

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Seleção de fungos filamentosos produtores de hidrolases e pré-otimização
das condições de cultivo**

Isabela Moraes Ascencio

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2016**

Isabela Moraes Ascencio
Bacharel em Ciências Biológicas

Seleção de fungos filamentosos produtores de hidrolases e pré-otimização das condições de cultivo

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Ascencio, Isabela Moraes

Seleção de fungos filamentosos produtores de hidrolases e pré-otimização das condições de cultivo / Isabela Moraes Ascencio. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

110 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Biomassa 2. Celulases 3. Xilanases 4. Fontes de nitrogênio 5. Agentes tamponantes
6. Fontes de carbono 7. Hidrólise 8. *Trichoderma reesei* 9. *Aspergillus brasiliensis* I. Título

CDD 576.11925
A811s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Elio e Ana Lucia, por todo amor e apoio incondicionais.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e a coordenação do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), por possibilitar a realização desse projeto e apoiar a minha formação acadêmica;

Ao professor doutor Luiz Carlos Basso, pela orientação e apoio;

Ao doutor Marcos Henrique Luciano Silveira, pela orientação, aprendizado e principalmente por ser uma inspiração na busca pelo conhecimento;

À minha família, pelo amor, apoio e paciência em todos os momentos. Em especial a meus pais José Elio e Ana Lucia, meus irmãos Guilherme e Pedro, minhas cunhadas Fernanda e Rita e meus sobrinhos Duda, Théo, Manu e Davi;

A Danilo Ribeiro de Lima, por todo o carinho e apoio incondicionais;

A todos os colegas de CTC, principalmente aos do Laboratório de Biotecnologia Industrial e Enzimas: Cesar Camilo, Vivian Hayashida, Noemia Souza, Edilene Zulian, Bruno Vanelli e Cassiara Gonçalves. Também a Iuri Gouvêa e Junio Cota que apesar de não fazerem mais parte do time, contribuíram muito para a realização deste trabalho;

Aos meus irmãos do coração Raquel Peron e Rafael Della Colleta, por todo amor e apoio;

A David Henry Moon, por todos os ensinamentos;

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

"Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muita fadiga e persistência."

Henry Ford

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 DESENVOLVIMENTO.....	25
2.1 Revisão Bibliográfica	25
2.1.1 Bioetanol.....	25
2.1.2 Material lignocelulósico	26
2.1.2.1 Pré-tratamento do material lignocelulósico	28
2.1.2.2 Hidrólise do material lignocelulósico.....	30
2.1.3.1 Microrganismos produtores de enzimas que atuam no material lignocelulósico	32
2.1.3.2 Fatores que influenciam a produção enzimática.....	37
2.1.4 Medida da atividade enzimática	41
2.2 Material e Métodos	42
2.2.1 Microrganismos e manutenção das linhagens	42
2.2.2 Identificação molecular dos isolados.....	43
2.2.2.1 Extração de ácidos nucleicos	43
2.2.2.2 Amplificação, purificação e quantificação dos amplificados da região ITS	44
2.2.2.3 Sequenciamento e análise das sequências	44
2.2.3 Meios de cultivo para produção de enzimas lignocelulolíticas	44
2.2.3.1 Análise preliminar das linhagens.....	44
2.2.3.2 Otimizações do meio de cultivo	45
2.2.3.2.1 Fonte de nitrogênio.....	46
2.2.3.2.2 Soluções tamponantes.....	46
2.2.3.2.3 Fonte de carbono	47
2.2.4 Determinação da atividade enzimática em teste miniaturizado.....	48
2.2.5 Avaliação do pH	49
2.2.6 Hidrólise enzimática	49
2.2.6.1 Obtenção e liofilização dos secretomas.....	49
2.2.6.2 Avaliação dos materiais liofilizados.....	49

2.2.6.3 Ensaio de hidrólise enzimática.....	50
2.3 Resultados e Discussão	51
2.3.1 Análise inicial das linhagens.....	51
2.3.1.1 Identificação molecular.....	52
2.3.1.2 Atividade celulolítica e xilanolítica	52
2.3.2 Otimização do meio de cultivo	54
2.3.2.1 Fonte de nitrogênio	54
2.3.2.2 Tamponamento de meio de cultivo.....	58
2.3.2.2.1 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (F88).....	59
2.3.2.2.2 <i>Aspergillus brasiliensis</i> (F811).....	63
2.3.2.2.3 <i>Trichoderma reesei</i> QM9414.....	66
2.3.2.3 Fontes de carbono	70
2.3.2.3.1 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (F88).....	71
2.3.2.3.2 <i>Aspergillus brasiliensis</i> (F811).....	76
2.3.2.3.3 <i>Trichoderma reesei</i> QM9414.....	80
2.3.2.3 Análise geral dos ensaios de otimização dos meios de cultivo.....	85
2.3.3 Hidrólise da biomassa	86
2.3.3.1 Liofilização dos secretomas	87
2.3.3.2 Caracterização dos secretomas.....	88
2.3.3.3 Ensaio de hidrólise de biomassa.....	90
2.3.3.4 Análise geral dos ensaios de hidrólise	93
3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
REFERÊNCIAS.....	96

RESUMO

Seleção de fungos filamentosos produtores de hidrolases e pré-otimização das condições de cultivo

A crescente demanda por energia e a necessidade de promover o desenvolvimento sustentável colocam em foco os combustíveis renováveis. Dentro de biocombustíveis, os 2G ou segunda geração, têm como objetivo a utilização da energia contida na biomassa vegetal. Muitos microorganismos são capazes de excretar enzimas que quebram a lignocelulose, o principal componente das paredes celulares da planta, em açúcares fermentáveis. Os objetivos deste trabalho foram selecionar fungos filamentosos que produzem enzimas que degradam a biomassa e otimizar suas condições de cultivo. Quatro isolados e duas linhagens padrão foram testadas para a produção de celulases e identificadas pelo sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Após a caracterização inicial, três linhagens foram selecionadas e testadas em diferentes fontes de nitrogênio e carbono, e agentes tamponantes, visando o cultivo ótimo para cada delas. As condições ideais foram escolhidas com base em critérios de atividade enzimática, proteínas totais liberadas e pH. Após o estabelecimento das condições ótimas, os sobrenadantes das culturas foram liofilizados e o teor de proteínas determinado. O mesmo extrato foi testado quanto à FPA (*Filter Paper Activity*), atividades de β -glicosidase e xilanases, e quanto sua capacidade hidrolítica na biomassa pré-tratada. As linhagens selecionadas foram identificadas como *Phanerochaete chrysosporium* (F88), *Aspergillus brasiliensis* (F811) e a linhagem padrão *Trichoderma reesei* QM9414. A melhor combinação de fontes de nitrogênio foi a razão 4:3:3; 5:3:2 e 6:3:1 (sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura) para F88, F811 e *T. reesei*, respectivamente. O ácido cítrico foi selecionado como agente tamponante para F88 e *T. reesei*, e PIPES para F811. Bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BPT), como fonte de carbono, foi o melhor para induzir a produção de celulases e xilanases por F88 e F811, enquanto, Solka-Floc[®] foi a melhor para *T. reesei*. As atividades de β -glicosidase e xilanase foram maiores em F811 do que para *T. reesei*. No entanto, para FPA, *T. reesei* apresentou o melhor rendimento. Nos ensaios de hidrólise, as conversões de glicana e xilana foram semelhantes para ambas as linhagens, mesmo havendo acúmulo de celobiose no ensaio de *T. reesei*. Comparando os dados obtidos para ambas as linhagens, uma selvagem e outra que é considerada referência industrial, F811 se mostrou promissor para a produção de enzimas hidrolíticas e como consequência, a habilidade em transformar a biomassa em açúcares fermentáveis.

Palavras-chave: Biomassa; Celulases; Xilanases; Fontes de nitrogênio; Agentes tamponantes; Fontes de carbono; Hidrólise; *Trichoderma reesei*; *Aspergillus brasiliensis*

ABSTRACT

The selection of filamentous fungi that produce hydrolases and the preoptimization of their growth conditions

The increasing demand for energy and the necessity to promote sustainable development has focused on renewable fuels. Within the available biofuels, 2G or second generation, has the aim of releasing the energy contained in plant biomass. Many microorganisms are able to secrete enzymes capable of breaking down lignocellulose, the main component of plant cell walls, into fermentable sugars. The objectives of this project was to select filamentous fungi that produce enzymes that degrade biomass and optimize the growth conditions for them. Four isolates and two standard strains were tested for the production of cellulases and identified by ITS (Internal Transcribed Spacer) sequencing. After initial characterization, three strains were selected and tested in different sources of nitrogen and carbon, and buffering agents for optimal growth. The ideal conditions were chosen based on the criteria of enzymatic activity, total proteins released and pH. After the ideal condition for each strain were established, cell free extracts from each culture were lyophilized and the total protein content determined. This extract was tested for FPA (Filter Paper Activity), β -glucosidase and xylanase activity and the hydrolysis assays were carried out using pretreated biomass. The selected strains were identified as *Phanerochaete chrysosporium* (F88), *Aspergillus brasiliensis* (F811) and the standard strain *Trichoderma reesei* QM9414. The best combination of nitrogen sources was the ratio 4:3:3; 5:3:2 and 6:3:1 (ammonium sulfate, urea and yeast extract) for F88, F811 and *T. reesei*, respectively. Citric acid was selected as buffering agent for F88 and *T. reesei*, and PIPES for F811. Steam exploded bagasse, as a carbon source, was the best to induce the cellulase and xylanase production for F88 e F811, while, Solka-floc[®] was better for *T. reesei*. The activities of β -glucosidase and xylanase were higher for F811 than for *T. reesei*. However, for FPA, *T. reesei* showed the best yield. In the hydrolysis assays, conversions of glucan and xylan were similar for both strains, even though there was an accumulation of cellobiose in the *T. reesei*'s assay. Comparing the data obtained for both strains, a wild type and an industrial reference, F811 showed as a promising strain to produce hydrolytic enzymes and as consequence, break down biomass into fermentable sugars.

Keywords: Biomass; Cellulases; Xylanases; Nitrogen source; Buffers; Carbon source; Hydrolysis; *Trichoderma reesei*; *Aspergillus brasiliensis*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação simplificada da estrutura da lignocelulose composta por lignina, hemicelulose e celulose (indicada pelo círculo). Adaptado de Doherty; Mousavioun; Fellows (2011)27
- Figura 2 – Representação da estrutura da celobiohidrolase da família 7 de *Trichoderma reesei* (Cel7A) atuando em celulose. Em (a): domínio catalítico; (b) *linker* e (c) *Carbohydrate Binding Module* (CBM). Adaptado de Beckham et al. (2007).....32
- Figura 3 - Genealogia importantes mutantes de *T. reesei* derivados da linhagem QM6a através de mutagênese clássica. As mutações utilizadas foram irradiação por aceleração de partículas lineares (LA), luz UV (UV) ou nitrosonoguanidina (NTG). Adaptado de Seiboth; Ivanova; Seidl-Seiboth (2011)34
- Figura 4 – Ação sinérgica de enzimas hidrolíticas e não hidrolíticas para conversão da celulose. Adaptado de Silveira e colaboradores (2014b).....35
- Figura 5 – Imagens fotográficas das linhagens F88, F108, F171, F713 (*T. reesei* QM 9414), F724 (*A. brasiliensis* ATCC 10004) e F811 crescidas em BDA após sete dias de cultivo a 25°C.....52
- Figura 6 - Potencial de sacarificação de papel de filtro dos isolados cultivados em celulose microcristalina por 15 dias. Onde F88: *P. chrysosporium*; F108: *T. virens*; F171: *P. citrinum*; F811: *A. brasiliensis*; F713: *T. reesei* QM9414; F724: *A. niger* ATCC 10004.....53
- Figura 7 – Potencial de sacarificação dos isolados em xilana como substrato durante 15 dias de cultivo. Onde F88: *P. chrysosporium*; F108: *T. virens*; F171: *P. citrinum*; F811: *A. brasiliensis*; F713: *T. reesei* QM9414; F724: *A. niger* ATCC 10004.....54
- Figura 8 – Potenciais de sacarificação (A) e medidas de pH (B) para as diferentes linhagens cultivadas por dez dias em meios otimizados quanto as fontes de nitrogênio. Onde F88: *P. chrysosporium*, F811: *A. brasiliensis* e F713: *T. reesei*.....58
- Figura 9 - Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes condições tamponantes para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*).....59
- Figura 10 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes condições tamponantes para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*).....60
- Figura 11 - Potencial de sacarificação em Avicel[®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*) cultivado em diferentes condições tamponantes62

Figura 12 - Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes condições tamponantes para a linhagem F811 (<i>A. brasiliensis</i>)	63
Figura 13 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes condições tamponantes para a linhagem F811 (<i>A. brasiliensis</i>)	64
Figura 14 - Potencial de sacarificação em Avicel [®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem F811(<i>A. brasiliensis</i>) cultivado em diferentes soluções tamponantes..	65
Figura 15 - Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes agentes tamponantes para a linhagem <i>T. reesei</i> QM 9414.....	66
Figura 16 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes agentes tamponantes para a linhagem <i>T. reesei</i> QM 9414.....	67
Figura 17 - Potencial de sacarificação em Avicel [®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem <i>T. reesei</i> QM 9414 cultivado em diferentes soluções tamponantes	69
Figura 18 – Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem F88 (<i>P. chrysosporium</i>).....	71
Figura 19 - Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem F88 (<i>P. chrysosporium</i>).....	72
Figura 20 – Potencial de sacarificação em Avicel [®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem F88 (<i>P. chrysosporium</i>) cultivado em diferentes fontes de carbono	74
Figura 21 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem F811 (<i>A. brasiliensis</i>).....	77
Figura 22 – Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem F811 (<i>A. brasiliensis</i>)	77
Figura 23 - Potencial de sacarificação em Avicel [®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem F811 (<i>A. brasiliensis</i>) cultivado em diferentes fontes de carbono	79
Figura 24 – Gel SDS-PAGE do secretoma da linhagem F811 (<i>A. brasiliensis</i>) cultivado em diferentes fontes de carbono. Em I: Solka-Floc [®] ; II: BIN; III: BPT; IV: BPTD .	80
Figura 25 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem <i>T. reesei</i> QM 9414.....	81
Figura 26 - Medidas de pH ao longo do cultivo de <i>T. reesei</i> em diferentes fontes de carbono	82
Figura 27 - Potencial de sacarificação em Avicel [®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem <i>T. reesei</i> QM 9414 cultivado em diferentes fontes de carbono	83
Figura 28 - Gel SDS-PAGE do secretoma do padrão <i>T. reesei</i> cultivado em diferentes fontes de carbono. Em I: Solka-Floc [®] ; II: BIN; III: BPT; IV: BPTD.....	84

Figura 29 – Frascos contendo os sobrenadantes dos cultivos das linhagens liofilizados. Em A: F88 (<i>P. chrysosporium</i>); B: F811 (<i>A. brasiliensis</i>) e C: <i>T. reesei</i>	88
Figura 30 – Atividades enzimáticas específicas entre a relação de proteínas produzidas e as atividades de celulase total, celobiase e xilanase para as linhagens F811 (<i>A. brasiliensis</i>) e <i>T. reesei</i>	89
Figura 31 – Perfil de conversão de glicana (A) e xilana (B) em ensaio de hidrólise de bagaço pré-tratado por explosão a vapor utilizando os preparados enzimáticos de F811 (<i>A. brasiliensis</i>), <i>T. reesei</i> e Cellic CTec3	92
Figura 32 – Perfil de produção de celbiose (A) e ácido acético (B) ao longo do ensaio de hidrólise utilizando os preparados enzimáticos de F811 (<i>A. brasiliensis</i>), <i>T. reesei</i> e Cellic CTec3.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de pH ótimos para produção de celulases e xilanases por diversos fungos filamentosos cultivados em diferentes fontes indutoras. Adaptado de Reis e colaboradores (2013).....	40
Tabela 2 - Isolados cedidos pelo CTC e seus respectivas origem e data de isolamento	42
Tabela 3 - Composição em g/L do meio de cultivo basal	45
Tabela 4 – Composições dos seis ensaios com diferentes concentrações das fontes de nitrogênio (NH ₄) ₂ SO ₄ , ureia e extrato de levedura.....	46
Tabela 5 – Soluções utilizadas como agentes tamponantes, suas concentrações, pH e capacidade de tamponamento dos meios de cultivo	46
Tabela 6 – Composição das biomassas utilizadas. BIN: bagaço de cana-de-açúcar in natura; BPT: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão à vapor; BPTD: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão à vapor e deslignificado	48
Tabela 7 - Identificação molecular dos isolados de acordo com a comparação com sequências depositadas no GeneBank (NCBI)	52
Tabela 8 – Potenciais de sacarificação (IU/ml) e medidas de pH para os isolados F88 (<i>P. chrysosporium</i>), F811 (<i>A. brasiliensis</i>) e <i>T. reesei</i> em ensaios com diferentes concentrações de sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura	55
Tabela 9 – Concentrações otimizadas de sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura para as linhagens F88 (<i>P. chrysosporium</i>), F811 (<i>A. brasiliensis</i>) e <i>T. reesei</i>	57
Tabela 10 – Condições de cultivo otimizadas quanto as fontes de nitrogênio, soluções tamponantes e fontes de carbono para as linhagens F88 (<i>P. chrysosporium</i>), F811 (<i>A. brasiliensis</i>) e <i>T. reesei</i> QM 9414	86
Tabela 11 – Caracterização dos materiais liofilizados das linhagens F811 (<i>A. brasiliensis</i>) e <i>T. reesei</i> em solução 7g/L.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
BCA	Ácido bicinconínico
BDA	Batata dextrose agar
BIN	Bagaço de cana-de-açúcar in natura
BPT	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor
BPTD	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes Database</i>
CBH	Celobiohidrolases
CBM	<i>Carbohydrate Binding Module</i>
CMC	Carboximetilcelulose
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DNS	Ácido-3,5-dinitrosalicílico
EC	<i>Enzyme Comission</i>
EG	Endoglicanases
FES	Fermentação em estado sólido
FmS	Fermentação submersa
FPA	<i>Filter Paper Activity</i>
FPU	<i>Filter Paper Unit</i>
GH	Hidrolase de Glicosídeos
GOD	Glicose oxidase
I.U.P.A.C.	Internation Union of Pure and Applied Chermistry
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
IU	Unidade internacional
LPMO	<i>Lytic Polysacharide Monooxygenase</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIPES	Ácido piperazina bis-etanosulfônico
RPM	Rotação por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
βG	β-glicosidase

1 INTRODUÇÃO

As civilizações humanas, desde seu princípio, têm usado a biomassa como fonte de energia na preparação de alimentos, aquecimento, iluminação e processamento de metais. No entanto, apenas 10% da energia primária consumida atualmente no mundo é proveniente da biomassa. Os outros 90% estão distribuídos entre combustíveis fósseis (80%), hidroeletricidade (2%), energia nuclear (6%) e energia solares renováveis (2%) (GOLDEMBERG, 2011).

A troca da biomassa por outras fontes de energia tem como explicação um fato histórico de extrema importância que ocorreu nos séculos XVIII e XIX, a Revolução Industrial. A demanda energética que se iniciou nessa época foi a força motriz tanto para o desenvolvimento da sociedade atual, como para o crescente uso de combustíveis fósseis. No entanto esses são recursos não renováveis, cujas fontes são esgotáveis e concentradas em áreas de grande instabilidade geopolítica. Além disso, existe grande preocupação com a questão ambiental já que a queima dos combustíveis fósseis não renováveis emite gases causadores do efeito estufa e prejudiciais à vida humana (GOLDEMBERG, 2007). Durante a última Conferência Mundial sobre o Clima ou COP-21, houve um consenso sobre a necessidade de uma economia de baixo carbono e contrária à exploração de combustíveis fósseis (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS – ONU, 2015). Assim, o investimento em tecnologias e pesquisas em matrizes energéticas renováveis vêm se intensificando. Dentre as alternativas, o etanol obtido a partir de plantas, como cana-de-açúcar, milho e beterraba, é considerado uma importante fonte de energia renovável.

No Brasil, a produção de etanol é proveniente da cana-de-açúcar e seu uso como combustível foi impulsionado pelo Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975. Esse programa investiu nos setores público e privado incentivando pesquisas científicas e tecnológicas no aprimoramento da produção e uso do etanol como combustível (BON; GÍRIO; PEREIRA, 2008). Atualmente o país produz em torno de 28 mil m³ de etanol por safra, sendo o estado de São Paulo o maior contribuinte dessa quantia, com aproximadamente metade de toda a produção brasileira (UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA, 2015). Todavia, o crescimento populacional e desenvolvimento econômico geram pressões significativas na demanda de energia. No Brasil, o aumento na produção de etanol combustível convencional (ou de primeira geração) resultaria no maior uso de terras agriculturáveis, de recursos finitos (água, fertilizantes, equipamentos, por exemplo) e na competição natural com a produção de alimentos.

Neste contexto, o uso de resíduos da indústria sucroalcooleira, tais como bagaço e palha da cana-de-açúcar, na produção de etanol é uma alternativa tecnicamente viável e ecologicamente sustentável para a produção do combustível. No entanto, para se produzir o etanol celulósico, ou etanol de segunda geração, a partir da biomassa é preciso transpor a heterogeneidade e a recalcitrância da parede celular das plantas de uma maneira economicamente viável e que permita substituir efetivamente os recursos derivados dos combustíveis fósseis (PAYNE et al., 2015).

Na natureza, muitos organismos possuem a maquinaria necessária para degradar a parede celular das plantas, liberando moléculas necessárias a seu metabolismo. Dentre os organismos, a comunidade microbiana exerce papel fundamental na degradação de compostos lignocelulósicos, com destaque para os fungos filamentosos, que são capazes de produzir e excretar enzimas que atuam de forma sinérgica na degradação de polissacarídeos. O grupo dos fungos é extremamente diverso e os recentes esforços de análise genômica mostram que muito do potencial enzimático desses organismos ainda não foi revelado (SEIBOTH; IVANOVA; SEIDL-SEIBOTH, 2011).

Assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar fungos filamentosos produtores de enzimas que atuam na degradação da biomassa lignocelulósica e maximizar a produção dessas enzimas através de melhoramento do meio de cultivo desses organismos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Bioetanol

As plantas armazenam carbono e energia solar capturados durante a fotossíntese em seus tecidos e células, sendo uma fonte renovável de energia, fibras e matérias-primas orgânicas (BUANAFINA; COSGROVE, 2013). Sendo assim, a produção de biocombustíveis a partir de plantas é uma alternativa para o suprimento da demanda crescente de energia e diminuição da dependência mundial dos combustíveis fósseis. O etanol proveniente da fermentação dos açúcares contidos nas plantas, também conhecido como biotenaol, é um importante produto a ser utilizado como fonte energética (RASS-HANSEN et al., 2007).

Produzir etanol combustível através de uma tecnologia viável é realidade em alguns países e vem sendo implementada em muitos outros (RASS-HANSEN et al., 2007). Estados Unidos e Brasil lideram a produção mundial com 84%, sendo seguidos por Europa, China e Canadá. Recentemente países como Tailândia, Colômbia e Austrália também passaram a contribuir significativamente para o montante de etanol produzido no mundo (JP MORGAN, 2015).

No Brasil, o Proálcool criado na década de 70 foi o grande propulsor do etanol combustível. Essa política governamental incentivou a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e também de veículos movidos a esse biocombustível (BON; FERRARA, 2010). Nos últimos anos, o aumento do número desses veículos, também conhecidos como *flex-fuel*, assim como as determinações governamentais de acréscimo de etanol na gasolina, consolidaram o Brasil como um grande produtor de etanol. Atualmente, o país é o segundo no *ranking* mundial, contribuindo com 27% de toda produção (JP MORGAN, 2015).

Milho, beterraba e cana-de-açúcar são algumas das matérias-primas utilizadas para produzir etanol, sendo o clima o fator determinante para o uso das diferentes culturas. Os Estados Unidos utilizam o milho como fonte, o Brasil a cana-de-açúcar e a beterraba é adotada como fonte energética em países da Europa. A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma gramínea tropical que acumula sacarose nos tecidos de seu colmo. Já o milho (*Zea mays*), possui uma alta concentração de amido, aproximadamente 60% da massa de seus grãos (SOMERVILLE, 2007). O balanço de energia líquida (energia contida em um dado volume de etanol dividida pela energia fóssil necessária para sua produção) é muito mais favorável para a cana-de-açúcar (8 a 10) do que para o milho (1 a 2) (GOLDEMBERG, 2008).

O processo de obtenção do bioetanol para essas duas culturas é realizado de maneiras diferentes e ambos são conhecidos como de primeira geração, convencional ou 1G. No caso da cana-de-açúcar, o etanol sacarínico é obtido após a prensagem dos colmos e fermentação diretamente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Como no milho os açúcares fermentáveis estão armazenados na forma de amido, o etanol amiláceo é obtido após um processo inicial de hidrólise e posterior fermentação dos monossacarídeos (SOMERVILLE, 2007).

Apesar do etanol, tanto de cana-de-açúcar como de milho, ser produzido a um preço competitivo, sua produção não será suficiente frente à crescente demanda de combustíveis líquidos. Além disso, combustíveis 1G utilizam matérias-primas que são fonte de alimentação de humanos e animais, tendo sua disponibilidade para uso combustível reduzida. Esses fatores impulsionam a exploração de resíduos agroflorestais como fontes para a produção de combustíveis (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). O resíduo do processo de obtenção de etanol a partir da cana-de-açúcar (bagaço, por exemplo) é normalmente queimado nas usinas para suprir a demanda de energia da mesma. Há também a palha residual que normalmente é deixada no campo ou queimada nas caldeiras para geração de vapor e energia elétrica (CANILHA et al., 2012).

