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª. Ed. São Paulo: Editora Casa do Pão, 2005.

ROMERO T. Etanol de segunda geração é essencial à sustentabilidade dos biocombustíveis, 2008. Disponível em: http://www.inovacaotecnologica.com.br/ noticias/noticia.php?artigo=etanol-de-segunda-geracao-e-essencial-a-sustentabilidade-dos-biocombustiveis&id=010115081226

ROUSSOS, S. & RAIMBAULT, M. Hydrolysis of cellulose by fungi. 1. Screening of cellulolytic strains. **Annals of Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 455-464, 1982a.

ROUSSOS, S. & RAIMBAULT, M. Hydrolysis of cellulose by fungi. II. Production of cellulases by *Trichoderma harzianum* by fermentation in liquid media. **Annals of Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 465-474, 1982b.

ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; SAUCEDO-CASTAÑEDA; LONSANE, B. K. Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system, 2004. **Micology Neotropical Ap.**, v.4, p. 83-98, 1991.

ROUVINEN, J.; BERGFORS, T.; TEERI, T.; KNOWLES, J. K.; JONES, T. A. Three dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 249, n. 4967, p. 380-386, 1990.

RYABOV, Y.; WHITE, C.; XUE, Y.; SKRYNNIKOV, N.R. Introducing color into stacking gels makes sample loading easy. **Analytical Biochemistry**, v. 366, n. 1, p.111-2, 2007.

SALOHEIMO, M.; PALOHEIMO, M.; HAKOLA, S.; PERE, J.; SWANSON, B.; NYYSSÖNEN, E.; BHATIA, A.; WARD, M.; PENTTILÄ, M. Swolenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 4202-11, 2002.

SALOHEIMO, M.; WANG, H.; VALKONEN, M.; VASARA, T.; HUUSKONEN, A.; RIIKONEN, M.; PAKULA, T.; WARD, M.; PENTTILÄ, M. Characterization of secretory genes ypt1/yptA and nsf1/nsfA from two filamentous fungi: induction of secretory pathway genes of *Trichoderma reesei* under secretion stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 459-467, 2004.

SCHLITTLER, L. A. F. S.; ANTUNES, A. M. S.; PEREIRA Jr. Nei. Use of Patent Applications as a Tool for Technology Development Investigations on Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass in Brazil. **Journal of Technology Management & Innovation**, v.7, n. 3, 2012. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27242012000300008

SIMS, R.; TAYLOR, M.; SADDLER, J.; MABEE, W.; RIESE, J. **From 1st-to 2nd Generation Biofuel Technologies**. An overview of current industry and R&D activities. Paris: Mendeley, IEA Bioenergy, 2008. 124 p.

SINNOTT, M. L. Catalytic mechanisms of enzymic glycoside transfer. **Chemical Reviews**, v. 90, p. 1170-1202, 1990.

SHIN, C. S.; LEE, J. P.; LEE, J. S.; PARK, S. C. Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 237-245, 2000.

SØRBOTTEN, A.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G.; VÅRUM, K. M. Degradation of chitosans with chitinase B from Serratia marcescens. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. **FEBS Journal**, v. 272, n. 2, p. 538-49, 2005. DOI:10.1111/j.1742-4658.2004.04495.x

STALS, I.; SANDRA, K.; GEYSENS, S.; CONTRERAS, R.; VAN, BEEUMEN, J.; CLAEYSSENS, M. Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. I: Postsecretorial changes of the O- and N-glycosylation pattern of Cel7A. **Glycobiology**, v. 14, p. 713-724, 2004.

STAVISKI, N. Brasil terá etanol de segunda geração em um ano e meio. Gazeta Mercantil (Resenha Eletrônica). 2008. Disponível em: http://www2.senado.leg.br/bdsf/handle/id/488892

STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KRÖGER, C.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis** B: Enzymatic, Amsterdam, v. 22, p. 347-355, 2003.

SUKUMARAM, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M. & PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioetanol production. **Renewable Energy**. v. 34, p. 421-424, 2009.

SULZENBACHER, G.; DRIGUEZ, H.; HENRISSAT, B.; SCHÜLEIN, M.; DAVIES, G. J. Structure of the *Fusarium oxysporum* endoglucanase I with a nonhydrolyzable substrate analogue: substrate distortion gives rise to the preferred axial orientation for the leaving group. **Biochemistry**, v. 35, n. 48, p. 15280-15287, 1996. DOI:10.1021/bi961946h

SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, p. 331-339, 2004.