A tecnologia chamada de etanol de segunda geração, ou 2G, consiste basicamente em utilizar os açúcares contidos no material lignocelulósico para produção de etanol. Isso é possível, pois aproximadamente 60% desse material é formado por polissacarídeos que podem ser hidrolisados em produtos monoméricos e posteriormente fermentados (GALBE; ZACCHI, 2002). Dessa maneira, produzir etanol a partir do bagaço e da palha é uma das alternativas mais sustentáveis para suprir a necessidade crescente de energia e substituir o uso de combustíveis fósseis (CANILHA et al., 2012).

Entretanto, utilizar os açúcares contidos na biomassa das plantas é uma tarefa desafiadora, pois esses estão presentes em uma porção de carboidratos interligados à complexa estrutura fenólica (CHUNDAWAT et al., 2011). Essa recalcitrância, considerada um problema para o uso industrial da biomassa, é o que permitiu a evolução das plantas, protegendo-as das intempéries ambientais e principalmente dos ataques de patógenos (HIMMEL et al., 2007).

2.1.2 Material lignocelulósico

A lignocelulose é constituída basicamente por três frações principais: celulose,

hemicelulose e lignina. Celulose é o constituinte principal do material lignocelulósico, correspondendo de 20 a 50% do material em massa seca e é o biopolímero mais abundante na Terra (SOMERVILLE, 2006). A segunda fração mais expressiva é a da hemicelulose, entre 15 a 35% seguido por 10 a 30% de lignina (PAULY; KEEGSTRA, 2008). Ainda estão presentes no material proteínas, lipídios, açúcares solúveis e minerais. A composição química da biomassa depende significativamente do tipo e origem da espécie vegetal (CHUNDAWAT et al., 2011). Na Figura 1 é possível visualizar uma representação simplificada da estrutura lignocelulósica.

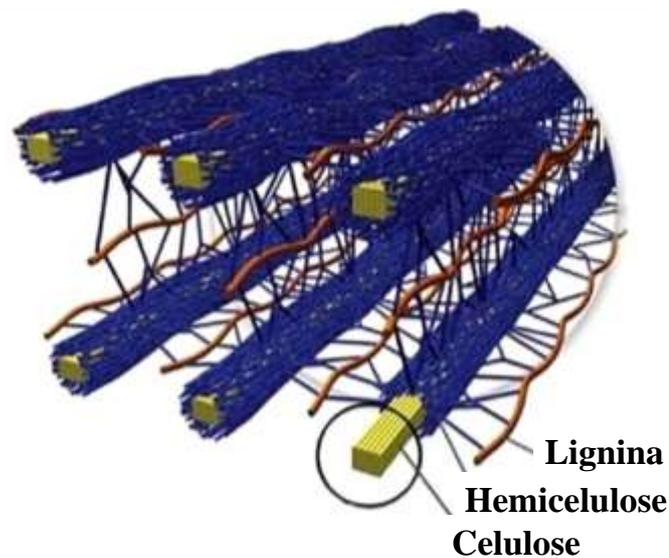


Figura 1 – Representação simplificada da estrutura da lignocelulose composta por lignina, hemicelulose e celulose (indicada pelo círculo). Adaptado de Doherty; Mousavioun; Fellows (2011)

Celulose é uma macromolécula linear de homopolissacarídeo complexa formada por cadeias lineares de β -1,4-glicose através de ligações glicosídicas invertidas em 180° . Os resíduos da celulose dessa cadeia forçam os grupos hidroxílicos em orientação radial e os átomos alifáticos de hidrogênio em posições axiais. Isso resulta em uma forte interação de hidrogênio entre as cadeias de celulose adjacentes (HIMMEL et al., 2007). Essas interações formam dois tipos de regiões, uma cristalina e outra amorfa. Na fração cristalina as ligações de hidrogênio são bem organizadas e regularmente interrompidas por regiões com menor nível de organização onde as cadeias são randomicamente orientadas, chamada de amorfa. Essas fitas de polissacarídeos estão embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina (SILVEIRA et al., 2014b).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo e sua composição varia de acordo com a espécie e tecido da planta. Esses polímeros são formados por uma estrutura principal

composta por pentoses (xilose) ou hexoses (glicose e manose) (SCHELLER; ULVSKOV, 2010) e ramificações. As ornamentações das cadeias principais podem ser constituídas por uma variedade de açúcares de cinco ou seis carbonos como xilose, ramanose e arabinose, glicose, manose e galactose e também por ácidos urônicos. As hemiceluloses são estruturalmente mais relacionadas com a celulose do que com a lignina e sua estrutura, com ornamentações e cadeias laterais dobradas em relação à cadeia principal por meio de ligações de hidrogênio, permitindo uma associação estável com a celulose (RAMOS, 2003).

Lignina é uma macromolécula fenólica constituída de unidades de fenilpropanóides ligadas em uma estrutura tridimensional (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Sua estrutura é muito complexa e baseada em três precursores monoméricos: álcool coniferil, álcool sinafil e álcool p-cumaril (RAMOS, 2003). A lignina forma uma estrutura rígida que protege a celulose e a hemicelulose.

Dessa maneira, a integração entre hemicelulose, celulose e lignina produz uma barreira que previne a penetração de químicos e enzimas no interior da estrutura lignocelulósica (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009). Para sobrepor a recalcitrância do material lignocelulósico e tornar os açúcares contidos nos carboidratos acessíveis é necessário realizar uma fase de pré-tratamento do material e posteriormente, hidrólise das cadeias poliméricas.

2.1.2.1 Pré-tratamento do material lignocelulósico

O pré-tratamento da biomassa é responsável por expor as fibras dos polissacarídeos tornando-os mais acessíveis à hidrólise. Isso é possível, pois ocorre o rompimento da estrutura recalcitrante formada pela hemicelulose e lignina. Um pré-tratamento é considerado eficiente quando disponibiliza quantidades significativas de polissacarídeos ou açúcares sem degradá-los e minimiza a formação de inibidores que podem prejudicar os processos subsequentes de hidrólise e fermentação (XU; HUANG, 2014). Além disso, o pré-tratamento também deve apresentar custos de capital e operacionais que possam viabilizar economicamente o processo (CANILHA et al., 2012).

Uma forma de classificar os diversos pré-tratamentos é através de sua ação, que pode ser física, físico-química, química ou biológica. Os pré-tratamentos físicos são utilizados para aumentar a área superficial e a porosidade do material lignocelulósico, diminuindo a cristalinidade e os graus de polimerização da celulose. Processos de corte, fricção e moagem são utilizados para a redução do tamanho de partícula do material e tornar a biomassa mais susceptível ao ataque hidrolítico (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Irradiação por raios

gama, feixe de elétrons e micro-ondas também podem ser utilizados para tratar o material lignocelulósico. Essas técnicas são, geralmente, combinadas a outras formas de pré-tratamento, já que não possuem a capacidade de remover hemicelulose (SUN et al., 2016).

Pré-tratamentos químicos têm se tornado mais promissores no aumento da biodegradabilidade da celulose, removendo lignina e/ou hemicelulose e diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade da celulose (BEHERA et al., 2014). Há diversos tratamentos químicos que utilizam ácidos, bases, solventes orgânicos, líquidos iônicos e ozônio (ALVIRA; BALLESTEROS; NEGRO, 2010). O pré-tratamento com solução alcalina é o método químico mais utilizado para remover lignina e hemicelulose da biomassa (SUN et al., 2016). Na hemicelulose, o álcali atua removendo grupos acetil e através da substituição de vários ácidos urônicos, aumentando a acessibilidade do material. Também ocorrem reações de saponificação, causando dilatação das fibras, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, aumento da área superficial e quebra das ligações entre a lignina e os carboidratos (BEHERA et al., 2014). Vários agentes alcalinos, como NaOH, Ca(OH)₂, KOH, Na₂CO₃ e amônia aquosa, podem ser utilizados nesse processo de pré-tratamento.

Explosão a vapor ou hidrotérmica, *AFEX (Ammonia Fiber Explosion)*, explosão com CO₂ e água quente são processos que unem tratamentos físicos e químicos (CANILHA et al., 2012). Dentre os processos físico-químicos, o de explosão a vapor é o mais comumente utilizado para pré-tratar a biomassa lignocelulósica (SUN et al., 2016). Nesse método a lignocelulose é submetida a alta pressão (0,7 a 4,8 MPa) e temperatura, (160 e 240°C) durante alguns segundos ou minutos (CANILHA et al., 2012). Após o período sob alta pressão e temperatura, ocorre uma brusca descompressão do material até a pressão atmosférica (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A rápida descompressão (ou explosão) modifica a estrutura da parede celular da biomassa dando origem a um material onde há hemicelulose parcialmente hidrolisada e uma fração insolúvel composta por celulose, hemicelulose residual e lignina quimicamente modificada (RAMOS, 2003). A hemicelulose contida nessa fração pode ser recuperada através da separação sólido-líquido (filtro prensa, por exemplo). Já a fração insolúvel da lignina pode ser extraída através de tratamento com agentes alcalinos (RAMOS, 2003).

O pré-tratamento biológico pode ser realizado por alguns microrganismos que sintetizam enzimas capazes de modificar a estrutura da lignina e hemicelulose. Fungos como, por exemplo, *Phanerochaete crysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoletus*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus* vem sendo utilizados no pré-tratamento de diversos tipos de biomassa (SUN et al., 2016). Esse pré-

tratamento não utiliza agentes químicos que podem atuar como inibidores o durante o processo e requer baixa quantidade de energia para ocorrer, pois se trata de um processo biológico. Entretanto, suas principais desvantagens são a baixa eficiência e seletividade já que muitos fungos possuem mecanismo de ação também sobre a hemicelulose e celulose (CANILHA et al., 2012).

2.1.2.2 Hidrólise do material lignocelulósico

Após a etapa de pré-tratamento, os polissacarídeos podem ser hidrolisados em açúcares simples e posteriormente utilizados por leveduras na etapa de fermentação. A quebra das cadeias dos polímeros em produtos monoméricos pode ser realizada através de dois tipos de processo, um químico e outro enzimático. A reação de quebra dos polissacarídeo catalisada por enzimas é considerada mais vantajosa devido à baixa perda de substrato, condições moderadas de operação, além de utilizar reagentes biodegradáveis que não causam a poluição do ambiente (BON; FERRARA, 2010). Assim, a hidrólise enzimática da celulose tem recebido mais atenção da comunidade científica internacional e também da indústria (SILVEIRA et al., 2014b).

A quebra das cadeias dos polissacarídeos por reações enzimáticas é realizada por enzimas genericamente chamadas de celulasas e hemicelulasas. Ambas fazem parte de um grupo de enzimas ativas em carboidratos, cujos principais membros correspondem às hidrolases de glicosídeos (GHs), um grande grupo de proteínas capazes de romper ligações glicosídicas (HIMMEL et al., 2010). As hidrolases de glicosídeos são os principais agentes na degradação de polissacarídeos na natureza e compreendem uma vasta gama de enzimas. O banco de dados CAZy (do inglês, *Carbohydrate-Active Enzymes Database*) é uma lista manualmente curada de enzimas ativas em carboidratos e possui atualmente 135 famílias de GHs (PAYNE et al., 2015). Cada uma dessas famílias é composta por proteínas correlacionadas por homologia de sequência e conformação tridimensional. Isso permite que previsões sejam feitas sobre a ação catalítica e o mecanismo molecular dessas enzimas, já que esses são geralmente conservados dentro das famílias. Outra maneira de representar as hidrolases é através de seu número EC (do inglês, *Enzyme Commission*). Essa nomenclatura é baseada nas reações que as enzimas catalisam e no caso das GH, o código utilizado é EC 3.2.1.- (LOMBARD et al., 2014).

A desconstrução enzimática da celulose é realizada majoritariamente pela atuação sinérgica de enzimas do grupo das hidrolases, o complexo celulolítico, formado por:

endoglicanases, exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases. As endoglicanases (EC 3.2.1.4) atuam principalmente nas regiões amorfas da celulose, quebrando as ligações glicosídicas através da inserção de uma molécula de água na ligação β -(1,4), criando um terminal redutor e outro não-redutor (HIMMEL et al., 2007). Com a criação dos terminais redutores e não-redutores, as exoglicanases (EC 3.2.1.91) atuam na celulose através do seu sítio catalítico em forma de túnel, que desliza sobre o substrato liberando, em sua maioria, celobiose. Finalmente, esse dissacarídeo e outros oligômeros de baixo peso molecular são convertidos em glicose pela ação das β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (SILVEIRA et al., 2014b).

Para transformar eficientemente hemicelulose em monossacarídeos, uma mistura de diferentes enzimas é requerida, incluindo endoxilanases (EC 3.2.1.8), endomananases (EC 3.2.1.78), β -xilosidases (EC 3.2.1.37), α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetil esterases (EC 3.1.1.72), ferruloil esterases (EC 3.1.1.73), entre outras (DODD; CANN, 2010). Entretanto, para a hidrólise da xilana, componente majoritário da fração hemicelulósica das plantas, excepcionalmente das gramíneas, as enzimas mais importantes são as endoxilanases e β -xilosidases (POLIZELI et al., 2005). Geralmente, as endoxilanases atuam em xilana liberando basicamente xilobiose, xilotriose e outros xilooligômeros (SILVEIRA et al., 2014b).

Muitas enzimas que atuam em polissacarídeos, como celulasas e hemicelulasas, são multimodulares, ou seja, possuem domínio catalítico (CD) acompanhado por um domínio de ligação conhecido como CBM (do inglês, *Carbohydrate Binding Module*). Esses dois domínios são conectados entre si através de uma estrutura de peptídeos de tamanhos variados, o *linker* (PAYNE et al., 2015). Os CBMs promovem a associação da enzima ao substrato, auxiliando a hidrólise das cadeias dos polissacarídeos (BORASTON et al., 2004). Além de ligar o CD ao CBM, estudos recentes revelam que o *linker* tem papel fundamental na atividade de celulasas processivas (RUIZ; TUROWSKI; MURAKAMI, 2016). A Figura 2 mostra uma CBH agindo em celulose e suas estruturas: CD, linker e CMB.

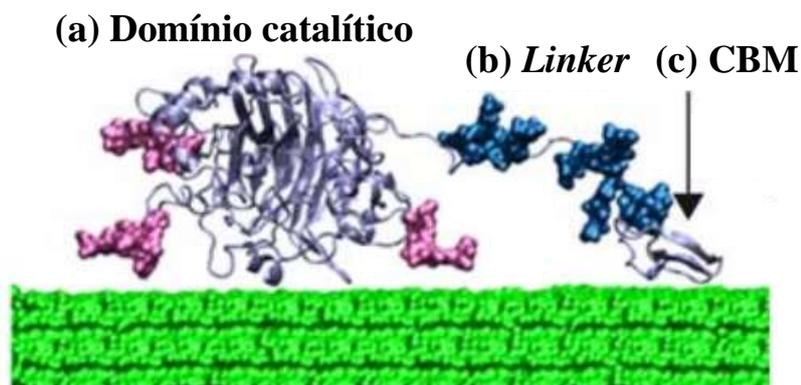


Figura 2 – Representação da estrutura da celobiohidrolase da família 7 de *Trichoderma reesei* (Cel7A) atuando em celulose. Em (a): domínio catalítico; (b) *linker* e (c) *Carbohydrate Binding Module* (CBM). Adaptado de Beckham et al., 2007.

Além das celulases clássicas, há proteínas que não possuem atividade hidrolítica, mas participam no processo de degradação da celulose, como suoleninas e as LPMOs (do inglês *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*). As suoleninas possuem similaridade com expansinas (proteínas encontradas nas paredes celulares das plantas) e têm como função modificar a celulose através de seu rompimento sem produzir açúcares redutores. Acredita-se que a ação das suoleninas é importante no processo de degradação da celulose, pois está envolvida na amorfogênese, o que deixa o substrato mais acessível para as celulases (SALOHEIMO et al., 2002; SEIBOTH; IVANOVA; SEIDL-SEIBOTH, 2011). Por outro lado, as LPMOs promovem a clivagem oxidativa das ligações glicosídicas na superfície cristalina ou amorfa da celulose, criando um terminal oxidado e outro livre para a ação das celulases (HARRIS et al., 2014). Dentre as LPMOs, as pertencentes à família proteínas com atividades auxiliares AA9 é a mais estudada. Harris et al. (2010) incorporaram o gene que codifica uma enzima da família AA9 em uma linhagem industrial de *Trichoderma reesei* e essa passou a produzir um preparado enzimático duas vezes mais eficiente em degradar a biomassa lignocelulósica.

2.1.3.1 Microrganismos produtores de enzimas que atuam no material lignocelulósico

Muitos organismos distribuídos em diversos grupos evoluíram sua maquinaria enzimática para converter celulose em fonte de energia. Dada a complexidade da parede celular das plantas, os organismos degradadores da biomassa apresentam um complexo enzimático sinérgico capaz de quebrar diversas ligações entre os polissacarídeos e, em alguns casos, lignina (PAYNE et al., 2015). Essa degradação pode ocorrer segundo dois paradigmas, um conhecido como celulosossomos e outro através da ação sinérgica de enzimas livres.

Os celulosossomos são complexos enzimáticos constituídos por diversas enzimas capazes de degradar a parede celular das plantas. Esses complexos foram primeiramente descritos na bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum* (DOI; KOSUGI, 2004). O paradigma de ação de enzimas livres representa o sistema onde há uma unidade catalítica ligada covalentemente ao CBM através do *linker*, como no sistema encontrado no fungo filamentosso *Trichoderma reesei* (PAYNE et al., 2015).

O complexo enzimático produzido por fungos filamentosos vem sendo amplamente estudados já que esses organismos têm papel essencial no ciclo do carbono nos ecossistemas e são importantes na degradação da parede celular das plantas, como saprófitas ou parasitas. Muitos desses organismos são equipados com um arsenal de enzimas que os permite utilizar os açúcares contidos na biomassa como fonte de energia ou para adentrar o tecido das plantas, no caso dos patógenos. Além disso, os fungos são extremamente diversos e capazes de colonizar diferentes nichos, crescendo em vários substratos enquanto secretam uma variedade de enzimas (GUERRIERO et al., 2015).

Os fungos produtores de enzimas capazes de quebrar as ligações presentes na biomassa lignocelulósica são divididos em três grupos de acordo com o tipo que degradação que promovem, podendo ser branca, marrom ou branda. Os de degradação branca são capazes de produzir celulasas e também enzimas que oxidam componentes da lignina, como ligninases, manganês peroxidases, peroxidases, lacases ou uma combinação dessas (CRAGG et al., 2015). Os fungos de degradação marrom são conhecidos por utilizar inicialmente e química de Fenton para gerar radicais hidroxilas, que atacam a parede celular das plantas através de poderosas reações oxidativas (PAYNE et al., 2015). Os ascomicetos são os representantes mais importantes do grupo conhecido como de degradação branda. São capazes de produzir um conjunto completo de enzimas celulolíticas, entretanto sua habilidade em degradar lignina é comprometida com apenas algumas peroxidases e oxidases extracelulares inespecíficas (CRAGG et al., 2015).

Essa capacidade dos fungos em produzir e secretar diversas enzimas que atuam na degradação da biomassa os tornaram foco em pesquisa e desenvolvimento na produção de biocombustíveis. A busca por organismos capazes de produzir preparados enzimáticos teve início em 1942, durante a Segunda Guerra Mundial, quando o fungo *Trichoderma viridae* QM6a foi isolado de tendas e uniformes de soldados americanos. A linhagem QM6a, que em 1976 foi renomeada como *T. reesei* em homenagem ao seu descobridor Elwyn T. Reese, é ancestral de diversas linhagens industriais utilizadas atualmente (SEIBOTH; IVANOVA; SEIDL-SEIBOTH, 2011). Essas linhagens foram obtidas através de mutagênese clássica

baseada em séries de exposições a radiação e diferentes agentes químicos (ATANASOVA, 2014). Uma das linhagens obtidas nesse processo, a QM9414, é um antigo mutante que ainda hoje é utilizado em pesquisas e como parental em programas de melhoramento. A Figura 3 mostra a genealogia das linhagens de *T. reesei* obtidas através dos processos de radiação, tratamento químicos ou ambos.

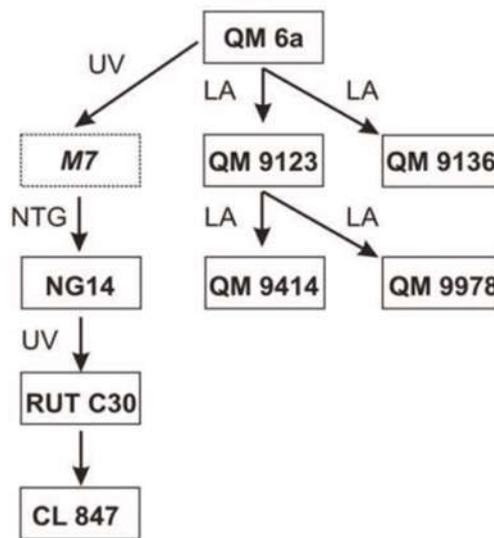


Figura 3 - Genealogia importantes mutantes de *T. reesei* derivados da linhagem QM6a através de mutagênese clássica. As mutações utilizadas foram irradiação por aceleração de partículas lineares (LA), luz UV (UV) ou nitrosonoguanidina (NTG). Adaptado de Seiboth; Ivanova; Seidl-Seiboth (2011)

Para degradar os materiais celulósicos, *T. reesei* é capaz de produzir pelo menos duas classes de celobiohidrolases (CBHI e CBHII), oito enduglicanases (EGI a EGIV, EG45, CEL74A, CEL61B e CEL5B) e sete β -glicosidases (BGLI, BGLII, CEL3B, CEL3C, CELIB, CEL3D, CEL3E) que atuam em sinergia para degradar a celulose em produtos monoméricos (KUBICEK et al., 2009). Entretanto, apenas quatro celulases são usualmente excretadas em quantidades notáveis pelo fungo: CBHI (Cel7A), CBH II (Cel6A), EG I (Cel7B) e EGII (Cel5A). Isso representa de 90-95% de todo o total de proteína excretada, sendo desse total 50-60% de CBHI e 20% de CBHII (GUSAKOV, 2011). Entretanto, o complexo enzimático produzido por *T. reesei* é deficiente em atividade de β -glicosidase, causando o acúmulo de celobiose durante a conversão da biomassa. Assim, muitos preparados produzidos por *T. reesei* vêm sendo suplementados com β -glicosidase proveniente de outros organismos, como por exemplo de *Aspergillus niger* (SØRENSEN et al., 2013). Na Figura 4 é possível visualizar uma representação do complexo enzimático de *T. reesei*, onde há a ação sinérgica de enzimas hidrolíticas, não hidrolíticas e também de proteínas acessórias.

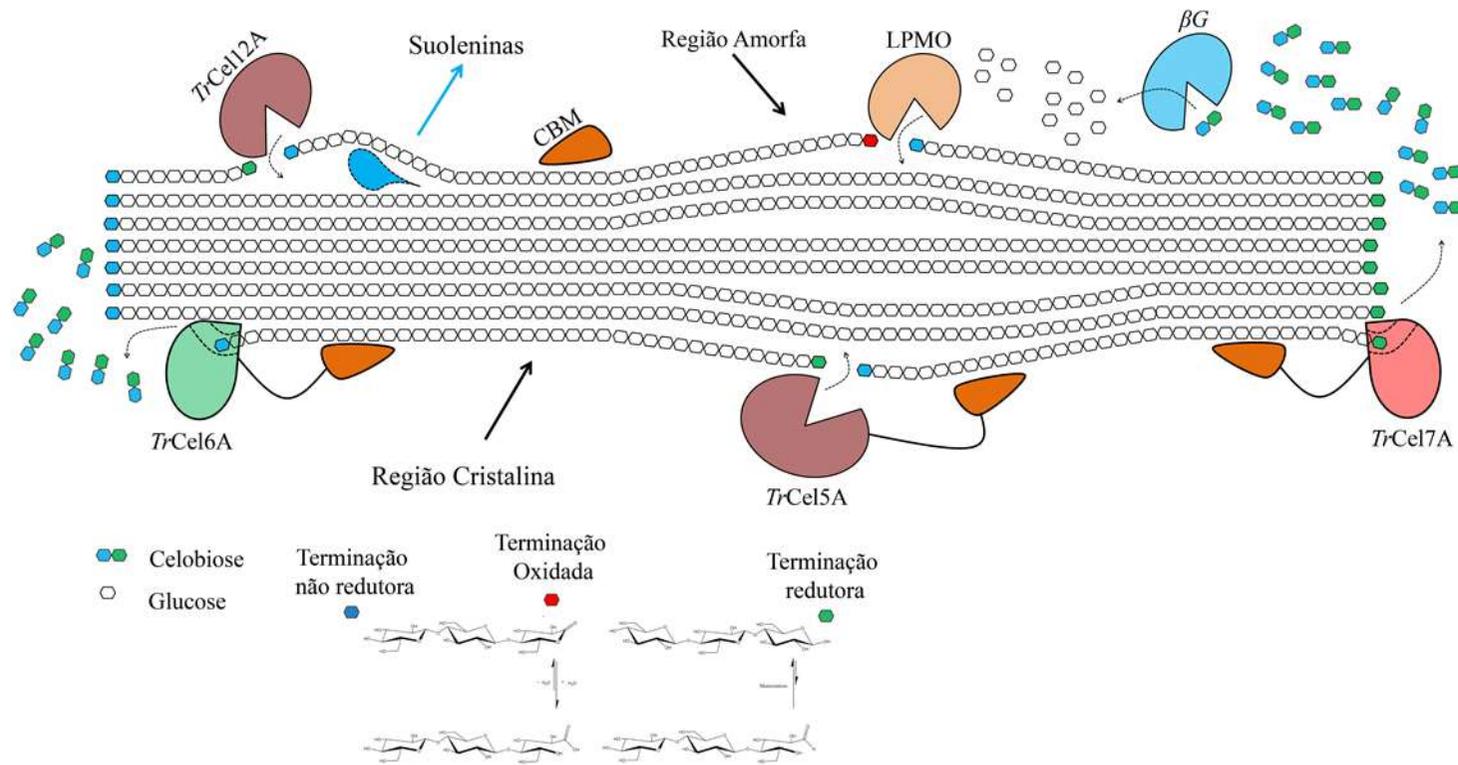


Figura 4 – Ação sinérgica de enzimas hidrolíticas e não hidrolíticas para conversão da celulose. Adaptado de Silveira e colaboradores (2014b)

Além de *T. reesei*, outras espécies de fungos filamentosos vêm sendo descritas como promissoras na degradação do complexo lignocelulósico, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Ustilago maydis*, entre outros (GUSAKOV, 2011; HIMMEL et al., 2010; YANG et al., 2011). Segundo estudos moleculares, mais de 60 famílias de GHs podem ser encontradas no genoma desses organismos (YANG et al., 2011).

As espécies do gênero *Aspergillus* são importantes produtoras de enzimas utilizadas industrialmente, sendo as produtoras de xilanases as mais estudadas (POLIZELI et al., 2005). Com o avanço das novas técnicas de sequenciamento, dados sobre o genoma desses organismos mostraram que as linhagens desse grupo possuem uma grande variedade de genes codificadores para produção de celulases, hemicelulases e esterases (DE SOUZA et al., 2011). Organismos desse gênero têm em média, 36 genes codificadores para celulases e inúmeros para enzimas que atuam na quebra da hemicelulose, sendo as pertencentes a GH10 e GH11 as mais estudadas (YANG et al., 2011).

Basidiomicetos são conhecidos por produzir diversas enzimas que atuam na degradação do complexo lignocelulósico. A capacidade de produzir enzimas oxidativas, como lacases e peroxidases, os tornam importantes atores na degradação da lignina. Sua produção é associada com condições do metabolismo secundário em resposta a escassez de nutrientes. Lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) foram descobertas na década de 1980 no fungo *Phanerochaete chrysosporium* (BUGG et al., 2011). Desde então essa espécie passou a ser considerada uma linhagem modelo nos estudos dos sistemas de produção de enzimas atuantes na degradação da lignina (SINGH; CHEN, 2008). Entretanto análises genômicas revelam que as linhagens possuem poucos genes codificadores para GHs (YANG et al., 2011).

Assim, apesar de *T. reesei* ser uma espécie eficiente na produção de enzimas que atuam na liberação de açúcares presentes na biomassa, a busca por novos organismos produtores ainda é uma importante tarefa realizada em diversos centros de pesquisa (PAYNE et al., 2015). Avanços em técnicas de biologia molecular permitem que genes de outros organismos sejam inseridos em uma linhagem já produtora ou o uso de proteínas heterólogas provenientes de outros sistemas de expressão (GUSAKOV, 2011). O alto custo dos preparados enzimáticos, comercializados por um número restrito de empresas, também é um ponto favorável a busca de organismos promissores que atuam na degradação da biomassa e otimização da produção daqueles já descritos (SØRENSEN et al., 2013).

2.1.3.2 Fatores que influenciam a produção enzimática

Há duas maneiras de produzir preparados enzimáticos capazes de hidrolisar a biomassa: fermentação em estado sólido (FES) ou submersa (FmS). A FES é definida como quase na ausência de água livre, mas como umidade suficiente para o crescimento do microrganismo (PANDEY, 2003). Essa técnica proporciona altos índices de obtenção de enzimas, entretanto a purificação das mesmas torna o processo, na maioria das vezes inviável economicamente. Já a FmS é a mais utilizada atualmente na indústria de produção de enzimas.

Neste caso os parâmetros podem ser bem controlados e a recuperação das enzimas é realizada de maneira mais eficiente do que em FES. Fatores como pH, temperatura, aeração e disponibilidade de nutrientes podem ser facilmente controlados quando o crescimento fúngico é realizado em reatores (HANSEN et al., 2015). Esse é um fato de extrema importância já que muitos fatores influenciam a produção de enzimas em fungos filamentosos. Outro ponto importante é que comparações são um desafio devido a diferenças de crescimento, requerimentos nutricionais e também à metodologia de avaliação enzimática adotada.

Ao longo dos anos, desde a descoberta do *T. reesei*, diversos estudos vêm sendo realizados sobre a produção de enzimas celulasas por essa e outras espécies de fungos. Para Mandels e Weber (1969) muitos fungos são celulolíticos e a maioria desses produzem celulasas quando crescidos em celulose. Entretanto, apenas alguns produzem essas enzimas em níveis capazes de degradar eficientemente o substrato. Ainda para esses autores, a produção de celulasas em fungos é adaptativa. O fungo pode crescer em diversas fontes de carbono, no entanto a produção de celulasas só ocorre quando é utilizado celulose, glicanas e alguns poucos oligossacarídeos.

Variedades de celulose purificadas são utilizadas como fontes indutoras podendo representar substratos cristalinos e amorfos. A celulose microcristalina pode ser obtida a partir de plantas (papel Whatman n°1, Avicel®, Sigmacell e Solka-Floc®) ou microrganismos (BMCC, do inglês *Bacterial Microcrystalline Cellulose*). Essas celulosas são livres de hemicelulosas ou lignina e apresentam diferentes graus de polimerização, cristalinidade, área superficial, entre outras características (PAYNE et al., 2015).

O uso da biomassa como fonte indutora para produção de celulasas é extensivamente descrito na literatura. Resíduos de diversas culturas como milho, cana de açúcar e soja são utilizados. Acredita-se que a produção de celulase para uma aplicação específica, o ensaio

ideal deve ser o mais próximo da condição onde a enzima será utilizada (MANDELS; WEBER, 1969). Assim, utilizar o substrato heterogêneo na presença de hemicelulose, lignina e diversos inibidores seria uma maneira de mimetizar as condições reais da biomassa a ser degradada. Além disso, na produção de enzimas *on-site*, que ocorreria idealmente na biorefinaria onde o preparado fúngico será utilizado, a biomassa residual é abundante. Entretanto, a heterogeneidade do material pode supervalorizar ou subestimar a ação das enzimas, além de ser um desafio a comparação em materiais indutores não purificados (POLIZELI et al., 2005).

Mandels e Reese (1957) questionaram o fato de como esses substratos insolúveis podem induzir a produção de enzimas extracelulares em fungos. Apesar de esforços para responder essa questão, nem a natureza do indutor ou como o sinal é transmitido foram totalmente elucidados (DOS SANTOS CASTRO et al., 2014). No entanto, sabe-se que oligossacarídeos solúveis como lactose, celobiose e sofrose são indutores na produção de celulasas em *T. reesei* (MANDELS; REESE, 1957, 1960; STERNBERG; MANDELS, 1979).

A lactose é uma das fontes de carbono solúveis mais utilizadas, pois é uma alternativa de baixo custo. Entretanto, quando o secretoma do fungo cultivado apenas em lactose como fonte exclusiva de carbono é comparado a um de cultivo em material celulósico, pode-se observar que a produção de celulasas em lactose possui rendimento inferior, ocorrendo tardiamente e com atividade enzimática de baixa especificidade (BISCHOF et al., 2013).

Além da indução, outro ponto importante relacionado à produção dessas enzimas é a repressão pela formação de produto. Como a função principal das celulasas em microrganismos é a hidrólise da celulose para fornecimento de oligômeros solúveis às células fúngicas como fonte de energia, quando há excesso do produto, mesmo na presença de indutores, a produção dessas enzimas é reprimida. Em *T. reesei* e outras espécies de fungos, essa repressão é mediada pelo fator de transcrição CRE1 (SEIBOTH; IVANOVA; SEIDL-SEIBOTH, 2011). Algumas linhagens hipercelulolíticas, como RUT-C30, sofreram mutações nos genes responsáveis por esse mecanismo de repressão e portanto, produzem altas taxas de celulasas mesmo na presença de glicose (PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

Além do material indutor, a fonte de nitrogênio utilizada no cultivo influencia a produção de celulasas. Sulfato de amônio, nitrato de amônio, nitrato de sódio, cloreto de amônio, nitrato de sódio, peptona, ureia, extrato de levedura e outros vêm sendo estudados quanto ao aumento da produção de celulasas (IKEDA et al., 2007; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; MANDELS; WEBER, 1969). Extrato de levedura, uma fonte de nitrogênio orgânico, é apontado como responsável pelo aumento da produção enzimática em *T. reesei*,

sendo a atividade de celulasas maior em comparação ao meio de cultivo contendo peptona. Isso pode estar relacionado à morfologia e quantidade de hifas produzidas em meios de cultivo contendo extrato de levedura (AHAMED; VERMETTE, 2008).

Um dos fatores físicos que mais afetam a produção de enzimas em cultivos submersos é o pH, já que pode influenciar o crescimento do fungo e conseqüentemente a formação de produtos no meio de cultivo. Quando cultivados na presença de carboidratos, os fungos filamentosos mostram forte tendência em modificar o pH do meio de cultivo, ocorrendo queda do pH durante o consumo e aumento após a exaustão da fonte de carbono (FERREIRA et al., 2009). Em experimentos utilizando frascos sob agitação, ao contrário do que acontece em biorreatores, o controle de pH não é realizado ou ocorre de maneira ineficiente (KADAM; KEUTZER, 1995). Além da fonte de carbono, a natureza da fonte de nitrogênio utilizada também pode alterar o pH do meio de cultivo ou agir como um agente tamponante (IKEDA et al., 2007). Diversos estudos mostram que o pH ótimo para produção de celulasas é variável de acordo com a espécie de fungo utilizada (Tabela 1), mas geralmente está em torno de 5,5 (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

Nesse contexto, alguns componentes com a função de estabilizar o pH do meio de cultivo vêm sendo estudados. Kadam e Keutzer (1995), utilizando solução de ácido cítrico e citrato de sódio, obtiveram aumento significativo na produção de celulasas em *T. reesei* mostrando uma correlação entre o aumento do pH e a diminuição da atividade celulolítica. Outros agentes como ácido succínico e ácido fórmico também são descritos como tamponantes de cultivos (FERREIRA et al., 2009).

Fatores como temperatura, aeração, quantidade de material inoculado e agitação também interferem na produção de enzimas. A temperatura de crescimento das culturas deve respeitar a natureza do fungo, se esse é de origem mesófila ou termófila e assim produzir quantidades significativas de proteínas. Sabe-se que a quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultivo influencia a produção de celulasas e esse fator é facilmente controlado em biorreatores, mas não em frascos agitados. A quantidade de material inoculado deve evitar a formação de *pellets* de crescimento densos, já que esses produzem enzimas em níveis mais baixos. Altas agitações também podem ser prejudiciais se forem danosas aos agregados de células formados ao longo do cultivo (AHAMED; VERMETTE, 2008, 2009; DOMINGUES et al., 2000).

Tabela 1 – Valores de pH ótimos para produção de celulases e xilanases por diversos fungos filamentosos cultivados em diferentes fontes indutoras. Adaptado de Reis e colaboradores (2013)

Microrganismo	Xilanases	Celulases	Endoglicanases	β-glicosidases	Referência
<i>Aspergillus awamori</i>	4,0			4,0	Smith; Wood (1991)
<i>A. niger</i>				4,8	Zahoor et al. (2011)
<i>A. niger</i>				4,0-5,5	Baraldo Junior et al. (2014)
<i>A. niger</i>			5,0		Ikram-ul-Haq et al. (2001)
<i>A. niger</i>		6,0	6,0		Mrudula; Murugammal (2011)
<i>A. oryzae</i>	7,5		5,5		Chipeta et al. (2008)
<i>A. sydowii</i>		5,5	5,5	6,0	Matkar et al. (2013)
<i>A. terreus</i>				4,0-5,5	Pushalkar et al. (1995)
<i>Fusarium solani</i> F7	5,5				Gupta et al. (2009)
<i>Penicillium janczewskii</i>	6,0				Terrasan et al. (2010)
<i>P. janthinellum</i>	5,5				Milagres et al. (1993)
<i>Trichoderma harzianum</i>			5,5	5,5	Ahmed et al. (2009)
<i>T. harzianum</i>	5,0				Silveira et al. (1999)
<i>T. reesei</i> RUT-C30		6,0		6,0	Juhász et al. (2004)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	4,0-6,5	4,0-4,5			Xiong et al. (2005)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	7,0				Bailey et al. (1993)
<i>T. viride</i>		6,0	6,0	6,0	Gautam et al. (2010)

2.1.4 Medida da atividade enzimática

Devido à quantidade de métodos, substratos e unidades disponíveis para expressar a atividade de celulases, houve a necessidade de criar ensaios padrão já que a comparação entre preparados enzimáticos não era possível. Dessa maneira, a I.U.P.A.C. (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) determinou métodos de análises para atividade celulolítica e substratos padrões, onde o papel de filtro Whatman nº1 é utilizado para medir a ação sinérgica de celulases totais (GHOSE, 1987). A atividade celulolítica em papel de filtro foi nomeada de FPA (do inglês, *Filter Paper Activity*) e sua unidade de expressão FPU (do inglês, *Filter Paper Unit*). Essa unidade é expressa por mililitro de solução enzimática original, ou seja, não diluída. O valor 2,0 mg de açúcares redutores liberados, a partir de 50 mg de papel de filtro (conversão de 4%) durante 60 minutos de reação, foi designado como a intercepção para o cálculo de unidades de papel de filtro (GHOSE, 1987).

Usualmente a atividade em papel de filtro é utilizada como medida de celulases totais, já que contempla ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico. Outros substratos celulósicos como CMC (carboximetilcelulose) e Avicel[®] são utilizados para quantificar a ação de endoglicanases e CBHs, respectivamente. A atividade de xilanases pode ser visualizada em substratos purificados de xilana (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

Endoglicanases podem ser quantificadas a partir da hidrólise de 0,5% de carboximetilcelulose em temperatura e pH definidos, 50°C e 4,8 respectivamente. No entanto, apesar de ser recomendada pela I.U.P.A.C., assim como a de papel de filtro, a atividade em CMC pode superestimar os resultados obtidos, pois é um substrato sintético e solúvel. O Avicel[®] comercial é utilizado para medir a atividade das CBHs, já que possui baixo grau de polimerização e é relativamente inacessível ao ataque de endoglicanases. Apesar de possuir poucas regiões amorfas, essa celulose microcristalina também pode ser um bom indicativo da ação sinérgica de endo e exo-glicanases (DASHTBAN et al., 2010).

A maioria dos ensaios que envolvem acumulação do produto da hidrólise analisam a quantidade de açúcares redutores, açúcares totais e cromóforos (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Um dos ensaios mais comuns que analisam os açúcares redutores da amostra após a hidrólise é o do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959). Esse é um método colorimétrico de determinação de açúcares redutores e baseia-se no uso do reagente DNS. Esse preparado contém tartarato duplo de sódio e potássio, fenol, bissulfito de sódio e um tampão alcalino. O tartarato duplo de sódio e potássio é utilizado para aumentar a concentração de íons na solução, diminuindo a quantidade de oxigênio dissolvido. Fenol

incrementa a cor produzida durante a reação e o bissulfito de sódio atua como estabilizador da coloração. Finalmente o tampão alcalino (hidróxido de sódio) atua no redox da reação entre o DNS e os açúcares. Para promover o desenvolvimento da coloração, as amostras devem ser fervidas vigorosamente por no mínimo cinco minutos e diluídas após a reação. O resultado final pode ser verificado com leituras da absorbância a 540nm (DASHTBAN et al., 2010; MILLER, 1959).

Apesar de ser um método simples, o ensaio baseado na quantificação de açúcares redutores apresenta algumas desvantagens principalmente relacionadas a sensibilidade e reprodutibilidade do método (DASHTBAN et al., 2010). Dessa maneira, alternativas aos ensaios colorimétricos como a medida de açúcares monoméricos via HPLC têm sido aplicadas na análise dos produtos após a hidrólise (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Microrganismos e manutenção das linhagens

Os fungos utilizados no trabalho foram gentilmente cedidos pelo Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) e pertencem ao acervo de microrganismos da mesma instituição. As linhagens haviam sido testadas previamente em substratos celulósicos e aquelas que apresentaram considerável produção de celulases, disponibilizadas para testes. Ao todo, quatro isolados foram cedidos juntamente com duas linhagens padrão quanto a produção de enzimas lignocelulolíticas, *Trichoderma reesei* (QM 9414) e *Aspergillus niger* (ATCC 10004), adquiridas da Fundação André Tosello. Na Tabela 2 estão listadas as linhagens utilizadas e suas respectivas origem e data de isolamento. Os microrganismos foram armazenados em dois métodos de preservação, um de médio (Castelanni) e outro de longo prazo (criopreservação).

Tabela 2 - Isolados cedidos pelo CTC e seus respectivas origem e data de isolamento

Isolado	Origem do isolamento	Data
F88	Palha de cana-de-açúcar	07/05/2012
F108	Palha de cana-de-açúcar	07/05/2012
F171	Palha de cana-de-açúcar	21/05/2012
F713	Fundação André Tosello	-
F724	Fundação André Tosello	-
F811	Solo sob cultivo de cana-de-açúcar	05/08/2012

Para cada ensaio realizado, uma alíquota proveniente dos frascos criopreservados foi

inoculada em meio BDA (batata dextrose agar) para reativação e crescimentos das linhagens. Manteve-se o cultivo por dez dias a 25°C sob fotoperíodo de 14 horas sob incidência de luminosidade e dez horas no escuro para auxiliar na esporulação dos isolados.

2.2.2 Identificação molecular dos isolados

2.2.2.1 Extração de ácidos nucleicos

A extração dos ácidos nucleicos foi realizada segundo o protocolo adaptado de Dellaporta e colaboradores (1983). Para isso, os microrganismos foram inoculados em 30 ml de meio de cultivo líquido contendo solução basal (1,4 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 2 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 0,3 g.L⁻¹ ureia; 0,3 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,0014 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,005 g.L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 0,0016 g.L⁻¹ MnSO₄; 0,002 g.L⁻¹ CoCl₂; 0,002 g.L⁻¹ CaCl₂; 1 g.L⁻¹ peptona bacteriológica e 0,002 g.L⁻¹ Tween-80) com a adição de 10 g/L de glicose. Incubou-se os cultivos a 28°C sob agitação de 180 rpm por 3 dias. Após esse período, centrifugou-se o meio de crescimento e descartou-se o sobrenadante para que apenas a massa micelial fosse utilizada no protocolo de extração.

Aproximadamente 100 mg da biomassa fúngica foi coletada e transferida para um micro-tubo estéril. Adicionou-se 400 µl de uma solução tampão pH 8,0 contendo 100 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA e 500 mM de NaCl. Aos micro-tubos também foi adicionado aproximadamente 200 mg de pérolas de silicato de zircônio e as amostras maceradas em disruptor de células (*BulletBlender – Next Advance*, EUA) em potência máxima por 5 minutos.

Após a maceração do material, adicionou-se 33 µl de SDS 20% aos microtubos e esses foram incubados a 65°C por 10 minutos. Foi adicionado então 125 µl de acetato de potássio 5M e homogeneizou-se as amostras com o auxílio de um vortex. Os micro-tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante, aproximadamente 400 µl, transferido para um novo tubo ao qual adicionou-se 300 µl de isopropanol gelado. Inverteu-se cuidadosamente os micro-tubos e esses foram mantidos a -20°C por 60 minutos.

Centrifugou-se as amostras a 14000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Lavou-se o *pellet* formado com 500 µl de etanol 75% e os micro-tubos deixados em temperatura ambiente até que todo o álcool residual fosse evaporado. Após a secagem, o *pellet* formado foi ressuscitado em 50 µl de água ultra-pura estéril. Após realizar o protocolo de extração foi necessário verificar a qualidade e a concentração do material obtido, para isso, submeteu-se 2 µl do material extraído a análise em

espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop (*Thermo Scientific*, EUA). As amostras que apresentaram concentração igual ou superior a 50 ng/μl tiveram seu material genético amplificados na região ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

2.2.2.2 Amplificação, purificação e quantificação dos amplificados da região ITS

A amplificação da região ITS do rRNA localizada entre 18S e o 5.8S de fungos foi realizada utilizando os seguintes iniciadores: ITS1-FOR (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) descrito por White et al. (1990) e ITS4-OR (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) descrito por Gardes & Bruns (1993). A amplificação ocorreu em reação contendo: tampão para reação de PCR (*Fermentas-Thermo Scientific*, EUA); 2 mM de dNTP; 1,76 mM de MgCl₂; 1U de *Taq DNA Polimerase* (*Fermentas-Thermo Scientific*, EUA); 50 ng de DNA e 0,6 mM de cada iniciador. O volume foi completado para 25μl de água ultrapura estéril.

A amplificação foi verificada em eletroforese capilar *QIAxcel* (*QIAGEN*, Alemanha) com o kit *FAST DNA*. Os fragmentos com tamanho esperado, aproximadamente 500 pares de bases, foram purificados utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (*GE Healthcare Life Science*, Reino Unido). Purificou-se as amostras de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante e quantificou-se os produtos em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop. Os produtos purificados que apresentaram a concentração mínima de 25 ng/μl de DNA foram sequenciados.

2.2.2.3 Sequenciamento e análise das sequências

O sequenciamento parcial da região ITS do rRNA de fungos foi realizado no Centro de Biotecnologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (CEBTEC) utilizando o iniciador ITS1-FOR (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A). Comparou-se as sequências obtidas com as depositadas no *GenBank* (NCBI) através da ferramenta BLASTn. O *hit*, ou seja, a sequência do banco de dados, com maior identidade (mínimo 98%) e menor *E-value* foi o utilizado para identificar cada isolado. O *E-value* ou *expected value* é o parâmetro que indica a probabilidade de o alinhamento entre a sequência e o banco de dados ser ao acaso.

2.2.3 Meios de cultivo para produção de enzimas lignocelulolíticas

2.2.3.1 Análise preliminar das linhagens

Os cultivos para o *screening* inicial das linhagens foi realizado em frascos *Erlenmeyer* de 125 ml contendo 50 ml de meio de cultivo (1,4 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 2 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 0,3 g.L⁻¹

ureia; 0,3 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,0014 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,005 g.L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 0,0016 g.L⁻¹ MnSO₄; 0,002 g.L⁻¹ CoCl₂; 0,002 g.L⁻¹ CaCl₂; 1 g.L⁻¹ peptona bacteriológica e 0,002 g.L⁻¹ Tween-80) com 1% celulose microcristalina (Avicel[®]). Esterilizou-se os frascos em autoclave (121°C por 20 minutos) e esses resfriados antes da inoculação. Uma suspensão de esporos foi obtida através da adição de 15 ml de Tween 80 (0,1%) e raspagem das placas de cultivo. Uma alíquota de 500 µl dessa suspensão foi adicionada aos frascos. Incubou-se as culturas em agitador do tipo *shaker* 180 rpm por 14 dias a 28°C. Alíquotas de 1 ml do secretoma dos fungos foram retiradas após 4, 7, 11 e 14 dias de cultivo para os testes de atividade enzimática.

2.2.3.2 Otimizações do meio de cultivo

Após identificação molecular e análise inicial das linhagens quanto a produção de enzimas realizou-se experimentos para selecionar as melhores fontes de nitrogênio, agentes tamponantes e fontes de carbono para otimizar a produção de celulasas e hemicelulasas.

Um meio basal foi fixado de acordo com as concentrações descritas na Tabela 3 e as fontes de nitrogênio e carbono, e soluções tamponantes variadas de acordo com os ensaios de otimização descritos nos itens a seguir. Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 125 ml contendo 50 ml do meio de cultivo e 1,2% de material celulósico. Após o preparo dos meios, o pH foi ajustado para 5 e os frascos esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Inoculou-se 500 µl da solução 10⁸ de esporos obtida através da lavagem da placa contendo crescimento fúngico com Tween-80 (0,1%). As culturas foram mantidas por 15 dias a 28°C a 180 rpm. Nos experimentos de otimização, realizou-se três pontos de análise (5, 10 e 15 dias), onde retirou-se 2 ml do sobrenadante do cultivo para avaliações de atividade enzimática, quantificação de proteínas e pH. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 3 - Composição em g/L do meio de cultivo basal

Componentes	Quantidade (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0014
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
MnSO ₄	0,0016
CoCl ₂	0,002
CaCl ₂	0,002
Lactose	2

2.2.3.2.1 Fonte de nitrogênio

Para avaliar a interferência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de celulases e hemicelulases, utilizou-se a ferramenta do planejamento de misturas. Para isso, seis ensaios contendo diferentes concentrações de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ureia e extrato de levedura foram conduzidos. A proporção entre carbono e nitrogênio foi fixada em 6,2 e Solka-Floc[®] (*International Fiber Corporation*, EUA) utilizado como fonte celulósica. Na Tabela 4, estão descritas as concentrações dos componentes dos seis meios de cultivo experimentais. Com o auxílio do software *Statistica* projetou-se um meio de cultivo otimizado quanto as fontes de nitrogênio para cada linhagem e esses foram utilizados nos testes posteriores.

Tabela 4 – Composições dos seis ensaios com diferentes concentrações das fontes de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ureia e extrato de levedura

Componentes (g/L)	E1	E2	E3	E4	E5	E6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0	5,19	0	2,59	0	2,59
Ureia	0	0	2,36	0	1,18	1,18
Extrato de levedura	9,2	0	0	4,58	4,58	0

2.2.3.2.2 Soluções tamponantes

Os ensaios com soluções tamponantes foram realizados através da adição de tampão citrato de sódio, ácido succínico e PIPES aos meios de cultivo. Na

Tabela 5 é possível visualizar os diferentes agentes tamponantes, sua concentração, pH e capacidade de tamponamento.