SUN, Y. & CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Tecnology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUNDE M.; KWAN A. H.; TEMPLETON M. D.; BEEVER R. E.; MACKAY J. P. Structural analysis of hydrophobins. **Micron**, v. 39, n. 7, p. 773–84, 2008. doi:10.1016/j.micron.2007.08.003. PMID 17875392

SUTCLIFFE, R. & SADDLER, J. N. The role of lignin in the adsorption of cellulases during enzymatic treatment of lignocellulosic material. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, p. 749-762, 1986.

SUTO, M. & TOMITA, F. Induction and catabolic repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305-311, 2001.

TAHERZADEH, M. J. & KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v.2, n. 4, p. 707-738, 2007.

THONGPOO, P.; MCKEE, L. S.; ARAÚJO, A. C.; KONGSAEREE, P. T.; BRUMER, H. Identification of the acid/base catalyst of a glycoside hydrolase family 3 (GH3) beta-glucosidase from *Aspergillus niger* ASKU28. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 3, p. 2739-2749, 2013. DOI:10.1016/j.bbagen.2012.11.014

TÖRRÖNEN, A.; MACH, R. L.; MESSNER, R.; GONZALEZ, R.; KALKKINEN, N.; HARKKI, A.; KUBICEK, C. P. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. **Biotechnology (N Y)**, v. 10, n. 11, p. 1461-1465, 1992.

UJIIE, M.; ROY, C. & YAGUCHI, M. Low-molecular-weight xylanase from *Trichoderma viride*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1860–1862, 1991.

UMIKALSOM, M. S.; ARIFF, A. B.; HASSAN, M. A.; KARIM, M. I. A. Kinetics of cellulase production by *Chaetomium globosum* at different levels of dissolved oxygen tension using oil palm empty fruit bunch fibre as substrate. World **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 491-498, 1998.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2013. Disponível em: http://www.unica.com.br/noticia/29810917920343378786/usina-pioneira-de-etanol-celulosico-coloca-brasil/

UNICADATA. União da Indústria de Cana-de-açúcar. Acompanhamento de safra, 2013. Disponível em: http://www.unicadata.com.br/index.php

USDA. United States Department of Agriculture, 2013. USDA Agricultural Projections to 2022. Disponível em http://www.ers.usda.gov/media/1013562/oce131.pdf

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA, M. B.; PEREIRA Jr., N. Enzimatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137/140, n. 12, p. 141-154, 2007.

VELKOVSKA, S.; MARTEN, M. R.; OLLIS, D. F. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. **Journal of Biotechnology**, v. 54, p. 83-94, 1997.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; SANTAS, P.; SANTAS, R. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. **Bioresource Technology**, 98, 296–301, 2007.

WANG, L.S.; ZHANG, Y.Z.; GAO, P.J.; SHI, D.X.; LIU, H.W.; GAO, H.J. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, p. 443-456, 2006.

WANG, Y.; TANG, R.; TAO, J.; GAO, G.; WANG, X.; MU, Y.; FENG, Y. Quantitative investigation of non-hydrolytic disruptive activity on crystalline cellulose and application to recombinant swolenin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1353–1363, 2011. DOI 10.1007/s00253-011-3421-1

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/β-glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 93-104, 2005.

WONG, K. K. Y. & SADDLER, J. N. *Trichoderma* Xylanases, Their Properties and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 5-6 , p. 413-435, 1992. doi:10.3109/07388559209114234

XIA, L. & CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic wast from the xylose industry. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 909-912, 1999.

YANG B. & WYMAN, C. E. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. **Wiley InterScience**. In: www.interscience.wiley.com. DOI: 10.1002/bit.20750, 2006.

YAO, Q.; SUN, T.T.; LIU, W.F.; CHEN G.J. Gene Cloning and Heterologous Expression of a Novel Endoglucanase, Swolenina, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 11, p. 2799–2805, 2008.

YENNAWAR, N. H.; LI L. C.; DUDZINSKI, D. M.; TABUCHI, A.; COSGROVE, D. J. Crystal structure and activities of EXP1 (Zea m 1), a b -expansin and group-1 pollen allergen from maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, p. 14664-114671, 2006.