Tabela 5 – Soluções utilizadas como agentes tamponantes, suas concentrações, pH e capacidade de tamponamento dos meios de cultivo

Solução	Concentração (mM)	pH	Capacidade de tamponamento
Ácido cítrico + NaOH	75	3,5	2,15-6,51
Ácido succínico + NaOH	100	4,8	3,8-6,0
PIPES	100	6,2	6.1-7.5

Solka-Floc[®] foi utilizado como material celulósico indutor e a fonte de nitrogênio fixada de acordo com os dados obtidos no experimento de otimização para esse elemento. Nos ensaios que continham o ácido cítrico como agente tamponador, 50mM da solução esterilizada desse componente foi adicionada aos cultivos a cada cinco dias.

2.2.3.2.3 Fonte de carbono

Os testes de otimização, quanto as fontes celulósicas, foram conduzidos com quatro fontes de carbono: Solka-Floc[®]; bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BIN) e pré-tratado por explosão (BPT) a vapor e deslignificação (BPTD). As biomassas foram gentilmente cedidas pela equipe de pré-tratamento do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

De maneira simples, o pré-tratamento de explosão a vapor foi realizado em reator de 65 litros pressurizado onde manteve-se a biomassa a 15 bar de pressão (198°C) por oito minutos. Após esse período, despressurizou-se o reator subitamente através da abertura da válvula. O material foi seco em temperatura ambiente e uma parte utilizada no processo de deslignificação. Para deslignificar a biomassa, 100g em massa seca do bagaço pré-tratado por explosão a vapor foi adicionado a uma solução 4% de NaOH (m/v) e ambos incubados a 100°C por 60 minutos em reator Parr.

As biomassas foram lavadas em água destilada a 60°C por 10 minutos sob agitação constante. Após a lavagem, retirou-se o excesso de água através de filtração a vácuo e o procedimento de lavagem repetido novamente. Então deixou-se o material em estufa a 50°C por 2 horas. A biomassa seca foi moída em moinho de facas e armazenada a temperatura ambiente.

Utilizou-se o protocolo do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) para análise da composição da biomassa. Esse método consiste em dois procedimentos de hidrólise ácida que fracionam a biomassa em formas mais facilmente quantificáveis. A lignina é transformada em duas frações, uma insolúvel e outra solúvel em ácido. A fração insolúvel, que também pode incluir cinzas e proteínas, é quantificada por análise gravimétrica. Já a porção solúvel é quantificada por espectroscopia UV-Vis. Os carboidratos são hidrolisados em formas monoméricas e quantificados por cromatografia de alta performance (SLUITER et al., 2011). Na Tabela 6 as composições dos diferentes materiais estão descritas.

Tabela 6 – Composição das biomassas utilizadas. BIN: bagaço de cana-de-açúcar *in natura*; BPT: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão à vapor; BPTD: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão à vapor e deslignificado

Componentes (%)	BIN	BPT	BPTD
Glicana	37,39 ± 1,42	51,65 ± 0,48	78,88 ± 1,35
Xilana	18,75 ± 1,09	6,61 ± 0,28	2,23 ± 0,13
Arabinana	2,95 ± 0,28	0,39 ± 0,02	*nd
Acetil	3,09 ± 0,05	1,07 ± 0,04	1,28 ± 0,06
Lignina insolúvel	23,00 ± 0,48	27,24 ± 0,89	5,59 ± 0,86
Cinzas	4,97 ± 0,52	12,28 ± 1,32	12,68 ± 1,81
Total	90,10 ± 2,78	99,58 ± 1,48	100,66 ± 2,51

*nd: não determinado

2.2.4 Determinação da atividade enzimática em teste miniaturizado

As avaliações das atividades enzimáticas dos secretomas dos isolados foram realizadas através da hidrólise de papel de filtro Whatman nº1 (celulases totais), Avicel[®] (exoglicanases) e xilana de *beechwood* (xilanases). A reação de hidrólise foi realizada em placas *deep well* de 96 poços em um volume reacional de 250 µl na razão 1:1 de substrato e sobrenadante. Utilizou-se a concentração de 1% m/v dos substratos em tampão citrato 0,05M (pH 4,8) e no caso do papel do filtro dois discos totalizando 0,5 mg. Incubou-se as placas a 50°C por 60 minutos em *shaker* sem agitação.

Após esse período, foi avaliada a liberação total de açúcares redutores no meio reacional pelo método descrito por Miller (1959). A cada amostra foi adicionado 250 µl do reagente DNS (GHOSE, 1987) e fervidas a 100°C por 5 minutos. Usou-se banho de gelo para paralisar a reação de coloração e foi adicionado 500 µl de água para diluição das amostras. As absorbâncias foram avaliadas em espectrofotômetro a 540 nm. Como padrões de leitura, foram utilizadas soluções com diferentes concentrações de glicose e xilose. Para glicose utilizou-se: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 2,0 mg/ml e para xilose: 0; 0,5; 1; 1,5; 2 e 4 mg/ml. Controles da reação foram usados para descontar as contribuições do extrato enzimático, sem a adição do substrato, nos valores de absorbância obtidos. Utilizou-se, também como controle de erro de pipetagem em micro volumes, duplicata das placas *deep well*.

2.2.5 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi realizada através do método BCA (*Thermo Scientific*[™] *Pierce*[™], EUA). Esse método é baseado na detecção colorimétrica em

absorbância de 562nm da reação entre o cobre (II) com proteínas em meio alcalino. Quando o cobre é reduzido forma um complexo com o ácido bicinconínico (BCA). Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante para procedimentos em microplaca e com faixa de detecção de 20 a 2000 µg/ml de proteínas. Para converter as absorbâncias obtidas em proteínas quantificadas, uma curva analítica com albumina bovina foi construída nas concentrações: 0; 25; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500 e 2000 µg/ml.

2.2.5 Avaliação do pH

As medidas de pH foram realizadas através da análise do sobrenadante dos cultivos utilizando phmetro digital (*Metrohm*, Suíça), onde 500 µl do secretoma foi coletado e transferido para placa *deep well* de 96 poços. Calibrou-se previamente o equipamento antes das medições com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0 (*Digimed*, Brasil).

2.2.6 Hidrólise enzimática

2.2.6.1 Obtenção e liofilização dos secretomas

Para obtenção do secretoma utilizado nos ensaios de hidrólise enzimática, cresceu-se os fungos em frascos *Erlenmeyer* de 1 L contendo 250 ml de meios de cultivos de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de otimização. Os cultivos foram mantidos por 10 dias a 28°C e 180 rpm. Após esse período, centrifugou-se os cultivos e o sobrenadante foi recolhido, filtrado em membrada de poliéster e levado a frascos apropriados para liofilização. Os frascos foram levados ao ultra-freezer a -80°C até o congelamento total das amostras e depois mantidos por sete dias em liofilizador de bancada *Liotop L101* (*Liobras*, Brasil). O processo de liofização foi realizado a -50°C em pressão inferior a 500 mmHg. As amostras liofilizadas foram pesadas e armazenadas em frascos de vidro herméticos em temperatura ambiente.

2.2.6.2 Avaliação dos materiais liofilizados

Avaliaram-se dos materiais quanto atividade enzimática e concentração de proteínas totais. Para isso, utilizou-se uma solução contendo 7 g/L do produto da liofilização em tampão citrato 0,05M (pH 4,8).

Para quantificar as proteínas totais presentes nessa solução, as amostras sofreram um processo de dessalinização para remoção dos sais, açúcares e possíveis inibidores presentes nos meios de cultivo. Utilizou-se colunas de dessalinização descartáveis PD-10 (*GE Healthcare Life Science*, Reino Unido), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Após esse procedimento, as proteínas totais foram quantificadas pelo método BCA da mesma maneira como descrito no item 2.2.5.

A avaliação da atividade para celulases totais foi realizada FPA e expressa em FPU e a determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Também a atividade xilanásica foi verificada através da quantificação de açúcares redutores e o substrato utilizado foi xilana de *beenchwood* (1% m/v). Já a atividade de β -glicosidase foi determinada pelo método GOD (glicose oxidase) utilizando celobiose como substrato, assim como sugerido por Ghose (1987). Considerou-se 1 Unidade Internacional (IU) a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, ou seja, 0,18 mg de glicose ou 0,15 mg de xilose por minuto.

Todas as atividades enzimáticas foram incubadas a 45°C sob agitação de 180 rpm em *shaker*. Para os ensaios de FPA utilizou-se tempo reacional de 60 minutos e para xilanase e β -glicosidase de 30 minutos. Realizou-se os ensaios em triplicata e foram descontados os valores dos brancos reacionais do preparado enzimático com e sem a adição de substrato.

2.2.6.3 Ensaio de hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 250 ml contendo um grama de massa seca de bagaço pré-tratado por explosão a vapor e 20 ml de solução, totalizando 5% do volume em sólidos. As condições do processo de pré-tratamento foram 15 bar de pressão (198°C) por oito minutos. O material foi lavado da mesma maneira como descrito no item 2.2.3.2.3. A humidade da biomassa foi medida em analisador por infra-vermelho (*Gehaka*, Brasil) e descontada para obtenção de um grama de material seco por ensaio.

Aos frascos contendo a biomassa foi adicionado 20 ml de tampão citrato 0,05M (pH 4,8) para obtenção de teor de sólidos 5%. Cada frasco recebeu 25 mg de proteínas provenientes do material liofilizado. O preparado enzimático Cellic CTec3 (*Novozymes*, Dinamarca) foi utilizado como referência e os ensaios realizados em triplicata.

Manteve-se os experimentos por 72 horas a 45°C sob agitação de 200 rpm. Alíquotas de 1 ml foram recolhidas após 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas de reação e essas fervidas a 100°C por 15 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 15000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante filtrado. Analisou-se os açúcares contidos nos filtrados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Para os cálculos de conversão enzimática, primeiramente foi verificado a concentração de açúcares teóricos na biomassa utilizada para cada ensaio segundo a equação (1):

$$\text{açúcar teórico} = \frac{\left(\frac{\text{massa material}}{\text{volume da reação}}\right) * \% \text{ glucana ou xilana}}{\text{fator H}} \quad (1)$$

As porcentagens dos carboidratos presentes na biomassa foram obtidas através da análise composicional do material onde obteve-se os valores 0,566 de glicana e 0,064 de xilana para cada grama de material em massa seca utilizado. Utilizou-se o fator H para converter os valores de glicose (0,90), celobiose (0,95) e xilose (0,88) de cada ensaio em concentrações de anidro-glicose, anidro-celobiose e anidro-xilose pela subtração das moléculas de água que foram retiradas no processo de hidrólise. Por fim, obteve-se a conversão enzimática utilizando os dados de concentrações de açúcares obtidos através dos ensaios de hidrólise (açúcar real) segundo a reação (2):

$$\text{conversão enzimática} = \left(\frac{\text{açúcar real}}{\text{açúcar teórico}}\right) * 100 \quad (2)$$

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Análise inicial das linhagens

Os isolados cedidos pelo CTC foram primeiramente crescidos em meios de cultivo BDA. Todas as culturas se mostraram viáveis, livres de contaminação e capazes de produzir esporos. Na Figura 5 é possível observar nas imagens fotográficas dos isolados a diversidade entre as colônias.

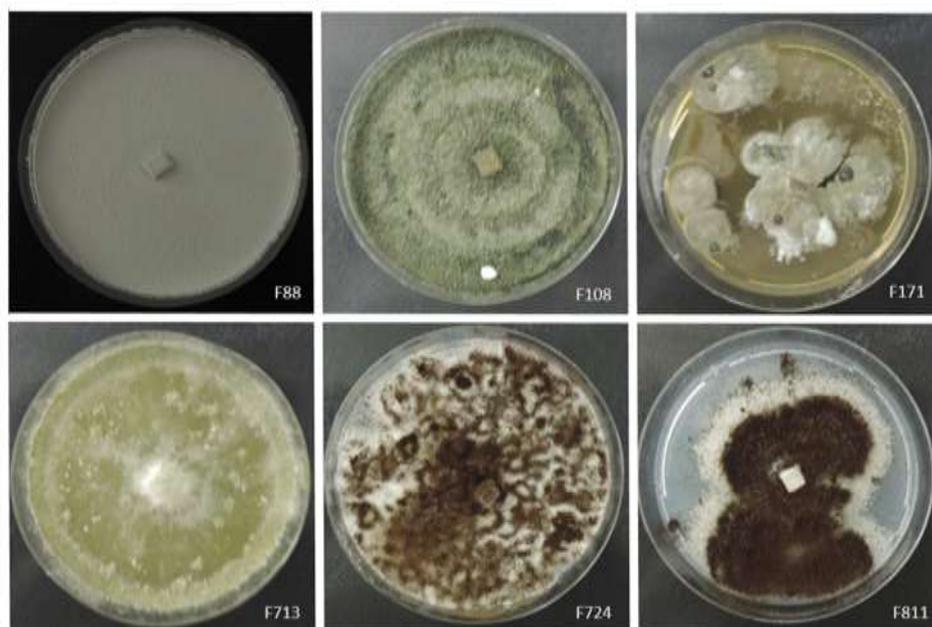


Figura 5 – Imagens fotográficas das linhagens F88, F108, F171, F713 (*T. reesei* QM 9414), F724 (*A. brasiliensis* ATCC 10004) e F811 crescidas em BDA após sete dias de cultivo a 25°C

2.3.1.1 Identificação molecular

Foi possível identificar todos os isolados a nível de espécie através do sequenciamento parcial da região ITS. A Tabela 7 mostra o número de bases, a identidade e o *E-value* obtidos após a comparação das sequências com as depositadas no *GeneBank* (NCBI).

Tabela 7 - Identificação molecular dos isolados de acordo com a comparação com sequências depositadas no *GeneBank* (NCBI)

Isolado	Identificação	Tamanho (pb)	Identidade (%)	<i>E-value</i>
F88	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	531	100	0.0
F108	<i>Trichoderma virens</i>	519	100	0.0
F171	<i>Penicillium citrinum</i>	469	98	0.0
F811	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	553	100	0.0

Segundo a identificação molecular, três isolados são pertencentes ao filo Ascomycota (F108, F171 e F811) e apenas um deles, o F88, está inserido no grupo dos Basidiomicetos (ROBERT et al., 2013). As três espécies de ascomicetos são descritas como capazes de produzir enzimas que degradam as ligações entre os polissacarídeos (HANSEN et al., 2015; PETERSON; NEVALAINEN, 2012). A linhagem F88 (*Phanerochaete chrysosporium*) é considerada modelo para estudos de degradação da biomassa devido a capacidade em produzir diversas enzimas que atuam no complexo lignocelulósico (MARTINEZ et al., 2004).

2.3.1.2 Atividade celulolítica e xilanolítica

A análise inicial das linhagens quanto à produção de enzimas capazes de atuar no complexo lignocelulósico foi realizada através de reações de sacarificação do papel de filtro Whatman n°1 e xilana. Nesse caso, utilizou-se como material indutor no cultivo, e única fonte de carbono, celulose microcristalina (Avicel®) e bagaço pré-tratado por explosão a vapor, separadamente. Os cultivos foram avaliados em quatro pontos: quatro, sete, onze e quinze dias. Na Figura 6 é possível avaliar o potencial de sacarificação de papel de filtro obtidos para os isolados cultivados em celulose microcristalina. Há certa dificuldade em comparar a produção enzimática logo nos primeiros dias de cultivo, entretanto logo após quatro dias é notável a superioridade do padrão *Trichoderma reesei* (F713). Em se tratando de padrão, o *Aspergillus niger* (F724) foi o que mostrou menor capacidade em sacarificar o substrato em

questão. Os isolados F108 e F811 foram os que mais se destacaram após o padrão *T. reesei*. Já os fungos F88 e F171 mostraram tendência de crescimento após onze dias de cultivo.

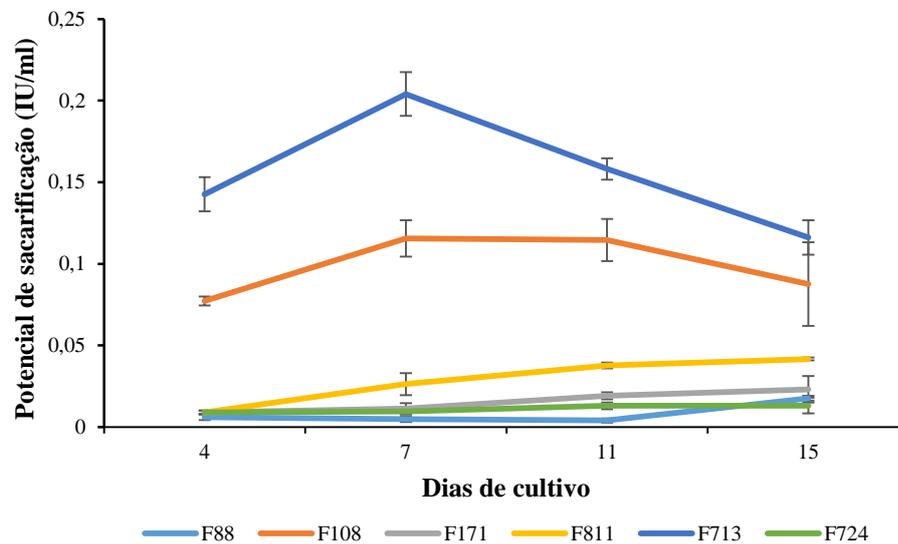


Figura 6 - Potencial de sacarificação de papel de filtro dos isolados cultivados em celulose microcristalina por 15 dias. Onde F88: *P. chrysosporium*; F108: *T. virens*; F171: *P. citrinum*; F811: *A. brasiliensis*; F713: *T. reesei* QM9414; F724: *A. niger* ATCC 10004

O potencial de sacarificação das linhagens em xilana está apresentado na Figura 7. É notável, nesse caso, a supremacia dos isolados F88 (*P. chrysosporium*) e F811 (*A. brasiliensis*) em relação aos padrões. Os isolados F108 e F171 apresentam liberações semelhantes e praticamente constantes ao longo do cultivo. Ao contrário do apresentado em papel de filtro como substrato da reação enzimática, o padrão *A. niger* (F724) teve maior potencial de sacarificação comparado ao *T. reesei* (F713) após sete dias de incubação. Isso é esperado, já que *Aspergillus niger* é descrito como um importante produtor de xilanases (POLIZELI et al., 2005).

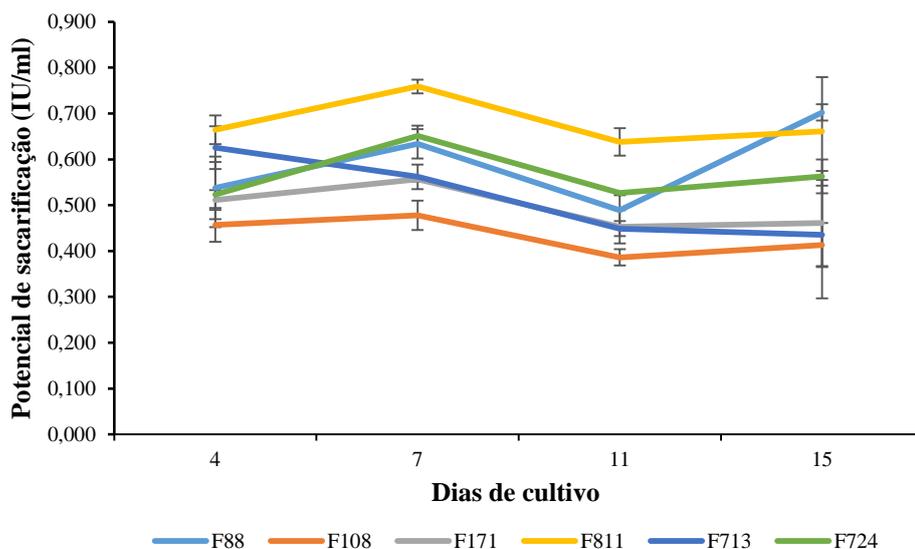


Figura 7 – Potencial de sacarificação dos isolados em xilana como substrato durante 15 dias de cultivo. Onde F88: *P. chrysosporium*; F108: *T. virens*; F171: *P. citrinum*; F811: *A. brasiliensis*; F713: *T. reesei* QM9414; F724: *A. niger* ATCC 10004

Após as análises iniciais dos isolados, tanto de identificação molecular como de potencial para produção de celulases e hemicelulases, selecionou-se três para os testes de otimização do meio de cultivo visando melhorar os níveis de liberação dessas enzimas. *P. chrysosporium* (F88), *A. brasiliensis* (F811) e o padrão *T. reesei* (F713) foram os escolhidos.

2.3.2 Otimização do meio de cultivo

2.3.2.1 Fonte de nitrogênio

Para otimizar as concentrações de fontes de nitrogênio para os dois isolados e o padrão *T. reesei*, utilizou-se da ferramenta estatística de planejamento de misturas. Essa técnica foi escolhida devido à complexidade da composição dos meios de cultivo em relação a esse elemento, pois, na maioria dos casos, as concentrações e a razão entre os constituintes interfere na produção de enzimas. Além disso, essa ferramenta é descrita como sendo conveniente para o desenvolvimento de bioprocessos complexos, como a seleção de meios de cultivo para produção de preparados enzimáticos (DELABONA et al., 2013).

Através desse instrumento, foram planejados seis diferentes ensaios variando-se as concentrações de sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura. A análise dos potenciais de sacarificação em Avicel[®], papel de filtro e xilana foram realizadas aos dez dias de cultivo, assim como as medidas de pH (Tabela 8). A escolha do décimo dia como único ponto de

análise foi realizada através dos potenciais de sacarificação de papel de filtro que, na maioria dos ensaios, foram maiores nesse dia de avaliação.

Tabela 8 – Potenciais de sacarificação (IU/ml) e medidas de pH para os isolados F88 (*P. chrysosporium*) F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei* em ensaios com diferentes concentrações de sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura

Linhagem	Ensaio	Avicel[®]	Papel de filtro	Xilana	pH
F88	E1	0,018±0,004	0,034±0,004	0,464±0,003	7,9±0,0
	E2	0,000±0,004	0,040±0,017	0,343±0,004	2,5±0,1
	E3	0,136±0,039	0,112±0,031	0,629±0,034	8,2±0,0
	E4	0,123±0,023	0,118±0,019	0,399±0,084	5,4±0,1
	E5	0,148±0,082	0,204±0,165	0,624±0,088	7,4±0,8
	E6	0,013±0,014	0,040±0,002	0,527±0,014	8,0±0,1
F811	E1	0,033±0,003	0,051±0,011	0,592±0,026	4,9±0,4
	E2	0,004±0,002	0,013±0,003	0,533±0,014	2,6±0,0
	E3	0,030±0,009	0,044±0,028	0,382±0,015	7,0±0,1
	E4	0,071±0,014	0,035±0,002	0,562±0,007	4,1±0,1
	E5	0,061±0,008	0,009±0,004	0,438±0,010	5,6±0,2
	E6	0,030±0,047	0,048±0,019	0,390±0,015	5,6±0,0
<i>T. reesei</i>	E1	0,064±0,008	0,022±0,006	0,474±0,017	7,8±0,0
	E2	0,051±0,025	0,018±0,002	0,395±0,023	2,5±0,0
	E3	0,100±0,019	0,126±0,031	0,497±0,017	7,1±0,1
	E4	0,101±0,016	0,139±0,006	0,460±0,042	6,2±0,1
	E5	0,116±0,019	0,140±0,002	0,542±0,004	7,5±0,1
	E6	0,044±0,026	0,037±0,005	0,445±0,066	5,0±1,1

Os potenciais de sacarificação dos substratos celulósicos para o isolado F88 (*P. chrysosporium*) foram maiores em E5, onde utilizou-se ureia (1,18g/L) e extrato de levedura (4,58g/L) como fontes de nitrogênio. Para xilanases, o E3 apresentou atividade ligeiramente maior (0,629 IU/ml), seguido por E5 (0,624 IU/ml). Quando os potenciais de sacarificação para os três substratos são comparados é possível visualizar que apenas para papel de filtro há um aumento significativo de E3 para E5. Esse incremento de quase o dobro possivelmente está relacionado na combinação de ureia e extrato de levedura em E3 já que as medidas de pH para esses dois ensaios não apresentaram diferença significativa devido ao desvio padrão entre as amostras.

Já para o isolado F811 (*A. brasiliensis*), obteve-se as maiores liberações de açúcares redutores em E1 e E4. A combinação entre sulfato de amônia (2,59g/L) e extrato de levedura (4,58g/L), presente em E4, proporcionou o maior potencial de sacarificação em Avicel[®]. Entretanto, para papel de filtro e xilana as maiores taxas ocorreram em E1, onde utilizou-se

extrato de levedura como fonte exclusiva de nitrogênio (9,2 g/L). Quando os valores obtidos em E1 e E4 para sacarificação de xilana são comparados é possível visualizar que o ensaio que apresentou o maior pH ($4,9 \pm 0,4$) também é o que mostrou maior potencial de sacarificação desse substrato. Sabe-se que a faixa de pH ótima para produção de xilanases é entre 5,0 e 7,0 para diferentes linhagens de fungos (SILVEIRA et al., 1999; GUPTA et al., 2009). As medidas de pH para ambos ensaios se mantiveram na faixa ótima para produção de celulases, entre 4,0 e 5,0.