ZHANG, Y. H. P. & LYND L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHAO, H.; KWAK, J.H.; ZHANG, Z.; BROWN, H.M.; AREY, B.W.; HOLLADAY, J.E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 235-241, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1: Composição das soluções utilizadas

9.1 Soluções utilizadas nas análises de atividade enzimática

9.1.1 Padrão de celobiose

A concentração da solução padrão de celobiose utilizada nas quantificações enzimáticas foi de 2% (20 g/L), obtida dissolvendo-se este glicídio em tampão citrato de sódio pH 5,0. A solução foi mantida em geladeira por até 15 dias.

9.1.2 Padrão de CMC

A concentração da solução padrão de CMC utilizada nas quantificações enzimáticas foi de 2% (20 g/L), obtida dissolvendo-se este polímero na forma de seu sal de sódio em tampão citrato de sódio pH 5,0. A solução foi mantida em geladeira por até 15 dias.

9.1.3 Padrão de Avicel

A concentração da solução padrão de Avicel utilizada nas quantificações enzimáticas foi de 2% (20 g/L), obtida dissolvendo-se este polímero em tampão citrato de sódio pH 5,0. A solução foi utilizada no mesmo dia.

9.1.4 Padrão de xilana

A concentração da solução padrão de xilana utilizada nas quantificações enzimáticas foi de 2% (20 g/L), obtida dissolvendo-se este polímero em tampão citrato de sódio pH 5,0. A solução foi mantida em geladeira por até 15 dias.

9.1.5 Tampão citrato de sódio 50 mM

Este tampão é composto por duas soluções primárias, misturadas em diferentes proporções para cada pH. A tabela A1 mostra os volumes de cada solução que devem ser misturados e avolumados a 100 mL com água destilada (GOMORI, 1955).

Tabela A1: Composição do tampão citrato de sódio para diferentes valores de pH em volume final de 100 mL.

pH	Volume (mL) de solução de ácido cítrico 0,1 M	Volume (mL) de solução de citrato de sódio 0,1 M
3,0	46,5	3,5
4,0	33,0	17,0
4,8	23,0	27,0
5,0	20,5	29,5
5,3	17,0	33,0
5,5	14,9	35,1
6,0	9,5	41,5

9.1.6 Reagente DNS

O reagente DNS foi preparado seguindo-se as concentrações apresentadas na tabela A2 (MILLER, 1959). O ácido 3,5-dinitrosalicílico e o NaOH foram previamente dissolvidos e à solução obtida foram adicionados os demais componentes.

Tabela A2: Composição do reagente DNS.

Componente	Quantidade
Ácido 3,5-dinitrossalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
Sal de Rochele	306,0 g
Fenol	7,6 mL
Metabissulfito de sódio	8,3 g
Água destilada	1416 mL

9.2 Soluções utilizadas na eletroforese SDS-PAGE

9.2.1 Solução acrilamida para gel

Foram pesados 300 g de acrilamida e 8 g de bis-acrilamida para cada 1000 mL de água destilada (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

9.2.2 Solução SDS 10% para desnaturação de proteínas

Foram dissolvidos 10 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) para cada 100 mL de água destilada (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

9.2.3 Solução persulfato de amônio 10%

Foi dissolvido 0,1 g de persulfato de amônio em 1 mL de água destilada (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

9.2.4 Solução Triton 1%

Misturou-se 1 mL de Triton X-100 com tampão acetato de sódio para um volume final de 100 mL. Esta solução foi mantida em frasco escuro (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

9.2.5 Solução corante vermelho de congo para gel SDS-PAGE nativo

Foram dissolvidos 0,1 g de vermelho de congo em 100 mL de água desilada.

9.2.6 Solução descorante NaCl para revelação de CMCases e xilanases

Foi preparada uma solução 1 M de NaCl (58 g/L).

9.2.7 Solução descorante ácido acético para gel SDS-PAGE desnaturante

Misturou-se 50 mL de metanol e 70 mL de ácido acético e avolumou-se a 1000 mL de água destilada.

9.2.8 Gel SDS-PAGE

O gel foi preparado misturando-se os reagentes com as respectivas quantidades apresentadas na tabela A3 (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

Tabela A3. Composição do gel SDS-PAGE.