Para *T. reesei* a supremacia de E5 foi evidente, onde os maiores potenciais de sacarificação para todos os substratos foram obtidos quando utilizada uma mistura de ureia (1,18 g/L) e extrato de levedura (4,58 g/L). As atividades enzimáticas foram de 0,116 IU/ml em Avicel[®], 0,140 IU/ml em papel de filtro e 0,542 IU/ml em xilana. O pH de E5 manteve-se em faixa neutra (pH 7,5).

Quando os potenciais de sacarificação entre as três linhagens são comparados é possível observar que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios que continham, no mínimo, 4,58 g/L de extrato de levedura (E1, E3, E4 e E5). No caso de E1, esse elemento foi utilizado como fonte exclusiva de nitrogênio (9,17 g/L). Além disso, as atividades enzimáticas foram menores quando se cultivou as linhagens na ausência desse elemento (E2). O extrato de levedura é uma fonte orgânica de nitrogênio e possui em sua composição, além de aminoácidos, vitaminas solúveis importantes no desenvolvimento fúngico. Ahamed e Vermette (2008) obtiveram maiores valores de FPU quando esse elemento foi utilizado como única fonte de nitrogênio em cultivos de *T. reesei*.

Entretanto, quando estudos realizados com outras espécies de fungos filamentosos são analisados pode-se constatar que tanto ureia, como sulfato de amônio são importantes na produção de enzimas. Ikeda e colaboradores (2007) trabalhando com uma linhagem hipercelulolítica de *Acremonium cellulolyticus* alcançaram os maiores valores de FPU utilizando esses elementos em conjunto. Segundo os mesmos autores, a ureia teve efeito tamponante no cultivo, já que os íons amônio liberados durante o consumo do sulfato de amônio causaram a acidificação dos ensaios onde não foi utilizado esse elemento. Esse fato também pode explicar os baixos valores de pH e potenciais de sacarificação obtidos em E2, onde adicionou-se sulfato de amônio como fonte exclusiva de nitrogênio. Dessa maneira, fica evidente que para diferentes linhagens as requisições quanto as fontes de nitrogênio são distintas e a razão entre os elementos utilizados pode afetar tanto a produção de enzimas como o pH dos cultivos.

Através dos dados de sacarificação obtidos para cada linhagem, foram elaborados os meios de cultivo otimizados quanto às fontes de nitrogênio. Os valores otimizados foram gerados pela ferramenta estatística do planejamento de misturas. Essa técnica consiste em experimentos onde as variáveis não são independentes, ou seja, quando o nível de uma variável é alterado, modifica-se também o nível de pelo menos uma das outras variáveis. Isso ocorre, pois, a proporção entre as variáveis é a característica de interesse dos ensaios e corresponde sempre a 100% (SINHA et al., 2014).

No caso do planejamento de misturas realizado para otimizar as fontes de nitrogênio para cada linhagem, após o estabelecimento das proporções ideais de cada elemento foi necessário corrigir os valores de acordo com o fator de nitrogênio de cada um. Na Tabela 9 é possível visualizar as concentrações em g/L de sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura fixados para cada organismo.

Tabela 9 – Concentrações otimizadas de sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura para as linhagens F88 (*P. chrysosporium*), F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei*

Elementos (g/L)	F88 (<i>P. chrysosporium</i>)	F811 (<i>A. brasiliensis</i>)	<i>T. reesei</i>
Sulfato de amônio	1,324	1,428	1,233
Ureia	1,382	1,004	0,944
Extrato de levedura	1,449	2,738	3,313

Após a obtenção das composições teoricamente ótimas para os isolados e o padrão *T. reesei*, realizou-se um ensaio para corroborar tais condições. Na Figura 8 é possível visualizar os potenciais de sacarificação e medidas de pH ao longo do cultivo obtidos no ensaio de validação para cada organismo.

Para o isolado F88 (*P. chrysosporium*), o meio otimizado apresentou resultados expressivamente inferiores aos obtidos nos ensaios de planejamento. Em xilana, o potencial de sacarificação foi cinco vezes menor em relação aos obtidos em E3 e E5. Também para o pH houve grande diferença, chegando a valores maiores do que os considerados ótimos para cultivo e produção de enzimas.

Já para o isolado F811 (*A. brasiliensis*), os potenciais de sacarificação mantiveram-se na mesma faixa dos obtidos em E1 e E4. Entretanto, as medias de pH ao longo do cultivo mostraram que esse fator ficou entre 7,0 e 8,0, valores considerados altos para o desenvolvimento desse isolado.

Também para o *T. reesei* conservaram-se os potenciais de sacarificação encontrados em seu melhor ensaio de otimização, o E5. Assim como nas demais linhagens, ocorreu

abrupta elevação do pH ao longo do cultivo, fato que pode ter afetado a produção e liberação de celulases.

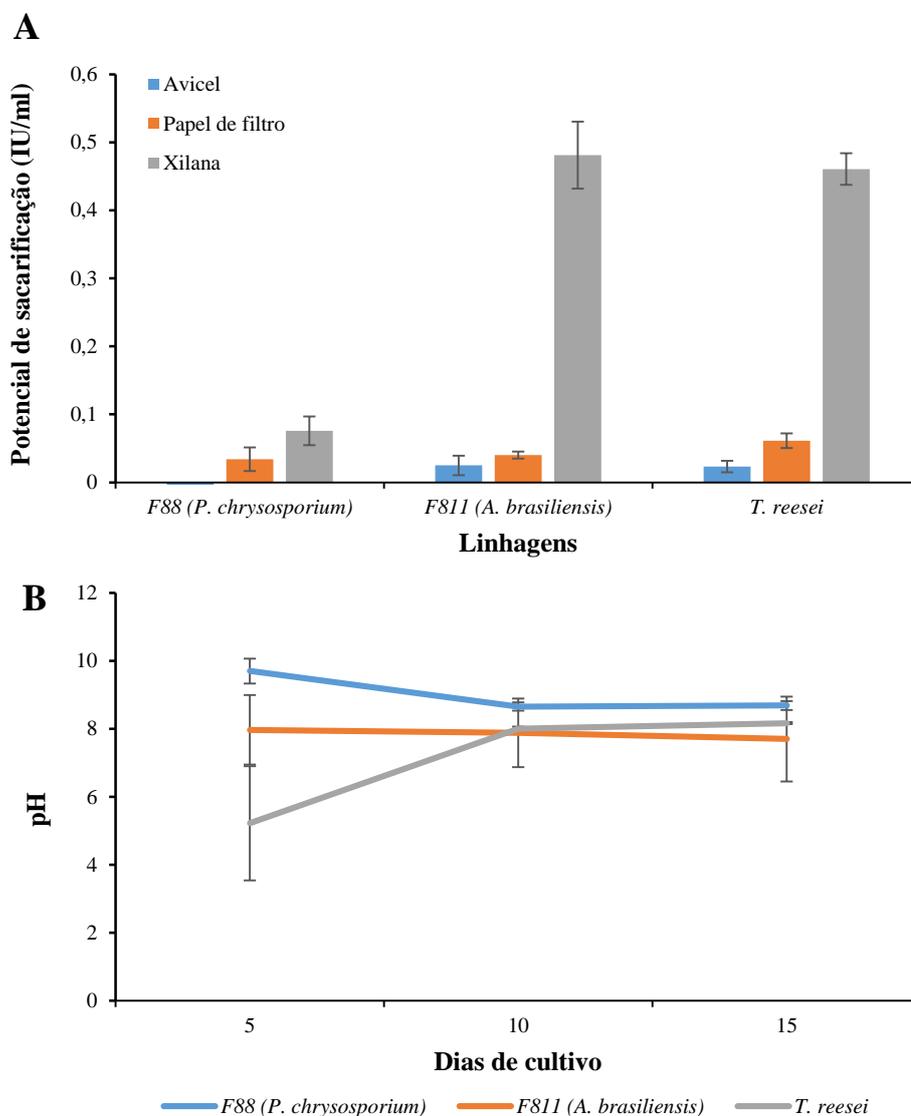


Figura 8 – Potenciais de sacarificação (A) e medidas de pH (B) para as diferentes linhagens cultivadas por dez dias em meios otimizados quanto as fontes de nitrogênio. Onde F88: *P. chrysosporium*, F811: *A. brasiliensis* e F713: *T. reesei*

Como os potenciais de sacarificação dos meios de cultivo com fontes de nitrogênio otimizadas não foram satisfatórios, principalmente para o isolado F88 (*P. chrysosporium*), novos ensaios foram realizados. Dessa vez, foram utilizadas soluções tamponantes com o intuito de manter o pH dentro da faixa ótima para melhoria de produção e atuação das enzimas em questão. Os resultados são apresentados na seção a seguir.

2.3.2.2 Tamponamento de meio de cultivo

Os tampões citrato, succinato e PIPES foram utilizados quanto a sua capacidade em estabilizar o pH ao longo do cultivo. Esse fator pode variar de acordo com os componentes utilizados, principalmente em frascos sob agitação, interferindo negativamente na produção e liberação de enzimas (DOMINGUES et al., 2000). A seguir, serão apresentados separadamente os resultados obtidos para cada linhagem.

2.3.2.2.1 *Phanerochaete chrysosporium* (F88)

Na Figura 9 é possível observar o pH para o isolado F88 (*P. chrysosporium*) ao longo do cultivo em três diferentes tampões e no controle, onde não foi adicionado agente tamponante. É notável que o pH em todos os tratamentos é praticamente estável ao longo do cultivo, tanto para as culturas tamponadas como para a controle. No entanto, apenas no tampão citrato o pH permaneceu na faixa ótima para a produção de enzimas celulolíticas, que é entre 5,0 e 5,5.

É interessante notar que o pH do meio controle permanece acima do considerado ideal para a produção de enzimas que atuam no complexo lignocelulósico. Também, quando o tampão utilizado foi o succinato o pH extrapola a neutralidade, atingindo níveis superiores a 8,0 ao longo dos dias. O tratamento com PIPES mantém o pH dentro da faixa neutra de 7,0 a 7,5.

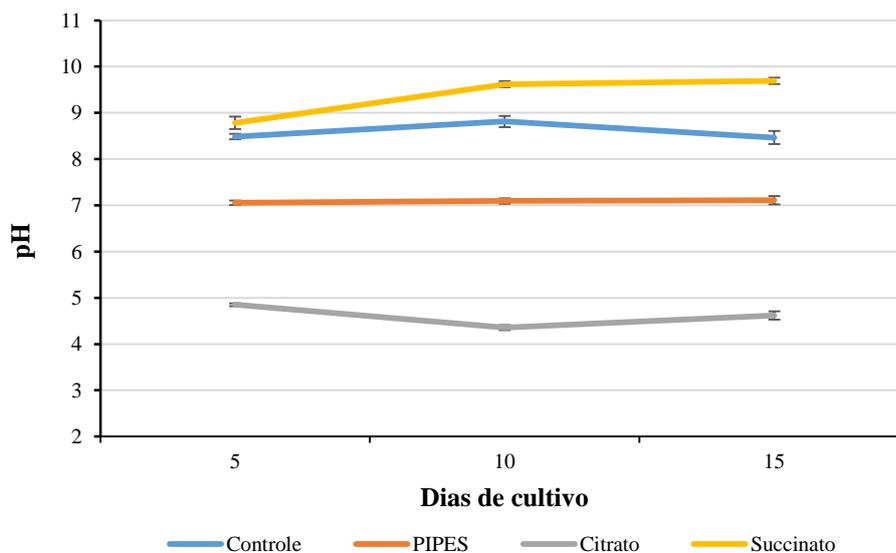


Figura 9 - Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes condições tamponantes para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*)

De maneira complementar, quando a produção de proteínas é analisada ao longo do cultivo (Figura 10), é claro o aumento de sua concentração quando tampão citrato é utilizado. O tamponamento do meio com esse composto apresentou os maiores níveis de liberação, chegando a aproximadamente 0,8 mg/ml após dez dias. Tanto o cultivo controle como o tamponado com PIPES apresentaram níveis constantes e semelhantes de produção de proteínas durante o experimento. Já para o ácido succínico, a liberação foi ligeiramente maior em relação aos outros dois tampões, mas ainda assim inferior ao obtido com tampão citrato após dez dias.

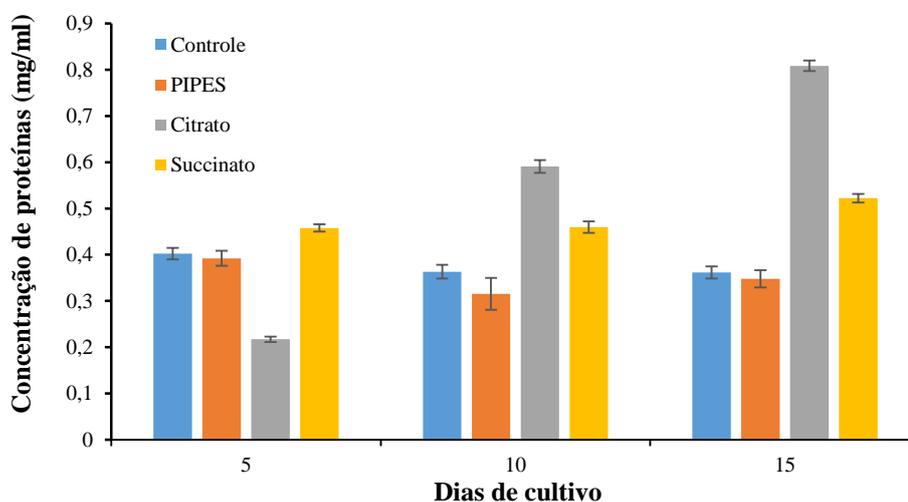


Figura 10 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes condições tamponantes para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*)

Confirmando o que foi observado para a liberação de proteínas, o potencial de sacarificação de Avicel[®], papel de filtro e xilana (Figura 11 A) mostraram-se maiores com 15 dias, quando o tampão citrato foi adicionado ao meio de cultivo. Em Avicel[®], o potencial de sacarificação é crescente ao longo dos dias quando esse agente tamponante é utilizado, atingindo aproximadamente 0,1 IU/ml de açúcares redutores após 15 dias de cultivo.

Para papel de filtro (Figura 11 B), o potencial de sacarificação também se mostrou maior e crescente ao longo do cultivo quando tampão citrato foi utilizado. Após 10 dias de incubação, o potencial com esse tampão foi aproximadamente oito vezes maior em relação ao cultivo controle. Novamente aos 15 dias, a liberação de açúcares para esse agente tamponante foi maior, mas agora apenas duas vezes maior em relação ao controle.

O potencial de sacarificação de xilana (Figura 11 C) também foi superior quando ácido cítrico foi utilizado como agente tamponante chegando a ser aproximadamente seis vezes maior em relação ao cultivo não tamponado. Curiosamente, para esse substrato, a adição de PIPES resultou no segundo maior nível de liberação de açúcares redutores e isso pode estar relacionado ao pH ótimo para a atuação das xilanases. Segundo dados da literatura (BAILEY; BUCHERT; VIKARI, 1993; CHIPETA; DU PREEZ; CHRISTOPHER, 2008), a atuação ótima dessas enzimas ocorre entre pH 7,0 e 7,5.

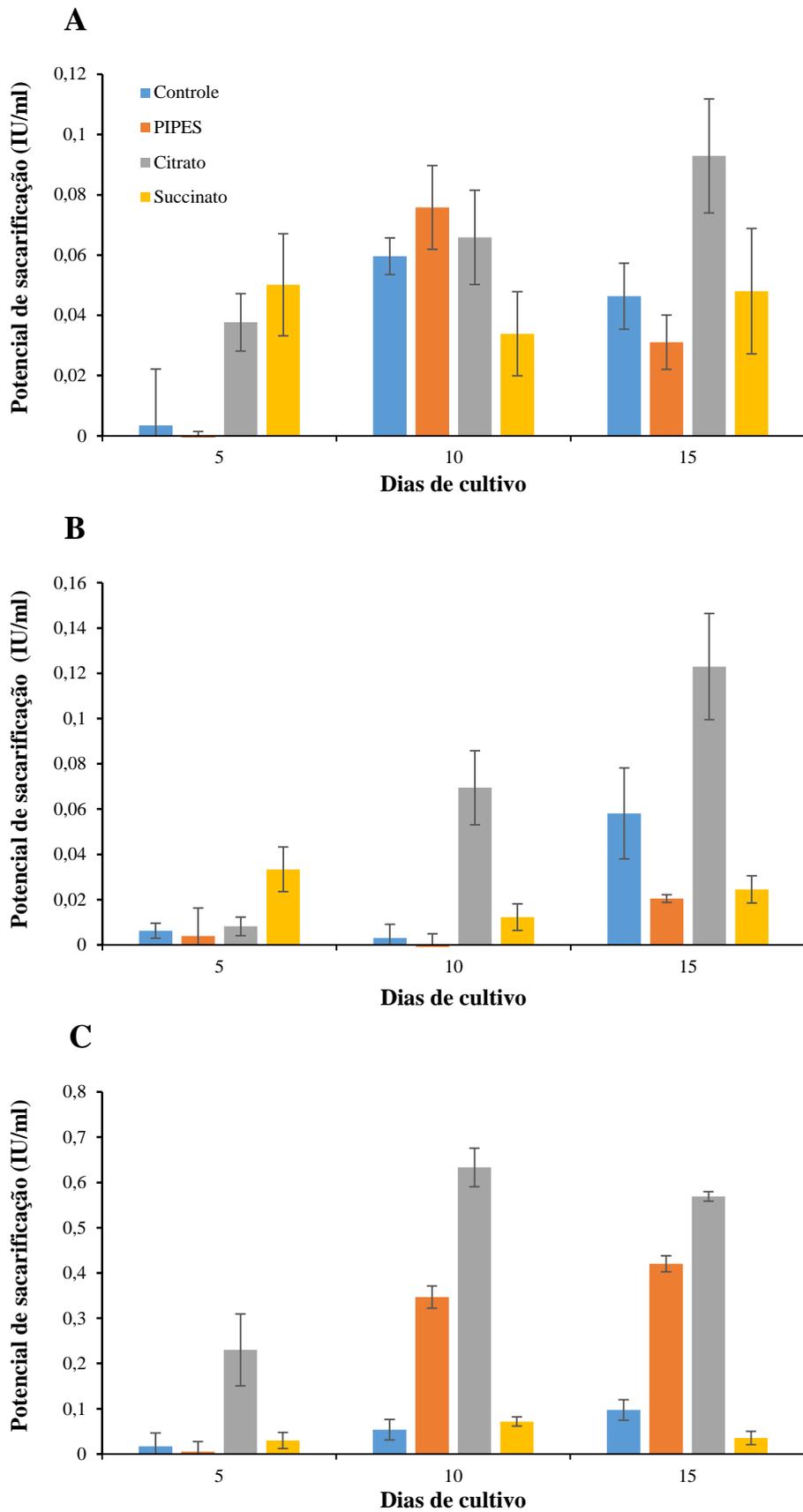


Figura 11 - Potencial de sacarificação em Avicel® (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*) cultivado em diferentes condições tamponantes

2.3.2.2.2 *Aspergillus brasiliensis* (F811)

O pH ao longo do experimento para o isolado F811 (*A. brasiliensis*) está apresentando na Figura 12. Quando se trata da faixa ótima para produção de celulases e xilanases a única solução tamponante que manteve o pH dentro desse limite foi PIPES. Além disso, o cultivo controle também apresentou pH dentro do mesmo limite. Tanto tampão citrato como succinato apresentaram níveis elevados, atingindo pH 8,0 após 10 dias.

A capacidade em manter o pH em um nível estabilizado ao longo do cultivo pode estar relacionada a algum produto do metabolismo dessa linhagem. É conhecido que diversas espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir ácidos orgânicos quando cultivadas em condições submersas (PAPAGIANNI, 2007). Além disso, quando PIPES foi utilizado, os cultivos atingiram valores de pH abaixo de sua capacidade de tamponamento (6,1 e 7,0) o que também poderia ser um indicativo que outro metabólito produzido estaria atuando como agente tamponador.

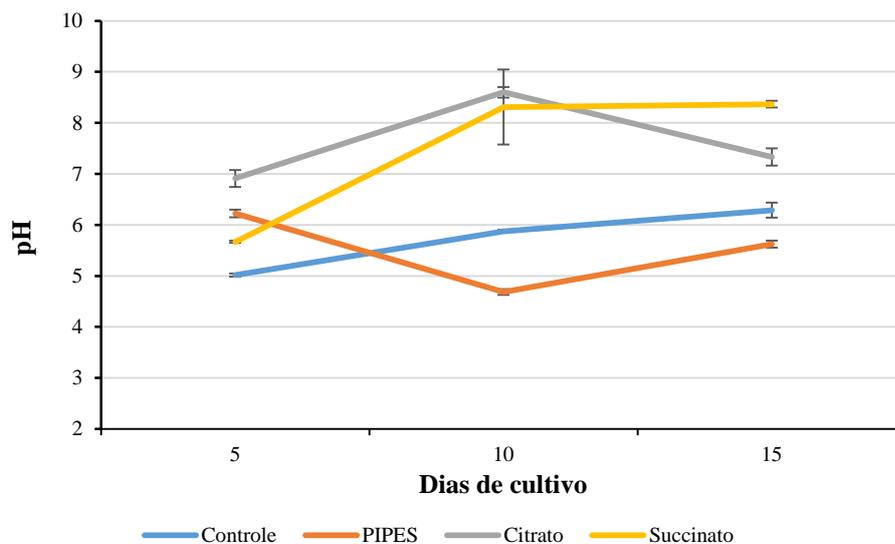


Figura 12 - Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes condições tamponantes para a linhagem F811 (*A. brasiliensis*)

Quando a liberação de proteínas ao longo do cultivo é analisada para essa linhagem (Figura 13) é possível visualizar que o maior nível é alcançado no tampão PIPES, chegando a 2 mg/ml aos 10 dias. Os resultados obtidos entre o cultivo controle e o tamponado por PIPES mostram que a quantificação de proteínas totais é maior em todas as análises quando o agente tamponante é utilizado. Para os outros tampões, citrato e succinato, não há diferença significativa entre as quantificações ao longo do experimento.

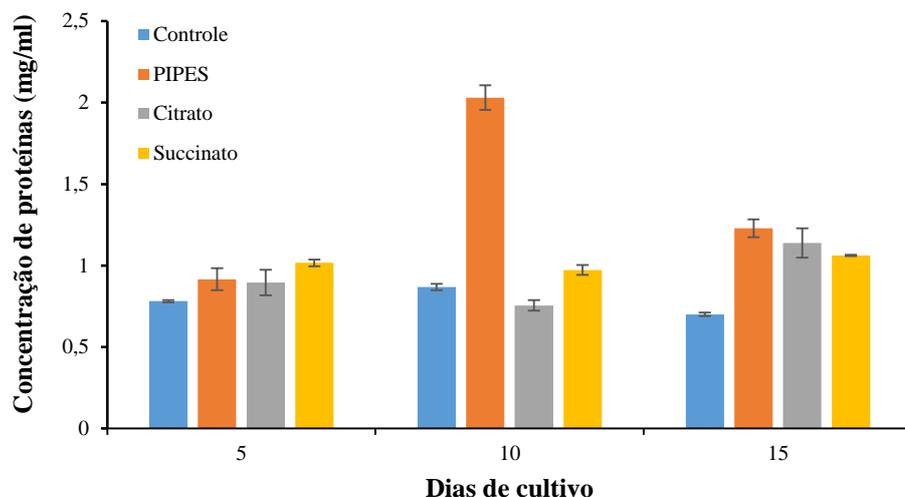


Figura 13 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes condições tamponantes para a linhagem F811 (*A. brasiliensis*)

Quando comparados os dados obtidos nos ensaios enzimáticos (Figura 14) é possível visualizar que a adição de PIPES ao meio de cultivo incrementa significativamente a produção de celulasas. Esse fato pronuncia-se após 15 dias de cultivo, onde os potenciais de sacarificação para os substratos celulósicos atingem os níveis mais altos, sendo discretamente maior em Avicel® (Figura 14 A) e pronunciada em papel de filtro (Figura 14 B). Nesse último substrato, a relação entre o cultivo tamponado com esse agente e o controle chega a ser aproximadamente três vezes maior.

Em xilana (Figura 14 C), não há grande diferença nos potenciais de sacarificação entre os cultivos com a adição de PIPES e o controle. Ambos atingem os níveis mais altos, sendo praticamente iguais, aos 15 dias. Os tampões citrato e succinato também apresentam potenciais de sacarificação próximos e dentro da mesma faixa ao longo do cultivo, entre 0,4 e 0,5 IU/ml.

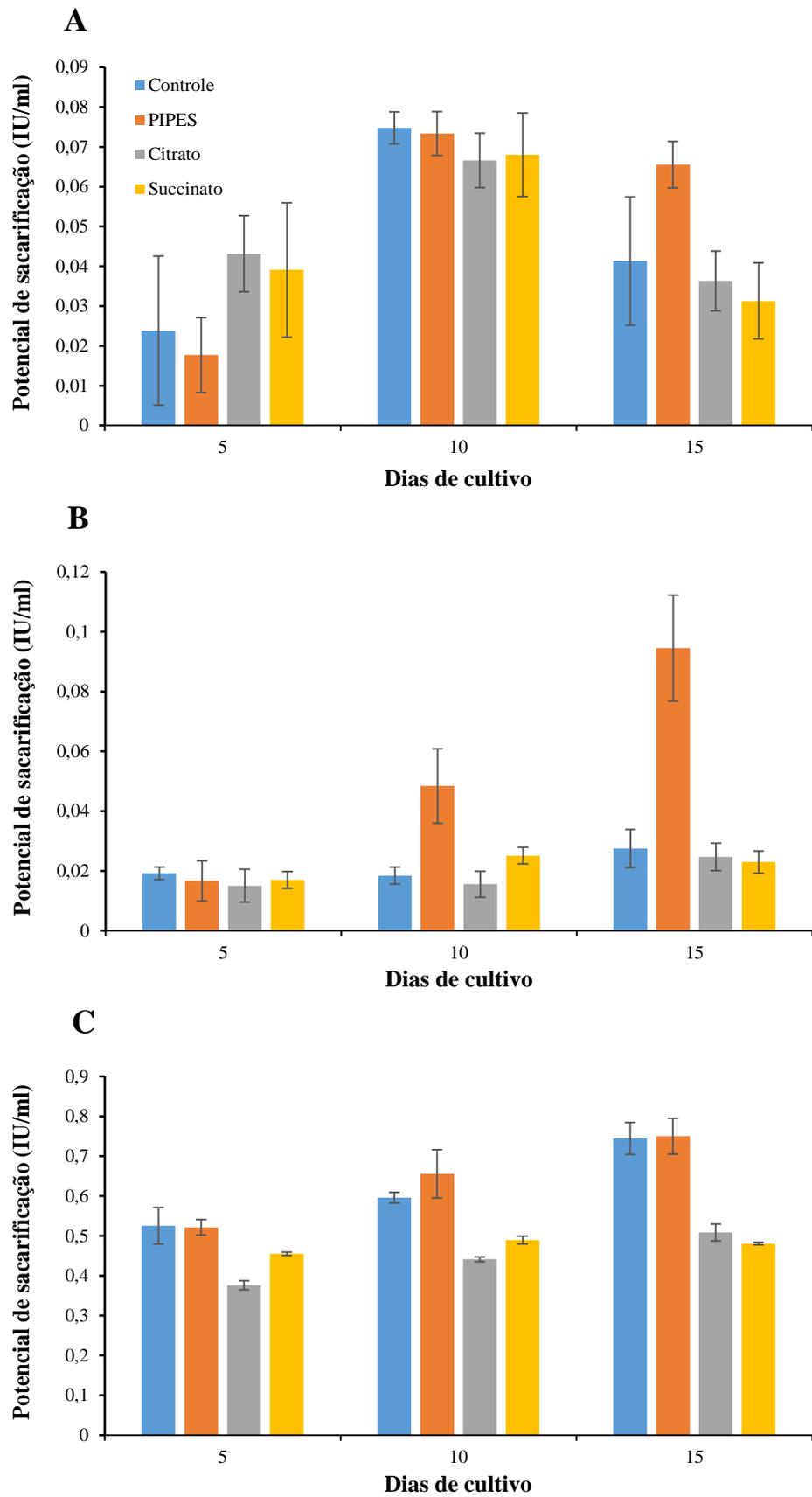


Figura 14 - Potencial de sacarificação em Avicel® (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) cultivado em diferentes soluções tamponantes

2.3.2.2.3 *Trichoderma reesei* QM9414

As medidas de pH ao longo do cultivo para o fungo padrão *T. reesei* nos três diferentes agentes tamponantes e também para o controle pode ser visualizada na Figura 15. Tanto o tamponamento com ácido succínico, como o cultivo não tamponado apresentaram drásticas elevações de pH logo após os cinco dias de cultivo. Apenas o ensaio utilizando tamponamento com citrato manteve-se dentro da faixa ótima para a produção de celulases. Já o cultivo com a adição de PIPES apresentou níveis de pH dentro de sua faixa de atuação, sem grandes flutuações ao longo dos dias.

O aumento do pH no cultivo controle ao longo dos dias pode estar relacionado à exaustão da fonte de carbono. Bailey e Tähtiharju (2003) utilizaram o aumento do pH como indicativo para a necessidade de adição de substrato via batelada alimentada para produção de celulases por *T. reesei*. Assim como no controle, o cultivo tamponado com ácido succínico sofreu aumento do pH após 10 dias de cultivo. Esse efeito também foi reportado por Juhász e colaboradores (2004) utilizando *T. reesei* em frascos agitados para produção de celulases utilizando Solka-Floc[®] como fonte de carbono.

Tampão citrato foi o único agente capaz de manter o pH dentro da faixa ótima para a produção de celulases. Além disso, não houve drástica elevação do pH com o consumo da fonte de carbono. Kadam e Keutzer (1995) mostraram que a adição de ácido cítrico ao cultivo de *T. reesei* foi eficiente em manter o pH da cultura em níveis próximos a 3,5 e 4,5 em frascos cultivados sob agitação.

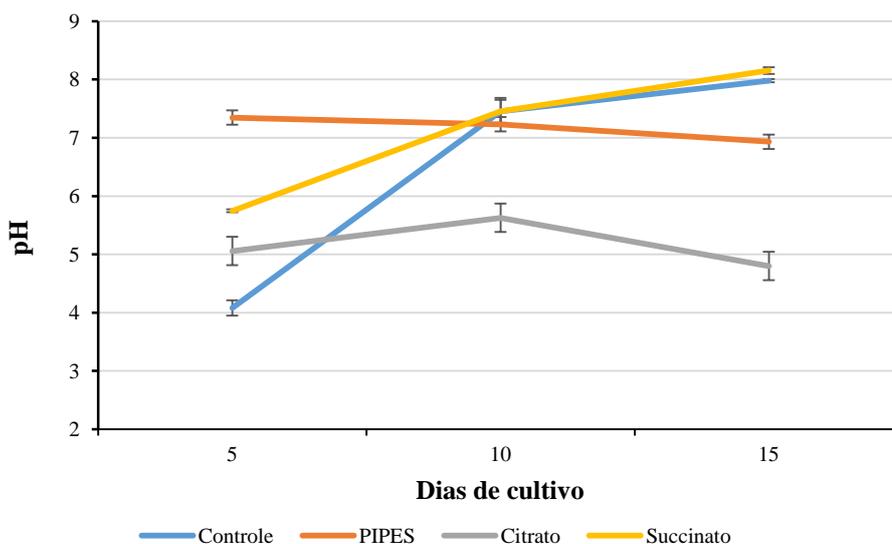


Figura 15 - Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes agentes tamponantes para a linhagem *T. reesei* QM 9414

A quantificação de proteínas totais (Figura 16) mostra que a maior liberação ocorreu quando o tampão succinato foi utilizado, chegando a liberar 1,6 mg/ml após 10 dias de cultivo. Tanto para o controle quanto para o tamponamento com citrato os valores obtidos foram relativamente parecidos em todos os pontos de análise, sendo discretamente maiores também aos 10 dias. O ensaio utilizando PIPES obteve uma liberação de proteínas menor aos 5 e 10 dias de cultivo, quando comparado ao controle não tamponado. Aos 15 dias a produção de proteínas se recupera a valores próximos ao controle.

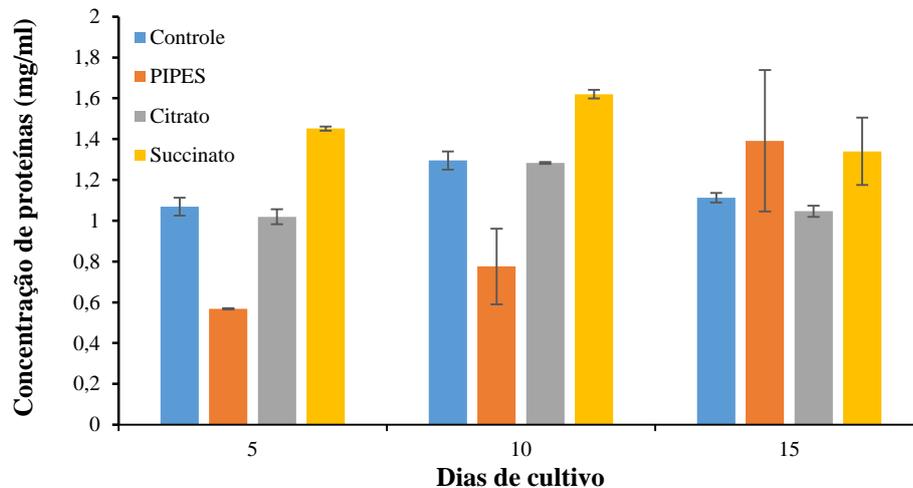


Figura 16 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes agentes tamponantes para a linhagem *T. reesei* QM 9414

Quando os potenciais de sacarificação dos substratos celulósicos são analisados para o padrão *T. reesei* cultivado nos três agentes tamponantes, ambos apresentam tendências similares de sacarificação ao longo do cultivo (Figura 17 A e B). Aos cinco dias, tanto tampão citrato como succinato apresentam os maiores índices de atividade enzimática, seguidos pelo cultivo controle e, por fim, PIPES. Isso se repete nas análises aos dez dias de cultivo, onde citrato e succinato apresentam os maiores potenciais de sacarificação 0,08 a 0,1 IU/ml para Avicel[®] e 0,12 a 0,15 IU/ml para papel de filtro. Aos quinze dias, para ambos os substratos, o tampão citrato aparece com os maiores potenciais de sacarificação.

Quando comparamos os potenciais de sacarificação com as medidas de pH dos cultivos (Figura 15), uma correlação pode ser feita entre o aumento do pH e a diminuição da sacarificação do substrato. Em papel de filtro (Figura 17 B), tanto para o cultivo controle como para o que utiliza o succinato como agente tamponante, ocorreu uma diminuição de aproximadamente metade dos potenciais de sacarificação quando o pH passou de 4,0 (controle) e 5,5 (succinato) a 8,0. Em contrapartida, os dados de tampão citrato para o mesmo

substrato mostram que o potencial de sacarificação se manteve em torno de 0,15 IU/ml e o pH na faixa de 5,0 ao longo do cultivo. Dessa maneira, essa foi a solução tamponante capaz de manter tanto o pH quanto o potencial de sacarificar os substratos ao longo do cultivo.

Para xilanases (Figura 17 C), é possível observar que não há diferença significativa entre os tratamentos após os dez dias de cultivo. Apenas aos cinco dias é notável que a adição de PIPES inibe os potenciais de sacarificação para esse substrato.

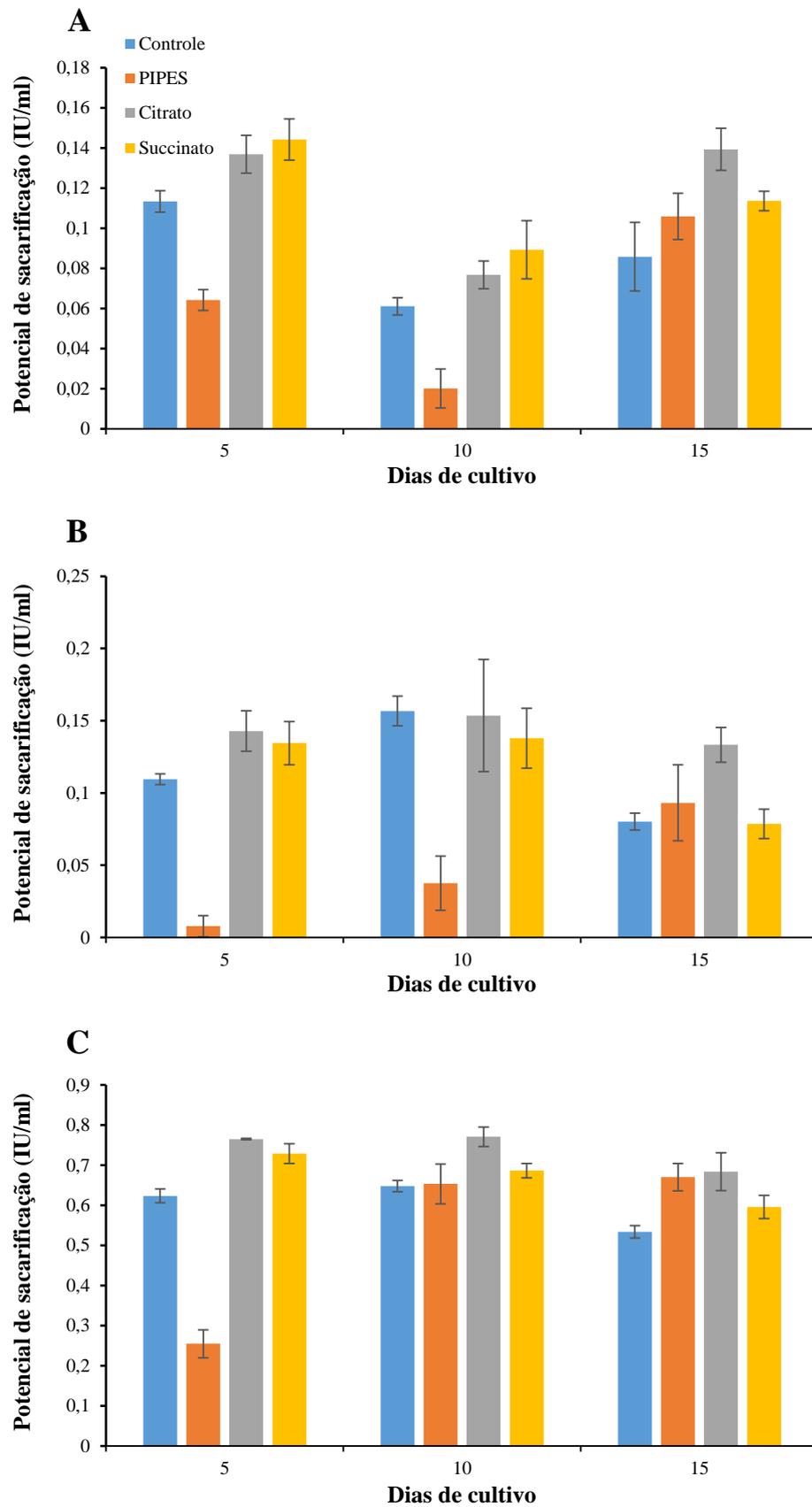


Figura 17 - Potencial de sacarificação em Avicel[®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem *T. reesei* QM 9414 cultivado em diferentes soluções tamponantes

Diversos trabalhos citam a influência do ácido cítrico no incremento da produção de celulasas em fungos filamentosos, além de seu efeito tamponante. Estudos em cultivo em bioreator, onde há monitoramento e controle de pH, mostram que apenas a capacidade de tamponamento desse elemento não explica o incremento da produção de enzimas em cultivo submerso (KADAM; KEUTZER, 1995). Kadam e Keutzer (1995) realizaram estudos com *T. reesei* utilizando Solka-Floc[®] como material indutor e propuseram três possíveis explicações para o aumento da produção de celulasas quando ácido cítrico é adicionado ao meio de cultivo. Primeiramente, o ácido cítrico poderia agir como indutor para produção de celulasas, assim como celobiose e lactose, mimetizando seus modos de ação. Esse elemento poderia também ter um efeito positivo em elementos celulares responsáveis pelo crescimento celular e pela produção de celulasas. Outro ponto sugerido pelos autores é que o ácido cítrico tornaria a parede celular mais susceptível e permeável às celulasas.

Entretanto, outros autores sugerem que a influência das soluções tamponantes na produção de celulasas está relacionada à morfologia dos fungos em cultivo submerso (DOMINGUES et al., 2000; FERREIRA et al., 2009). Para Ferreira e colaboradores (2009), alguns agentes de tamponamento evitam a formação de aglomerados compactos de células fúngicas. Essa diminuição dos agregados celulares seria a responsável pelo incremento de proteínas liberadas e conseqüente aumento da atividade celulolítica.

Apesar de os ácidos orgânicos, como o succínico e o cítrico, poderem ser consumidos pelos fungos durante o cultivo (JUHÁSZ et al., 2004), seu uso com a finalidade de tamponar os cultivos em frascos agitados se mostrou satisfatória e proporcionou incremento da produção de celulasas e xilanases. Esse aumento pode estar relacionado tanto ao tamponamento do pH na faixa ótima para produção e atuação das enzimas como na modificação da morfologia das linhagens em cultivo submerso.

2.3.2.3 Fontes de carbono

Após a otimização da fonte de nitrogênio para cada linhagem e a escolha da melhor solução tamponante, foram testadas diferentes fontes de carbono indutoras, uma vez que a acessibilidade e composição do material podem induzir diferentemente a produção de enzimas que atuam no complexo lignocelulósico. Assim, foram testadas quatro fontes de carbonos distintas: celulose purificada (Solka-Floc[®]) e três tipos de bagaço de cana-de-açúcar. Os bagaços utilizados foram: *in natura* (BIN), ou seja, sem nenhum pré-tratamento, pré-tratado por explosão a vapor (BPT) e pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação

(BPTD). As descrições dos pré-tratamentos assim como as análises composicionais das biomassas estão descritas no item 2.2.3.2.3.

Os ensaios de seleção da melhor fonte de carbono foram conduzidos com as condições de nitrogênio e carbono otimizadas para cada linhagem assim como descrito nos itens anteriores (2.3.2.1 e 2.3.2.2). Para o tamponamento dos cultivos de F88 (*P. chrysosporium*) e *T. reesei* o ácido cítrico foi utilizado como agente tamponante. Já para o isolado F811 (*A. brasiliensis*), utilizou-se PIPES para estabilizar o pH ao longo do cultivo.

2.3.2.3.1 *Phanerochaete chrysosporium* (F88)

Inicialmente para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*) foi avaliada a quantificação de proteínas totais (Figura 18). A concentração dessa variável é indubitavelmente maior nos ensaios contendo BPT como material indutor e praticamente não sofre alterações significativas ao longo do cultivo, chegando a 1,6 mg/ml após 10 dias. Também, a biomassa que não sofreu pré-tratamento (BIN) apresenta considerável expressão de proteínas em relação aos demais tratamentos (BPTD e Solka-Floc[®]).

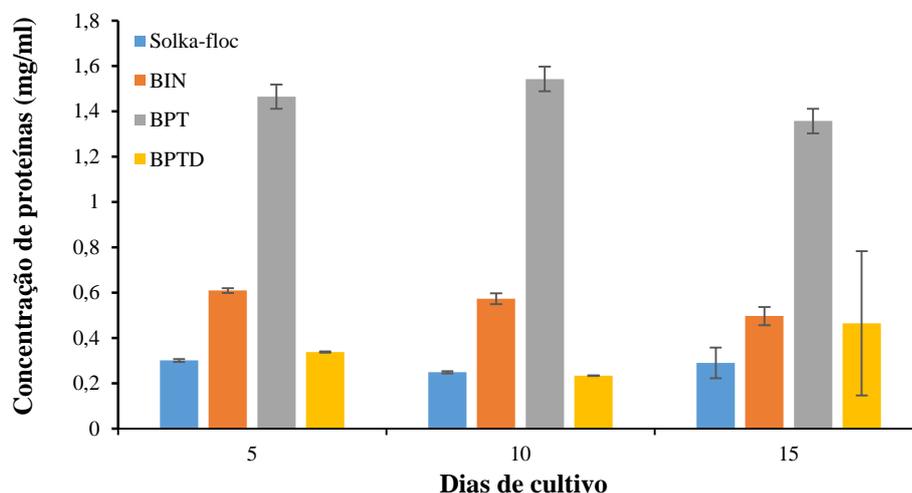


Figura 18 – Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*)

O pH dos diferentes cultivos (Figura 19) para esse isolado permaneceu na faixa entre 4,0 e 5,0 durante os primeiros dez dias de cultivo. Entretanto, após esse período, houve aumento significativo para as culturas com BPTD e Solka-Floc[®] como fontes de carbono. Esse fato pode estar relacionado à morte celular das células em cultivo ou ao tratamento alcalino utilizado para a biomassa deslignificada (BPTD). Já para BPT e BIN, a faixa de

potencial hidrogeniônico permaneceu praticamente estável ao longo dos dias entre pH 4,0 e 5,0.

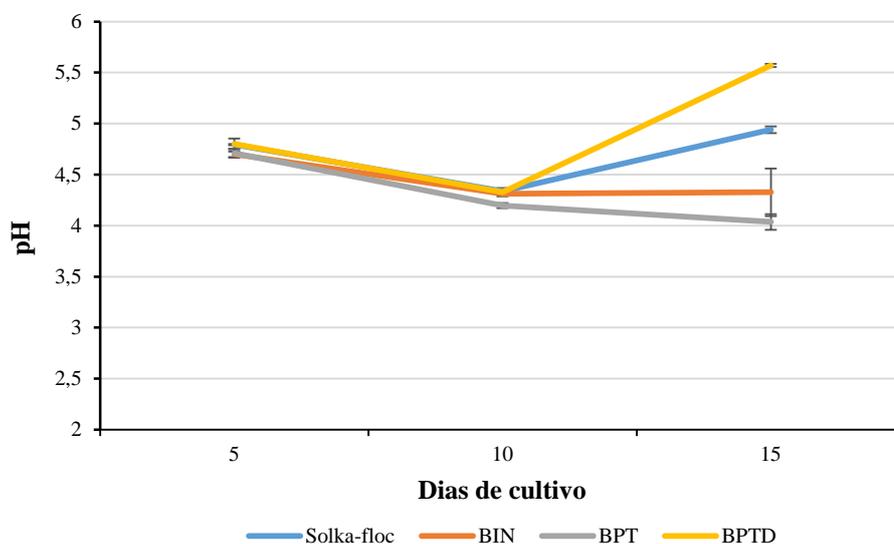


Figura 19 - Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*)

Além do pH dos cultivos induzidos por BPT e BIN permanecerem na faixa ótima para produção de celulases e apresentarem os maiores níveis de concentração de proteínas em seu secretoma, os potenciais de sacarificação também são maiores. Quando comparados os dados de proteínas extracelulares com os ensaios de atividade enzimática, o mesmo padrão foi observado para esses substratos.

Em Avicel[®] (Figura 20 A), é possível observar que a quantidade de açúcares redutores aos dez dias de cultivo é maior quando BPT é utilizado como biomassa indutora. No entanto, nos tempos de 5 e 15 dias não há diferenças significativas. Os altos desvios das amostras para esse substrato em ensaio enzimático miniaturizado, devido a sua insolubilidade, interferem negativamente na análise de seu potencial de sacarificação. Assim, os resultados obtidos em papel de filtro serão utilizados, nesse caso, para avaliar a produção de celulases.

Ao avaliarmos o potencial de sacarificação de papel de filtro (Figura 20 B) fica evidente que, após o décimo dia, o BPT se apresenta como a melhor fonte indutora. O segundo maior nível de atividade foi obtido com a fonte de carbono BIN aos dez dias de cultivo. Dessa maneira, é notável que as biomassas que apresentam lignina intacta (BIN) ou modificada (BPT) foram as melhores fontes de carbono para os ensaios enzimáticos em substrato celulósico. Já o material que sofreu o processo de deslignificação apresentou os menores potenciais de sacarificação.

Da mesma maneira, no caso das xilanases (Figura 20 C), os resultados são similares àqueles obtidos em substratos celulósicos. A sacarificação da xilana é maior quando utilizado BPT como fonte de carbono, seguida por BIN. Esses últimos, são os materiais que apresentam maior teor de hemicelulose em sua constituição. Assim como observado no ensaio enzimático em papel de filtro, a biomassa deslignificada (BPTD) foi a que apresentou menores potenciais de sacarificação. O maior valor alcançado foi aos dez dias de cultivo, com aproximadamente 0,5 IU/ml.

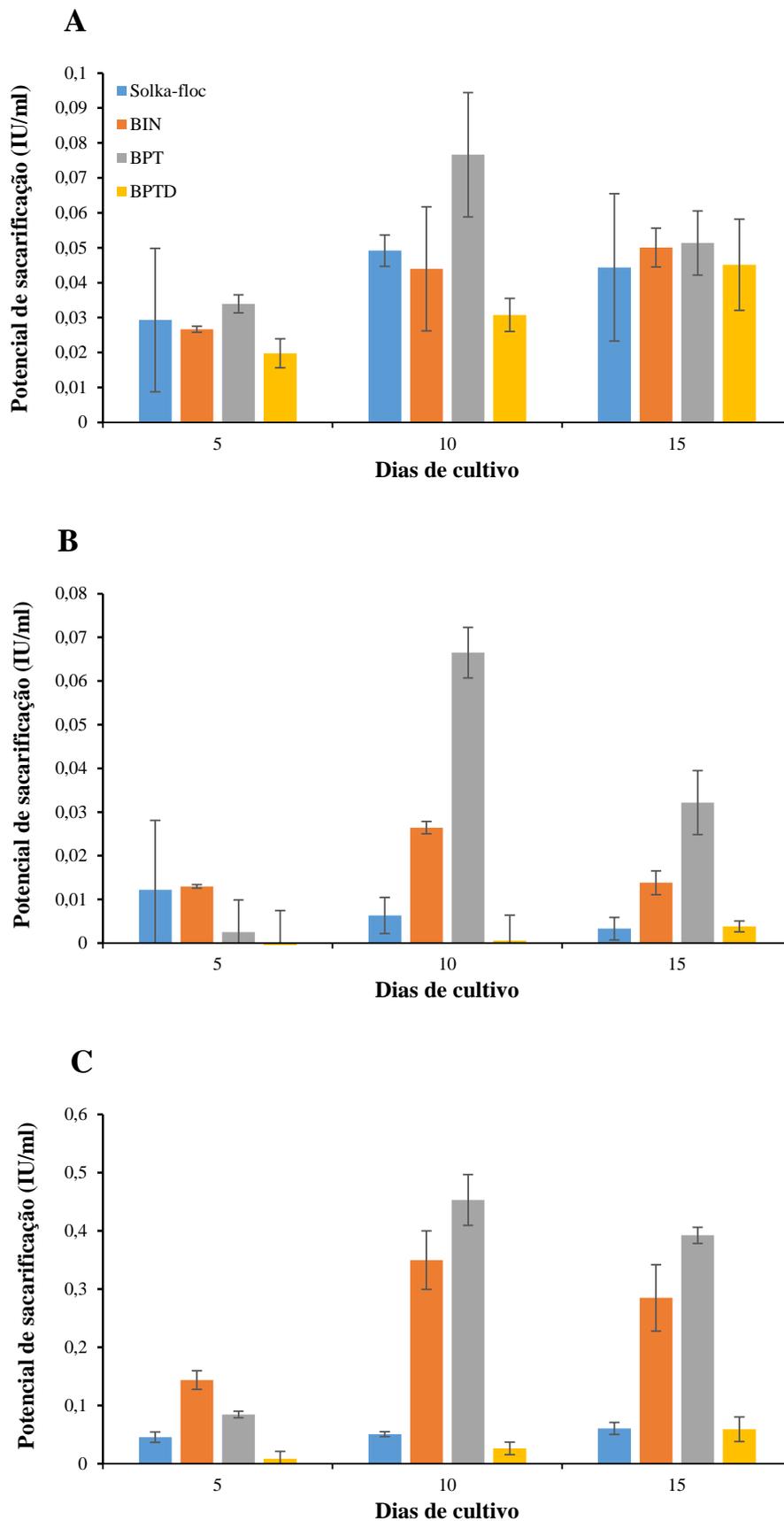


Figura 20 – Potencial de sacarificação em Avicel® (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem F88 (*P. chrysosporium*) cultivado em diferentes fontes de carbono

O Basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* é descrito como produtor de enzimas que atuam no complexo da lignina, como manganês peroxidases, lignina peroxidases e lacases, além de hemicelulases e celulases (DONG et al., 2013). O primeiro genoma dessa espécie foi completamente sequenciado por Martinez e colaboradores (2004) e revelou uma grande diversidade de genes codificadores para enzimas que, além das que atuam na degradação no complexo da lignina, também são capazes de hidrolisar os polissacarídeos presentes no material lignocelulósico. Segundo os mesmos autores, o genoma de *P. chrysosporium* apresenta genes pertencentes a 69 famílias distintas de enzimas ativas em carboidratos, sendo 166 hidrolases de glicosídeos, 14 esterases de carboidratos e 57 glicosiltransferases. Este arsenal enzimático indica uma boa alternativa para auxiliar na desconstrução da biomassa em açúcares fermentáveis. Entretanto, há evidências que a produção de hemicelulases e celulases ocorra tardiamente por esse organismo em cultivo submerso, podendo ser induzida pelo produto da ação de outras enzimas.