Gel de separação (10%)		Gel de empilhamento	
TRIS/ HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	TRIS/ HCl 1 M pH 6,8	1,25 mL
SDS 10%	100 μL	SDS 10%	100 μL
Acrilamida 30%	3,3 mL	Acrilamida 30%	1,3 mL
Persulfato de amônio 10%*	100 μL	Persulfato de amônio 10%*	100 μL
TEMED*	5 μL	TEMED*	10 μL
H_2O	4 mL	H_2O	7,35 mL

*Estes componentes devem ser adicionados por último porque fazem o gel endurecer.

9.2.9 Tampão de amostra SDS-PAGE

Este tampão foi preparado misturando-se os reagentes com as respectivas quantidades apresentadas na tabela A4. A solução foi mantida refrigerada a 4°C até a sua utilização. A composição do tampão de amostra para condições nativas foi idêntica, com exceção do β-mercaptoetanol que não foi adicionado (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

Tabela A4. Composição do tampão de amostra para SDS-PAGE.

Componente	Quantidade
Tampão Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL
Solução SDS 10%	4 mL
Glicerol	2 mL
Azul de bromofenol	2 mL
β-mercaptoetanol	100 μL
Água destilada (q.s.p.)	10 mL

9.2.10 Tampão de corrida

O tampão foi preparado misturando-se os itens mostrados na tabela A5. A solução foi mantida refrigerada em geladeira até a sua utilização (ALFENAS, 1998; RYABOV et al., 2007).

Tabela A5. Composição do tampão de corrida para SDS-PAGE.

Componente	Quantidade
Tris Base	30,28 g
Glicina	144,13 g
SDS	10 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

9.3 Soluções utilizadas na produção de swolenina recombinante

9.3.1 Tampão TBE (ou Tris/Borato/EDTA) (solução 10 x):

Tabela A6: Composição do Tampão TBE (ou Tris/Borato/EDTA) (solução 10 x).

Componente	Quantidade
Tris	107,81 g/L
EDTA	5,8 g/L
Ácido bórico	55,0 g/L

A partir da solução 10 x foi feita a diluição de 1x.

9.3.2 Meio LB Agar

Tabela A7: Composição do meio LB Agar.

Componente	Quantidade
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Ágar	15 g/L

Ajustar o pH do meio para 7,0 usando NaOH 1N. Autoclavar durante 20 minutos a 1 atm. Após autoclavagem, arrefecer até aprox. 55°C, adicionar antibiótico (se necessário), e transferir para placas de Petri. Deixar solidificar e armazenar a 4°C no escuro.

9.3.3 Carbenicilina 50 mg/L

A solução foi feita dissolvendo-se 0,5 mg de Carbenicilina em 10 mL de água. A solução foi mantida a 4°C.

9.4 Soluções utilizadas na preparação do protoplasto e transformação de *A. niger*

9.4.1 Solução de Sais MN 25 x

Tabela A8: Composição da solução de Sais MN 25 x.

Componente	Quantidade
$NaNO_3$	37,50 g
KCl	3,25 g
KH_2PO_4	9,50 g

Dissolver em água destilada e avolumar a 250 mL (PUNT el al., 1992).

9.4.2 Solução de Elementos traço 1000x

Tabela A9: Composição da solução de Elementos traço 1000x.

Componente	Quantidade
Água destilada	80,00 mL
$ZnSO_4.7H_20$	2,20 g
H_3BO_3	1,10 g
$MnCl_2.4H_2O$	0,50 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,50 g
$CoCl_2.6H_2O$	0,17 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,16 g
$NaMoO_4.H_2O$	0,15 g
Na_2.EDTA	5,00 g

Dissolver os componentes em água destilada (em ordem), ferver, esfriar a 60°C ajustar para pH 6,5 com KOH concentrado, esfriar à temperatura ambiente e avolumar para 100 mL (PUNT el al., 1992).

9.4.3 Solução $MgSO_4$ 50 x

Dissolver 6,5 g de $MgSO_4.7H_2O$ em 250 mL de água destilada e autoclavar a 1 atm por 20 minutos (PUNT el al., 1992).

9.4.4 Meio MN + URI

Tabela A10: Composição do meio MN + URI.

Componente	Quantidade
Sais MN 25x	16,0 mL
Elementos traço 1000x	0,4 mL
Glicose	4,0 g
Casaminoacidos	0,2 g
Uridina	0,4 g

Dissolver os componentes em água destilada, ajustar para pH 6,5 com NaOH concentrado e avolumar para 392 mL. Autoclavar a 1 atm por 20 minutos. Adicionar 8 mL de solução $MgSO_4$ 50x estéril (PUNT el al., 1992).