Dong e colaboradores (2013) estudaram a degradação do bagaço de cana-de-açúcar utilizando uma linhagem de *P. chrysosporium* e a atividade celulolítica em fermentação submersa só foi detectada após duas a três semanas de incubação. Segundo os mesmos autores, isso pode indicar que produtos da degradação da lignina e da hemicelulose, assim como o açúcar residual da biomassa, seriam os agentes responsáveis pela indução de enzimas celulolíticas. Além disso, os fungos pertencentes a essa espécie podem ter a atividade de suas enzimas inibidas pela agitação em cultivo submerso (ZAHMATKESH; TABANDEH; EBRAHIMI, 2010).

De fato, a otimização de condições de cultivo de *P. chrysosporium* parece ter sido negativamente influenciada podendo estar relacionada ao fato da expressão de celulases e hemicelulases ocorrer tardiamente e ser dependente do produto da ação de outras enzimas. Os baixos potenciais de sacarificação da indução de expressão de celulases por Solka-Floc[®] e BPTD pode ser explicado pela ausência do complexo da lignina nesses materiais, uma vez que os ensaios foram realizados com celulose purificada e biomassa deslignificada por processo alcalino.

Além disso, dados da literatura sugerem que a produção de enzimas que atuam na quebra da lignina, como lacases e manganês peroxidases, são fortemente induzidas em condições de limitação de nitrogênio (HAMMAN; RUBIA; MARTINEZ, 1997; KEYSER; KIRK; ZEIKUS, 1978). Assim, os ensaios de otimização de nitrogênio, onde foi fixado uma razão C/N considerada ótima para fungos filamentosos como *T. reesei*, podem ter

influenciado negativamente a produção dessas enzimas e conseqüentemente a de celulases e xilanases.

No entanto, apesar dos baixos potenciais de sacarificação, quando analisamos os dados de quantificação de proteínas os valores máximos obtidos (1,6 mg/ml) são consideráveis, ainda que abaixo dos apresentados por F811 e *T. reesei*. Houve então a necessidade de analisar as proteínas presentes nos secretomas das linhagens por outro método, o de SDS-PAGE. Para o isolado F88, não foi possível visualizar bandas de proteínas através dessa técnica indicando a baixa secreção de proteínas pelo fungo nas diferentes fontes de carbono. Assim, a quantificação de proteínas pelo método BCA, para esse isolado, pode ter sido superestimada devido a algum interferente presente no cultivo ou devido a presença de proteínas de baixo peso molecular.

2.3.2.3.2 *Aspergillus brasiliensis* (F811)

Primeiramente, para a linhagem F811 foram quantificadas as proteínas nos diferentes experimentos pelo método BCA. O BPT se mostrou como melhor material indutor, para esse parâmetro, atingindo cerca de 3 mg/ml após 10 dias de cultivo. A avaliação aos quinze dias mostrou que Solka-floc[®] foi o material que menos induziu a produção para esse isolado, seguido por BIN e BPTD.

Dentre as linhagens testadas nesse trabalho em BPT, é notável que F811 apresentou os maiores níveis de secreção de proteínas, fato corroborado segundo a identificação desse isolado. As espécies de *Aspergillus* são amplamente descritas como produtoras de enzimas e outras proteínas de interesse comercial, devido a sua alta capacidade de expressão tornando-as alvos de estudos para processos biotecnológicos (MEYER et al., 2015).

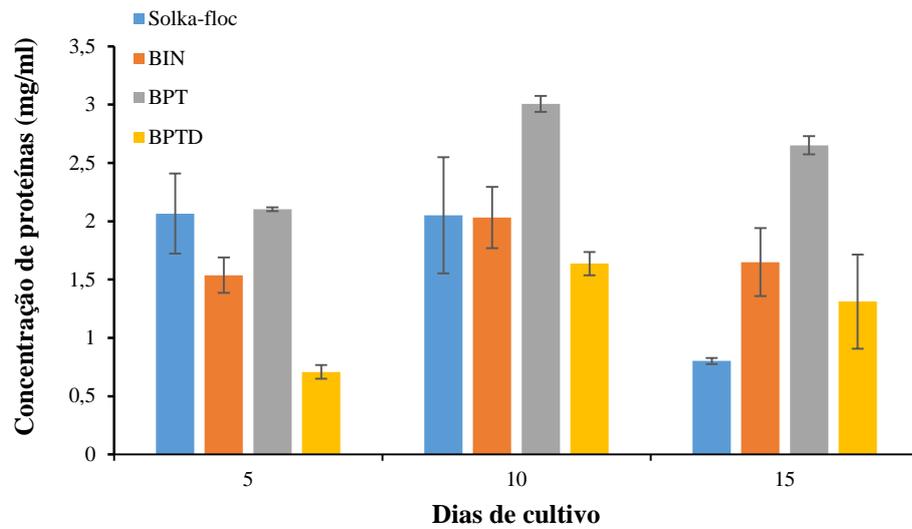


Figura 21 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem F811 (*A. brasiliensis*)

As medidas de pH dos cultivos podem ser observadas na Figura 22 e se mantiveram, na maioria das vezes, dentro da faixa ótima para produção de celulases em todos os ensaios. Há uma leve tendência ao decaimento desse fator nos cultivos em Solka-Floc® e BPTD e aumento para BIN e BPT ao fim do cultivo. O leve incremento nessas duas últimas fontes de carbono no período final de incubação pode estar relacionado à exaustão das fontes de carbono ou morte celular do microrganismo.

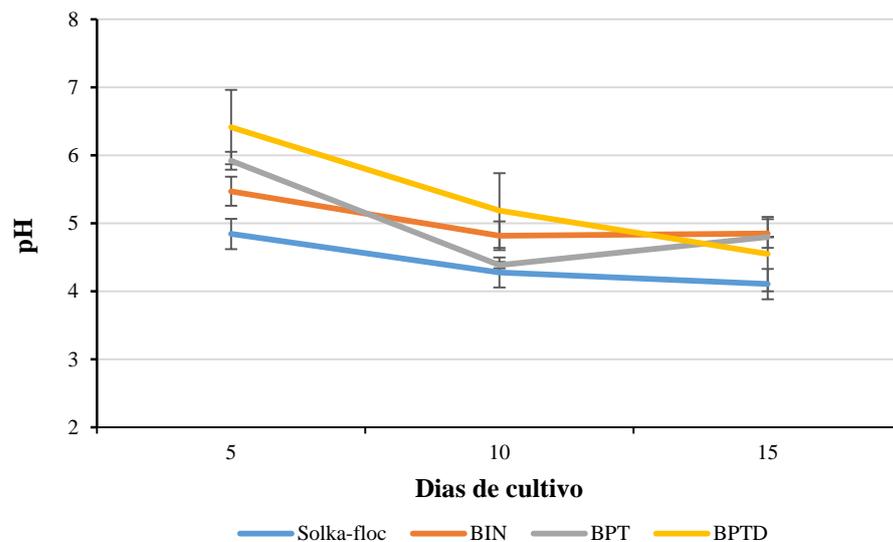


Figura 22 – Medidas de pH ao longo do cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem F811 (*A. brasiliensis*)

Os resultados dos testes de atividade enzimática para a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) estão apresentados na Figura 23. É possível observar que o BPT foi o material que melhor induziu a produção de celulases, o que pode ser evidenciado pelos potenciais de sacarificação dos substratos celulósicos (Avicel[®] e papel de filtro). Entretanto, para xilanases a biomassa pré-tratada por explosão a vapor não foi o melhor material indutor para a produção dessas enzimas. Tanto BIN como Solka-Floc[®] se apresentaram como boas fontes para obtenção de xilanases aos dez dias de cultivo. Já aos quinze, não houve diferenças significativas entre os indutores BIN, BPT e Solka-Floc[®], quanto aos potenciais de sacarificação de xilana.

O alto potencial de sacarificação de Avicel[®] e papel de filtro quando BPT é utilizado como substrato celulósico possivelmente está relacionado com a acessibilidade do material. Segundo Ramos (2003), a explosão a vapor modifica a estrutura da parede celular da biomassa deixando uma fração insolúvel composta de celulose, hemicelulose residual e lignina modificada. Dessa maneira, a celulose está mais exposta à ação sinérgica de endoglicanases e celobiohidrolases.

No caso das xilanases, tanto BIN como BPT possuem em sua composição indutores para a produção dessas enzimas, como xilose e xilo-oligômeros. Já no caso de Solka-Floc[®], o alto potencial de sacarificação pode estar relacionado à atividade cruzada de certas celulases em substratos hemicelulósicos como a xilana (BIELY; VRSANSKÁ; CLAEYSSSENS, 1991).

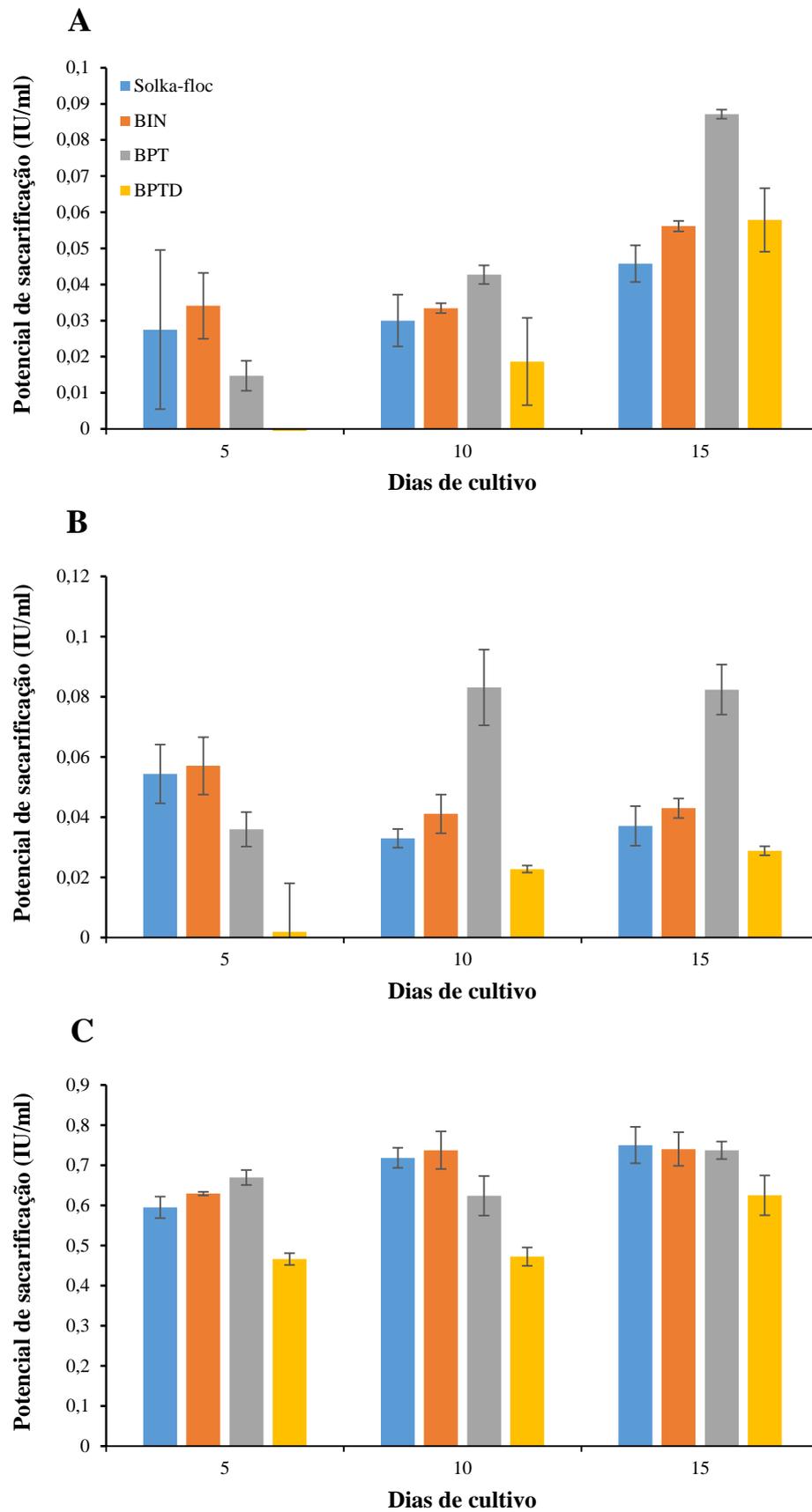


Figura 23 - Potencial de sacarificação em Avicel[®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) cultivado em diferentes fontes de carbono

Também para a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) foi realizada a análise das principais proteínas secretadas através da técnica SDS-PAGE (Figura 24). Na imagem do gel é possível visualizar o padrão de bandas formado das amostras cultivadas em diferentes fontes de carbono após 15 dias de cultivo.

Nas amostras do cultivo em BPT as bandas são mais intensas, indicando maior expressão de proteínas nesse tratamento. Esse dado é coerente com o obtido na quantificação total de proteínas pelo método BCA, onde o cultivo em BPT apresentou maior concentração de proteínas, aproximadamente 2,5 mg/ml ao final do cultivo. É notável também a presença de bandas no cultivo em BPT, que não são visíveis nos demais ensaios, como indicado pela seta na Figura 24 (III). Essa pode ser uma evidência da indução de proteínas específicas ou, como mencionado anteriormente, uma expressão maior de proteínas em relação aos outros cultivos.

Vale ressaltar que a imagem do gel SDS-PAGE apresenta apenas um indicativo visual da possível presença de proteínas expressas apenas no cultivo em BPT. Para validar essa hipótese seriam necessárias mais análises do proteoma dessa linhagem cultivada nas diferentes fontes de carbono em questão.

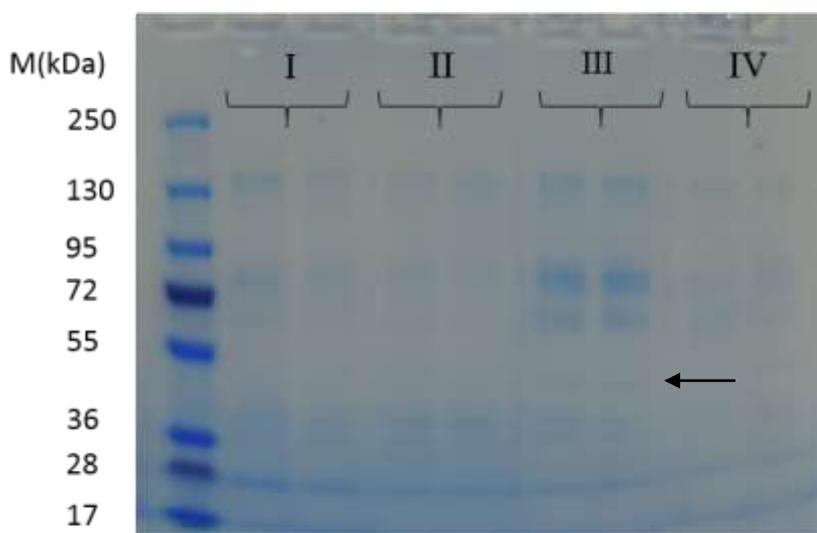


Figura 24 – Gel SDS-PAGE do secretoma da linhagem F811 (*A. brasiliensis*) cultivado em diferentes fontes de carbono. Em I: Solka-Floc®; II: BIN; III: BPT; IV: BPTD

2.3.2.3.3 *Trichoderma reesei* QM9414

Inicialmente, para a linhagem *T. reesei* QM 9414, foi realizada a quantificação de proteínas totais secretadas em cultivos nas diferentes fontes de carbono. Assim como foi observado nos isolados F88 (*P. chrysosporium*) e F811 (*A. brasiliensis*), a liberação foi maior

no cultivo em BPT (Figura 25). Além dessa biomassa, Solka-Floc[®] também apresentou consideráveis níveis de expressão.

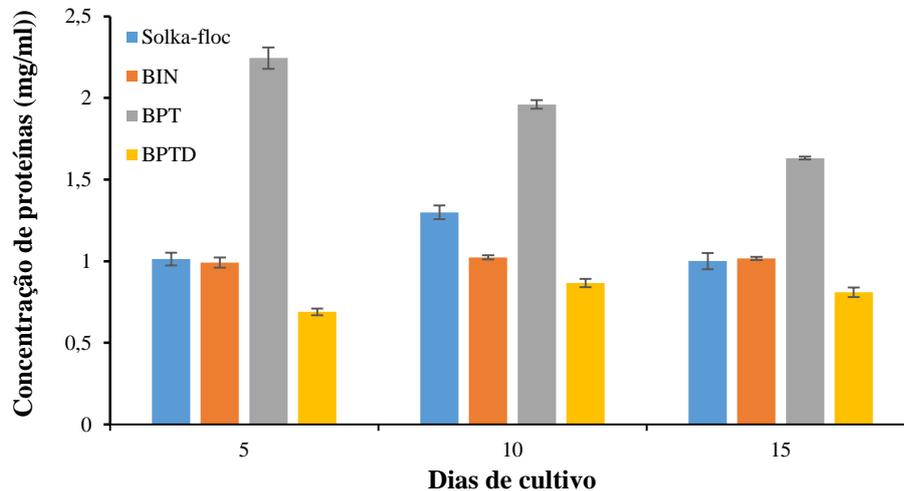


Figura 25 - Quantificação de proteínas totais ao longo dos dias de cultivo em diferentes fontes de carbono para a linhagem *T. reesei* QM 9414

Além da quantificação de proteínas, foram realizadas medidas de pH ao longo do cultivo (Figura 26). É possível observar que em todas as biomassas (BIN, BPT e BPTD) as medidas de pH estão acima dos valores considerados ótimos para produção de enzimas celulolíticas. Já em Solka-Floc[®], o pH se manteve sem grandes variações e próximo a 5,0, o que favoreceria a produção de enzimas capazes de sacarificar os materiais celululósicos.

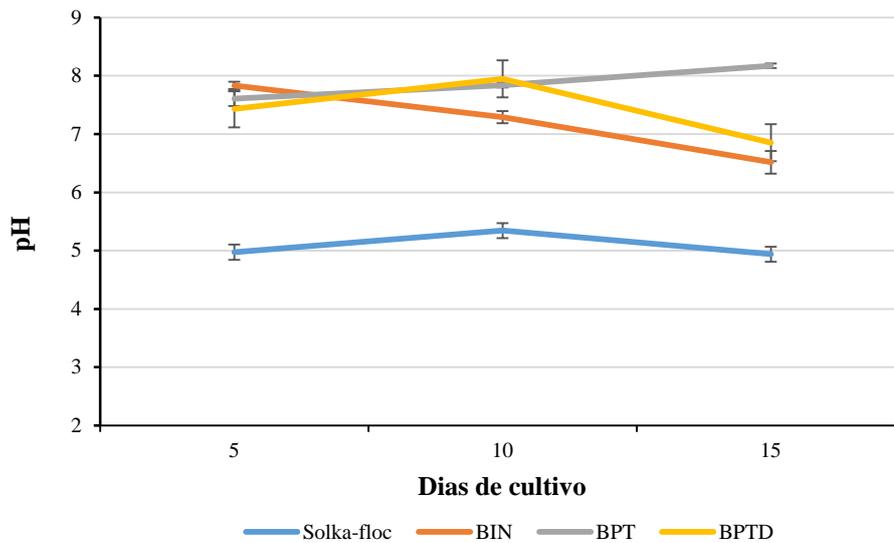


Figura 26 - Medidas de pH ao longo do cultivo de *T. reesei* em diferentes fontes de carbono

Os potenciais de sacarificação obtidos por ensaios enzimáticos nos substratos Avicel[®] e papel de filtro, mostram que Solka-Floc[®] é o melhor indutor para produção de celulases (Figura 27). A quantificação de açúcares redutores é maior aos 10 e 15 dias de cultivo, chegando a aproximadamente 0,1 IU/ml em Avicel[®] e 0,12 IU/ml para papel de filtro. Já no início do cultivo, aos cinco dias, o BPT apresenta os níveis mais altos de atividade enzimática. Em geral, o BPTD apresentou pouca diferença em relação ao BIN quanto à produção dessas enzimas. Com relação à xilana, o potencial de sacarificação desse substrato mostrou-se maior quando Solka-Floc[®] foi utilizado como fonte de carbono. Pouca diferença entre os demais substratos é observada, sendo o BPT o segundo na quantificação de açúcares redutores aos cinco dias. No restante do cultivo não há diferença significativa entre os tratamentos.

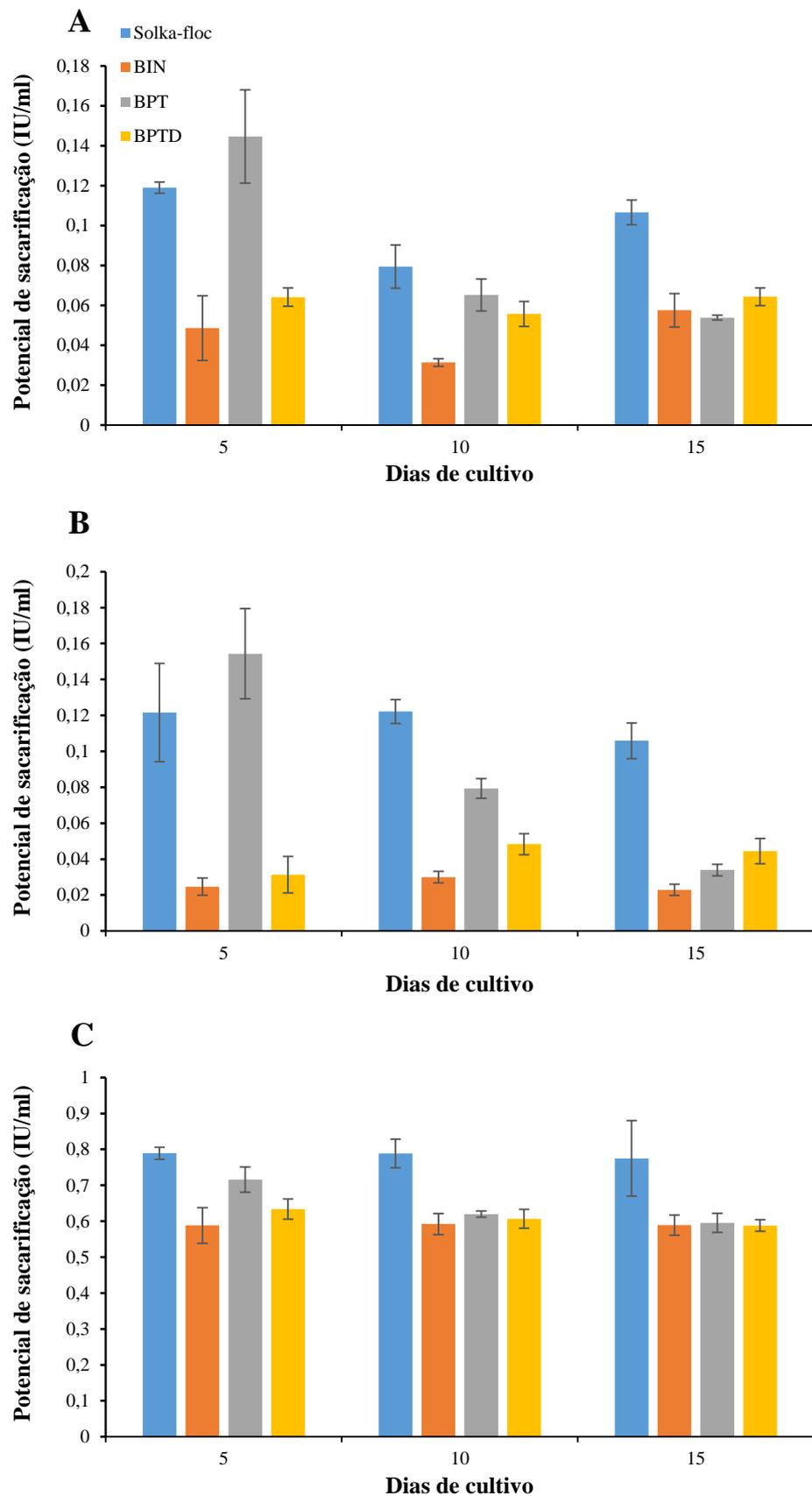


Figura 27 - Potencial de sacarificação em Avicel[®] (A), papel de filtro (B) e xilana (C) para a linhagem *T. reesei* QM 9414 cultivado em diferentes fontes de carbono

O fato de Solka-Floc[®] ser o melhor indutor tanto para celulases como para xilanasas contraria os dados de quantificação de proteínas obtidos (Figura 25), onde os níveis mais altos são obtidos em indução por BPT. Quando esses dados são confrontados com a imagem do gel SDS-PAGE, pode-se observar que o cultivo em Solka-Floc[®] apresenta um padrão de bandas mais intenso do que em BPT (Figura 28). É possível notar que na região entre 55 e 95 kDa há maior concentração de proteínas em comparação com as amostras dos demais tratamentos. Uma possível explicação para a diferença encontrada entre os dados obtidos na quantificação de proteínas pelo método BCA e os ensaios de atividade enzimática juntamente com a avaliação por SDS-PAGE é interferência de algum componente do meio de cultivo no método colorimétrico BCA. O próprio fabricante do kit relata que muitas substâncias podem interagir com o corante utilizado, interferindo na análise. Algumas estratégias podem ser adotadas para superar este viés, sendo métodos de precipitação de proteínas os mais recomendados. É necessário ressaltar que em triagens para seleção e otimização de meios de cultivo, o número de amostras acaba sendo grande e a inclusão de etapas adicionais os torna inviáveis. Mesmo assim, fica claro que é fundamental a adoção de mais de um parâmetro para análise das condições ideais de cultivo.