9.4.5 Tampão MM (*MM buffer*)

Tabela A11: Composição do Tampão MM (*MM buffer*).

Componente	Quantidade
$MgSO_4.7H_2O$	59,15 g
MES	0,8 g

Dissolver em água, ajustar o pH para 5,8 e avolumar a 200 mL. Autoclavar a 1 atm por 20 min. Estocar à temperatura ambiente (PUNT el al., 1992).

9.4.6 Tampão NM (*NM buffer*)

Tabela A12: Composição do Tampão NM (*NM buffer*).

Componente	Quantidade
NaCl	11,7 g
MES	0,8 g

Dissolver em água, ajustar o pH para 5,8 e avolumar a 200 mL. Autoclavar a 1 atm por 20 min. Estocar à temperatura ambiente (PUNT el al., 1992).

9.4.7 Meio AMMN

Dissolver os sais, elementos traço e glicose em água destilada, ajustar para pH 6,5 com NaOH concentrado, adicionar o ágar, homogeneizar e avolumar para 980 mL. Autoclavar a 1 atm por 20 minutos. Adicionar 20 mL de solução $MgSO_4$ 50x estéril (PUNT el al., 1992).

Tabela A13: Composição do meio AMMN

Componente	Quantidade
Sais MN 25 x	40 mL
Elementos traços 1000 x	1 mL
Glicose	10 g
Ágar	15 g

9.4.8 Meio AMMN + Sorbitol

O modo de preparo é similar ao meio AMMN, com adição de 218,64 g de sorbitol (=1,2 M) (PUNT el al., 1992).

9.4.9 Meio CLS

Dissolver os componentes em água, ajustar para pH 5,8 com NaOH ou H_2SO_4 e avolumar para 1 litro. Autoclavar a 1 atm por 20 minutos (DSM IP ASSETS B.V., 2010).

Tabela A14: Composição do meio CLS.

Componente	Quantidade
Sólidos de macerados de milho (Roquete)	100 g
$NaH_2PO_4.H_2O$	1 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
Glicose	10 g
Basildon (antiespumante)	0,25 g

9.4.10 Meio de fermentação modificado (50%)

O meio de fermentação foi feito a 50%, visto que apresentou melhor desempenho que o meio original (DSM IP ASSETS B.V., 2010).

Tabela A15: Composição do meio de fermentação modificado (50%)

Componente	Quantidade
Maltose.H2O	75 g
Soytone (peptona)	30 g
$NaH_2PO_4.H_2O$	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	7,5 g
Tween 80	0,04 g
Basildon (antiespumante)	0,01 g
MES	10 g
L-arginina	0,5 g

Dissolver os componentes em água, ajustar para pH 6,2 com NaOH ou H_2SO_4. e avolumar para 1 litro. Autoclavar a 1 atm por 20 minutos.

9.4.11 Meio líquido YPD

Tabela A16: Composição do Meio líquido YPD.

Componente	Quantidade
Extrato de levedura	10 g/L
Bacto-Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L

Os componentes foram homogeneizados e autoclavados a 1 atm por 20 minutos.

9.5 Soluções utilizadas na avaliação da swolenina recombinante

9.5.1 Corante de Ponceau (0,1%)

Dissolver 1 g de corante de Ponceau em 1000 mL de ácido acético 5% v/v. Armazenar à temperatura ambiente.

9.5.2 Tampão TBST (*Tris-Buffered Saline and Tween 20*)

Foi preparada a seguinte composição em água: 50 mM Tris, 150 mM, NaCl e 0,05% Tween.

9.5.3 Solução bloqueadora 5% m/v

Dissolver 1,5 g de leite (5%) em 30 mL de Tampão TBST. Usar imediatamente.

ANEXO 2: Mapa da Swolenina

9.6 Mapa da Swolenina

>SWO1 (região codificante em verde, regiões UTR 5 'e 3' em preto)

CCCAAATAGTCGTAATAGCCGGAATGGCTCGTAAACTTAGTCTACTGGCTCTTGCAAG
CCTTATTTCGCTGTCAGTTCAGCAGAATTGCGCAGCATTATTTGGCCAATGTGGAGGT
AATGGATGGACCGGCTCAACATGCTGCGTTTCTGGCGCCCAGTGCACTTACGTGAAC
GACTTCTATTCTCAGTGTCTTGCCTCAACTGGTGGCGGCAGTACTACTAGTAGATCAT
CAACTTCATCCAGCTCAGTCTCAAGATCTTCATCTACTAGCTCAGTTTCCAGATCCTCAT
CTGCCGGCTCCTCGCCTGGGGGCGGCTCACCAACTGGTGGCGCTTCTACGTATACAA
CGACTGATACTGCTACGGTTGCTCCTCATTCCCAGTCTCCTTACCCCAGTATTGCTGCC
TCCAGCTGCGGGTCCTGGACTCTAGTGGATAATGTTTGCTGTCCATCATATTGTGCCA
CCGATGACACATCCGAGTTCTGCACGGGCGGCTGCACCTGTGCCACGCCACCTTCGG
CGGATTGCAAATCAGGAACTATGTACCCAGAAGTCCACCATGTAACTAGCAATGAGA
CTTGGCACTACAGCAGATCTACGCATTTCGGCTTGACAAGCGGCGGAGCTTGTGGCT
TTGGCCTCTATGGTCTCTGCACAAAAGGCAGTGTTACCGCGAGCTGGACAGATCCTAT
GTTGGGATCAACCTGTGATGCTTTCTGCACAGCCTACCCCTTACTTTGCAAAGATCCTA
CGGGCACTACTCTTCGCGGCAACTTTGCAGCACCAAACGGAGATTATTATTCGCAGTT
TTGGTCTTCTCTGCCAGGAGCCCTAGATAACTACCTGTCTTGTGGCGAATGCATTGAA
CTCATTCAGACGAAACCAGACGGAACCGACTATGCTGTAGGGGAAGCTGGCTACACT
GATCCGATCACTCTGGAGATAGTAGACAGCTGCCCTTGTAGCGCAAATTCCAAGTGG
TGCTGTGGCCCCGGTGCCGATCATTGCGGAGAGATCGATTTTAAATATGGCTGCCCTC
TTCCGGCCGACAGCATTCATCTCGATCTCTCAGACATTGCCATGGGCCGCTTACAGGG
CAACGGTTCACTCACTAATGGTGTGATTCCAACTCGATACAAGAGAGTTCCTTGCCCC
AAACTTGGAAATGTTTATATATGGCTTCGAAATGGCGGGGGGCCGTACTACTTTGCTC
TGACAGCCGTGAATACTAATGGACCCGGATCGGTCACCAAGATTGAGATCAAGGGTG
CAGGCACAGATACTTGGGTTGCTTTGGAACATGATCCAAACTACACCAGCAGTCGCCC
ACAAGAACGATATGGAAGCTGGGTAATTCCACAGGGGTCAGGACCTTTCAATCTGCC
CGTTGGAATACGCCTTACTAGCCCAACGGGAGAGCAGATTGTTAATGAACAAGCCAT
AAAGACATTTACTCCACCAGCGACAGCAGATCCTAACTTCTATTACATCGACATCGGC
GTACAGTTTAGTCAAAACTAAGAATGGACGCTTGAACCA

ANEXO 3: Primers utilizados

9.7 Primers de isolamento do cDNA

5'UTR_SWO		CCCAAATAGTCGTAATAGCCG		62
5'ATG_SWO		ATGGCTCGTAAACTTAGTCTACTGG		62
3'UTR_SWO		TGGTTCAAGCGTCCATTC		62
3'Stop_SWO		TTAGTTTTGACTAAACTGTACGCC		60

9.8 Primers de sequenciamento

Seq_SWO1F		GGAGCTTGTGGCTTTGGC		58
Seq_SWO2F		GCCGTACTACTTTGCTCTGACAG		58

9.9 Primers de expressão em *A. niger*

5'SWO_KEX2		AAATCTAGA AAGCGCGGCGGTGGC ATGGCTCGTAAACTTAGTCTACTGG	
3'SWO_HIS		TTTGTTAACTTAATGATGATGATGATGATGATGATGATG GTTTTGACTAAACTGTACGCCGAT	
5'SP_SWO_KEX2		AAATCTAGA AAGCGCGGCGGTGGC TTATTTGGCCAATGTGGAGGTA	