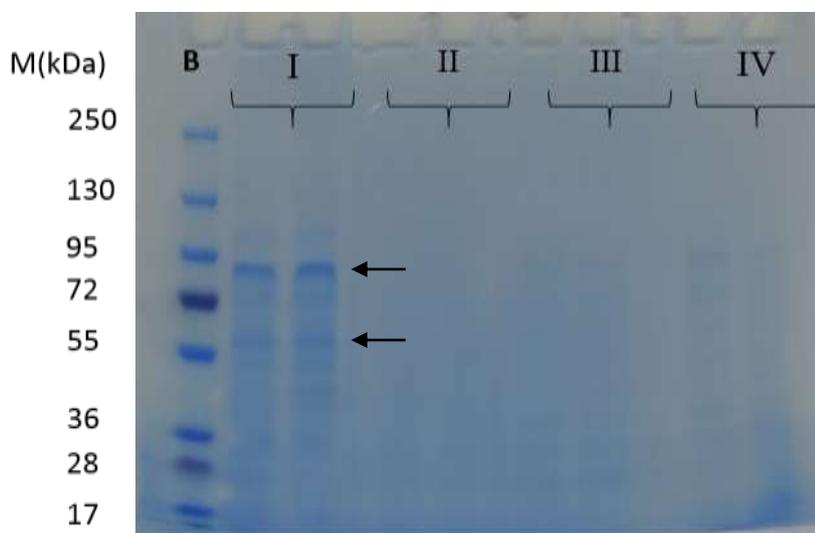


Figura 28 - Gel SDS-PAGE do secretoma do padrão *T. reesei* cultivado em diferentes fontes de carbono. Em I: Solka-Floc[®]; II: BIN; III: BPT; IV: BPTD

Segundo os dados obtidos nos ensaios de fontes de carbono, o BPT foi a biomassa que melhor induziu a produção de celulases e xilanasas para as linhagens F88 (*P. chrysosporium*) e F811 (*A. brasiliensis*). Já para *T. reesei*, os maiores potenciais de sacarificação foram obtidos quando se utilizou Solka-Floc[®]. Dessa maneira, como os fungos respondem diferentemente aos substratos, verificamos que é fundamental a avaliação das melhores fontes

de carbono para otimizar os secretomas que poderão ser utilizados posteriormente na hidrólise da biomassa.

Estudos utilizando os substratos em questão, bagaço de cana-de-açúcar e Solka-Floc[®], obtiveram bons resultados na produção de enzimas celulolíticas. Mandels e Reese (1957), nos primeiros testes de produção de celulasas em *T. reesei* já destacavam os níveis elevados de atividade enzimática quando Solka-Floc[®] era utilizado como fonte de carbono. O mesmo foi observado em outros organismos, como *Acremonium cellulolyticus* (FANG et al., 2008).

Maeda e colaboradores (2013) obtiveram um preparado enzimático através do secretoma de *Penicillium funiculosum* cultivado em bagaço pré-tratado quimicamente assim como Rocha e colaboradores (2013) com *Trichoderma harzianum*. Utilizando outra linhagem de *T. harzianum*, Delabona e colaboradores (2012) testaram diferentes biomassas, obtendo os resultados mais promissores através do uso de mistura (1:1) com bagaço pré-tratado por explosão e farelo de trigo. O uso de bagaço também foi eficiente para produção de celulasas e xilanases por *P. chrysosporium* (KHALIL, 2002).

2.3.2.3 Análise geral dos ensaios de otimização dos meios de cultivo

O objetivo principal dos ensaios de otimização dos cultivos de F88 (*P. chrysosporium*), F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei* foi encontrar as condições ideais para indução do complexo enzimático capaz de sacarificar a biomassa. Os resultados obtidos mostram que as condições ótimas para cada linhagem são diferentes quando se visa alcançar a maior produção enzimática. Esse fato corrobora a necessidade de otimização dos meios de cultivo independente para cada fungo, já que a grande parte dos dados sobre o assunto presentes na literatura são referentes a linhagens de *Trichoderma*. Nesse sentido, os testes com linhagens de outros gêneros permitem aumentar o conhecimento sobre os processos de otimização.

Muitas dificuldades foram encontradas nos ensaios de otimização devido, principalmente, a heterogeneidade das linhagens. Nos testes de otimização das fontes de nitrogênio foi necessário fixar Solka-floc[®] como fonte de carbono. Essa generalização, devido aos dados de *T. reesei* disponíveis, podem ter prejudicado o processo para F88 (*P. chrysosporium*) e F811 (*A. brasiliensis*), pois para essas linhagens o BPT se mostrou como melhor de fonte indutora. Ainda nesse sentido, no planejamento de misturas dos elementos nitrogenados foi fixada relação C/N considerada ideal para fungos filamentosos como *T. reesei*. Esse fator pode ter influenciado negativamente o desenvolvimento e produção do complexo enzimático por F88 (*P. chrysosporium*), visto que os estudos com linhagens dessa

espécie mostram que algumas enzimas são expressas em concentrações mínimas de nitrogênio (KEYSER; KIRK; ZEIKUS, 1978).

Outro ponto importante está relacionado a dificuldade em manter o pH dos cultivos em frascos sob agitação, já que nesse método de seleção não há controle desse fator. As linhagens mais sensíveis a flutuação desse elemento podem ser prejudicados, tendo sua capacidade enzimática subestimada.

Além de todas as barreiras relacionadas as condições ideais, há também os problemas relacionados aos métodos de avaliação. Os resultados dos diferentes ensaios mostram que apenas um método de análise não é suficiente para avaliar as diferentes respostas das linhagens. A quantificação de proteínas e medidas de pH dos sobrenadantes são bons indicativos das condições mais promissoras, mas precisam ser avaliadas juntamente das atividades enzimáticas. Entretanto, os ensaios de atividades enzimáticas são conduzidos com o sobrenadante bruto, não concentrado, onde as proteínas de interesse estão diluídas no secretoma do fungo.

Apesar de todos os pontos citados anteriormente, a análise conjunta desses três fatores possibilitou o estabelecimento das condições ideais para cada linhagem. Assim, foi possível realizar as atividades posteriores e avaliar as linhagens quanto sua capacidade hidrolítica da biomassa.

2.3.3 Hidrólise da biomassa

A partir dos testes de otimização do cultivo descrito no item anterior (2.3.2), as linhagens foram cultivadas em maior volume e seus secretomas testados em ensaios de hidrólise da biomassa. Primeiramente, os fungos foram cultivados em 250 ml de meios de cultivo otimizados quanto as fontes de nitrogênio, soluções tamponantes e fontes de carbono como apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 – Condições de cultivo otimizadas quanto as fontes de nitrogênio, soluções tamponantes e fontes de carbono para as linhagens F88 (*P. chrysosporium*), F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei* QM 9414

Linhagem	Fontes de nitrogênio em g/L		
	(sulfato de amônio/ureia/extrato de levedura)	Solução tamponante (concentração/pH)	Fonte de carbono (1,2%)
F88	1,324/1,382/1,449	citrato (75mM/pH 3,5)	BPT
F811	1,428/1,004/2,738	PIPES (100 mM/pH 6,2)	BPT
<i>T. reesei</i>	1,233/0,944/3,313	citrato (75mM/pH 3,5)	Solka-floc®

Após o cultivo das linhagens nas melhores condições de indução houve a necessidade de concentrar o sobrenadante das culturas para os ensaios de hidrólise. Isso é necessário pois as proteínas presentes no sobrenadante das culturas estão diluídas e para a hidrólise foi preciso fixar a quantidade de proteínas adicionada a cada frasco do ensaio. O método de liofilização foi o escolhido visto que remove a água presente nas amostras sendo amplamente utilizado em processos de purificação de proteínas. Além disso, a liofilização diminui os riscos de contaminação das amostras e a ação de agentes degradadores, podendo os produtos serem armazenados e utilizados em ensaios futuros (MATEJTSCHUK, 2007). Apesar desse processo poder ocasionar perda ou até mesmo de sua funcionalidade das proteínas, mostrou-se necessário para prosseguimento dos experimentos de hidrólise.

2.3.3.1 Liofilização dos secretomas

A liofilização consiste, basicamente, em retirar a água presente nas amostras através da sublimação da água da fase sólida para a gasosa, ocorrendo sob baixas temperaturas e vácuo (MATEJTSCHUK, 2007). Assim, com a utilização dessa técnica foi possível retirar a água presente nos sobrenadantes dos cultivos, concentrar as amostras e armazená-las na forma sólida.

Após o processo, obteve-se 10,84 g de material liofilizado para o isolado F88 (*P. chrysosporium*), 6,97 g para F811 (*A. brasiliensis*) e 5,20 g para o padrão *T. reesei*. A Figura 29 mostra imagens dos materiais liofilizados armazenados em frascos herméticos. É possível visualizar a diferente coloração e aspecto dos produtos obtidos para cada cultivo.

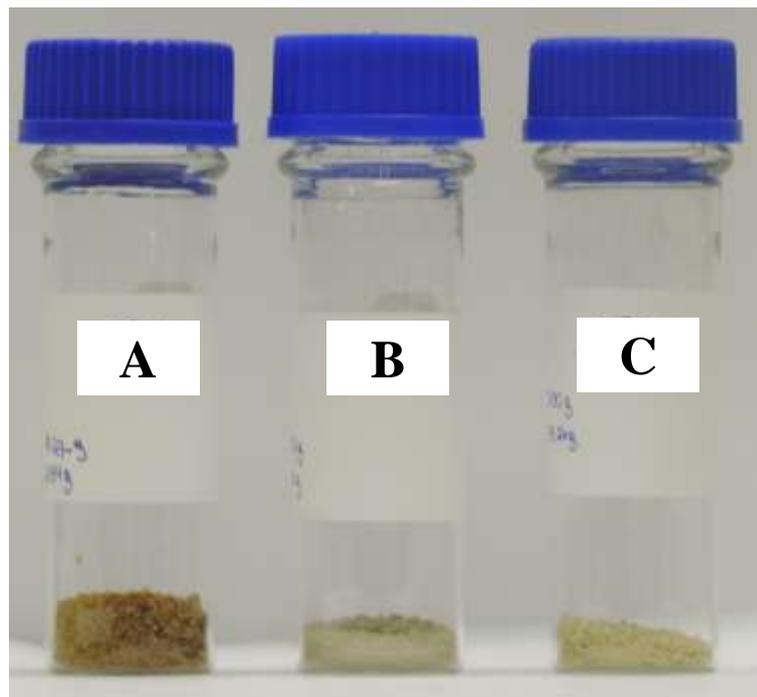


Figura 29 – Frascos contendo os sobrenadantes dos cultivos das linhagens liofilizados. Em A: F88 (*P. chrysosporium*); B: F811 (*A. brasiliensis*) e C: *T. reesei*

2.3.3.2 Caracterização dos secretomas

Os sobrenadantes de cultivos liofilizados foram caracterizados através da quantificação total de proteínas e determinação da atividade enzimática. Para tais experimentos, foram utilizadas soluções a 7 g/L de material liofilizado. Uma vez que o processo de liofilização também concentra os demais componentes do sobrenadante de cultivo, como sais inorgânicos e açúcares, foi necessário submeter as amostras a um processo de dessalinização (*PD-10 Desalting Columns*) antes das quantificações de proteínas totais. Testes prévios realizados em amostras concentradas mostraram que a quantificação de proteínas sem a etapa de dessalinização foram superestimadas.

Já para os ensaios enzimáticos foi utilizada a solução concentrada a 7 g/L sem dessalinização e avaliou-se os potenciais de sacarificação de papel de filtro, celobiose e xilana. A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para os secretomas das linhagens F811 e *T. reesei*. O isolado F88 não foi caracterizado, pois não apresentou níveis detectáveis de proteínas.

Tabela 11 – Caracterização dos materiais liofilizados das linhagens F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei* em solução 7g/L

Parâmetros	F811 (<i>A. brasiliensis</i>)	<i>T. reesei</i>
Proteínas (mg/ml)	0,395±0,011	0,505±0,007
Atividade celulásica (FPU/ml)	0,324±0,001	5,221±0,02
Atividade celobiose (IU/ml)	0,362±0,026	0,004±0,005
Atividade xilanásica (IU/ml)	2,610±0,031	1,333±0,041

Quando os dados de concentração de proteínas são comparados, observa-se que o padrão *T. reesei* apresenta maior quantidade liberada (0,505±0,007 mg/ml), sendo 1.2 vezes em relação ao isolado F811 (0,395±0,011 mg/ml). No entanto, quando às atividades específicas, ou seja, a relação entre a quantidade de proteínas liberadas e as atividades enzimáticas, são confrontadas, há grande diferença entre as linhagens (Figura 30).

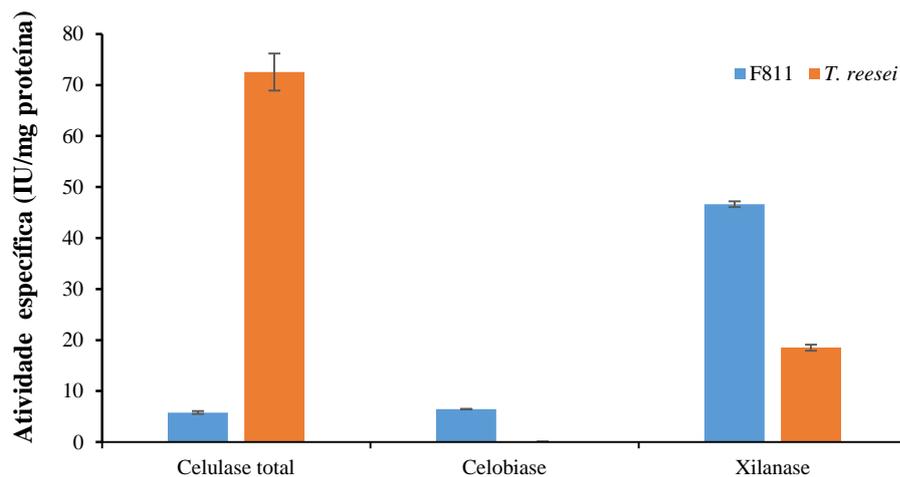


Figura 30 – Atividades enzimáticas específicas entre a relação de proteínas produzidas e as atividades de celulase total, celobiase e xilanase para as linhagens F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei*

Para celulases totais, *T. reesei* demonstrou sua supremacia como produtor dessas enzimas, apresentando índice 16 vezes maior do encontrado no isolado F811. Esse é um fato esperado, já que se trata de uma linhagem hipercelulolítica, onde a grande maioria das enzimas produzidas pertencem ao grupo das endoglicanases (Cel7B e Cel5A) e celobiohidrolases (Cel7A e Cel6A). Sabe-se que as CBHs são as proteínas mais abundantes no secretoma desse fungo em condições de indução, podendo atingir 70 a 80% do total secretado (SEIBOTH; IVANOVA; SEIDL-SEIBOTH, 2011).

No entanto, para os potenciais de sacarificação em celobiose, a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) apresentou valor 90 vezes maior em comparação com *T. reesei*. Assim como os dados mostram a supremacia hipercelulolítica de *T. reesei* também revelam sua deficiência em produzir enzimas capazes de hidrolisar celobiose. Muitos dos coquetéis comerciais utilizados atualmente são suplementados com β -glicosidase provenientes de *Aspergillus* (JUHÁSZ; EGYHÁZI; RÉCZEY, 2005) grupo ao qual pertence a linhagem F811 (*A. brasiliensis*).

Também para xilanases, a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) apresentou maior potencial em sacarificar xilana, sendo 1.5 vezes mais eficiente nesse processo em relação ao *T. reesei*. A produção de xilanases em fungos mesófilos é bem documentada e diversas espécies do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* são descritas como produtoras (POLIZELI et al., 2005). De fato, análises genômicas desses últimos revelam um grande arsenal de genes codificadores para enzimas que podem degradar substratos hemicelulósicos (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

2.3.3.3 Ensaios de hidrólise de biomassa

Os ensaios de hidrólise foram realizados com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BPT) a 15 bar de pressão por oito minutos. Esse material foi lavado com o intuito de retirar possíveis inibidores da ação das enzimas, assim como açúcares residuais do processo. Não foi realizado processo de secagem ou moagem, preservando assim as características da biomassa pré-tratada e também evitando a compactação das fibras. Utilizou-se o preparado comercial Cellic CTec3 (*Novozymes*, Dinamarca) para validação do experimento. Para cada grama, em massa seca, de biomassa pré-tratada foi adicionado 25 mg de proteína.

Através dos ensaios de hidrólise, obtive os perfis de conversão de glicana e xilana, assim como os acúmulos de celobiose e ácido acético durante a reação. Os dados de conversão de glicana e xilana para ambas linhagens apresentaram perfis similares (Figura 31). Em glicana, a taxa chegou a cerca de 25% após 72 horas e, para xilana, 30% após o mesmo tempo reacional. Já o preparado enzimático Cellic CTec3 atingiu níveis de 80% de conversão em glicana e 70% em xilana ao final do processo.

Essa diferença entre os secretomas das linhagens e o preparado comercial era esperada já que o valor de proteínas adicionado a cada ensaio foi fixado em 25 mg de preparado por grama de massa seca de substrato. A utilização da Cellic CTec3 no ensaio de hidrólise teve como finalidade exclusiva a validação do experimento, visto que seu potencial de ação nessa

biomassa é conhecido. Além disso, as enzimas presentes nesse preparado são provenientes de linhagens modificadas geneticamente capazes de excretar grande quantidade de proteínas específicas na degradação da biomassa. Segundo o fabricante, esse preparado é composto por hemicelulases e celulases que permitem uma alta conversão de materiais lignocelulósicos pré-tratados em açúcares fermentáveis.

Quando as linhagens F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei* são comparadas em relação à conversão de glicana, é notável que apesar da linhagem padrão possuir alta atividade específica para celulases (Figura 31 A) os valores de conversão são similares. Esse fato pode ser explicado devido à baixa produção de β -glicosidades em *T. reesei*, ou seja, os produtos gerados pela ação de endoglicanases e exoglicanases não são totalmente hidrolisados a glicose. Na Figura 32 (A) é possível visualizar que a concentração de celobiose para essa linhagem aumenta ao longo da hidrólise do material lignocelulósico, chegando a aproximadamente 6 mg/ml após 72 horas de reação. Já a linhagem F811 (*A. brasiliensis*), a baixa atividade celulolítica total é provavelmente compensada pela alta taxa de β -glicosidades presente em seu secretoma. Assim, os produtos gerados pela ação sinérgica das celulases são prontamente hidrolisados a glicose, não ocorrendo acúmulo de celobiose durante a hidrólise da biomassa.

Também para conversão de xilana (Figura 31 B), os perfis obtidos das linhagens são similares. Esse é um fato interessante, pois a produção de xilanases pelo fungo F811 (*A. brasiliensis*) é maior do que em *T. reesei* (Tabela 11). Isso pode ser explicado pelo fato de que algumas endoglicanases encontradas em *T. reesei* são ativas também em xilana e xilooligosacarídeos (BIELY; VRSANSKÁ; CLAEYSSSENS, 1991). Segundo Vlasenko e colaboradores (2010) há sete famílias dessas enzimas capazes de hidrolisar xilana e arabinoxilana, sendo a atividade de Cel7 de *T. reesei* a mais ativa em ambos substratos.

Assim como para celobiose, a presença de ácido acético durante o processo foi verificado para os três preparados (Figura 32 B). O maior acúmulo ocorreu no ensaio de Cellic CTec3, seguido por *T. reesei* e por último, F811 (*A. brasiliensis*). Ao final da reação, para ambas as linhagens, atingiu-se o nível de aproximadamente 0,30 mg/ml desse ácido. Esse fato pode ser explicado pela ação de enzimas capazes de liberar resíduos de grupos acetil presentes na hemicelulose. Essas enzimas são denominadas acetil xilana esterases (ZHANG et al., 2011). O processo de pré-tratamento por explosão a vapor possibilita a ação de acetil xilana esterases, pois não elimina completamente as hemiceluloses presentes na biomassa.

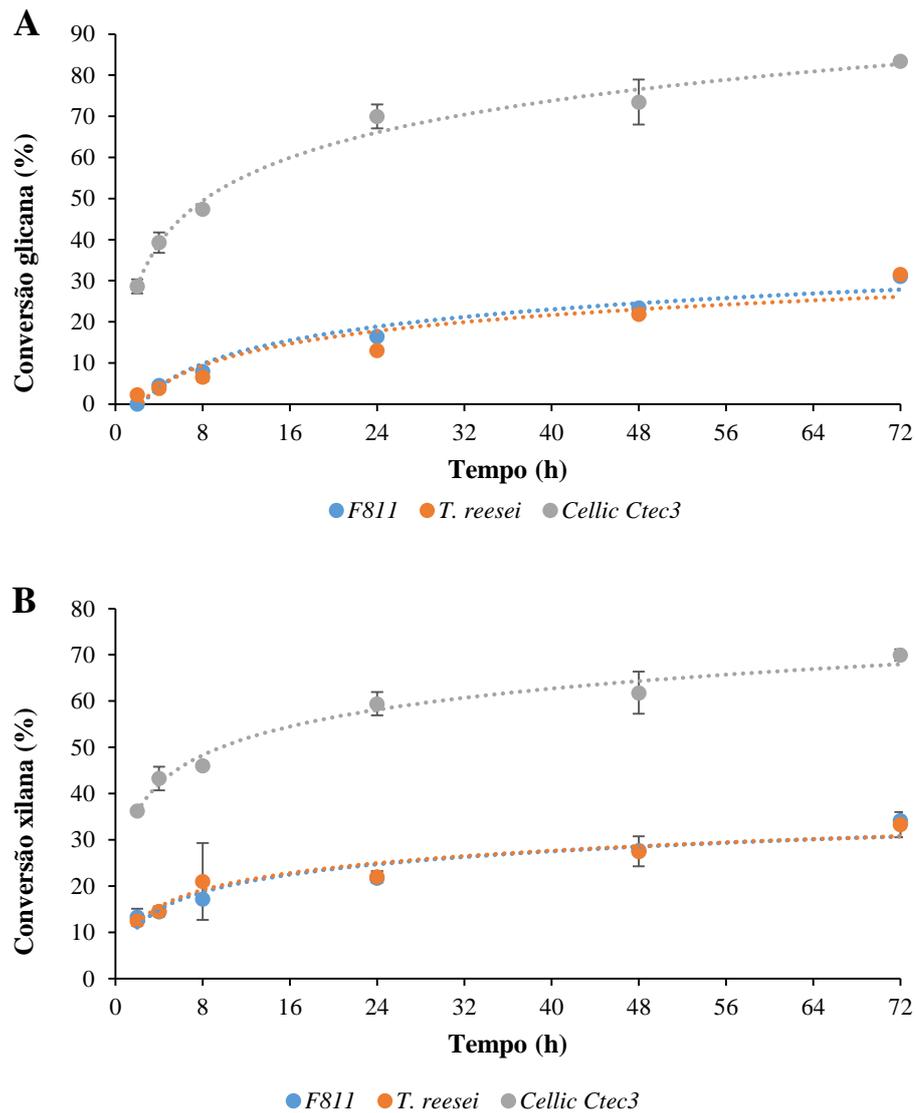


Figura 31 – Perfil de conversão de glicana (A) e xilana (B) em ensaio de hidrólise de bagaço pré-tratado por explosão a vapor utilizando os preparados enzimáticos de F811 (*A. brasiliensis*), *T. reesei* e *Cellic Ctec3*

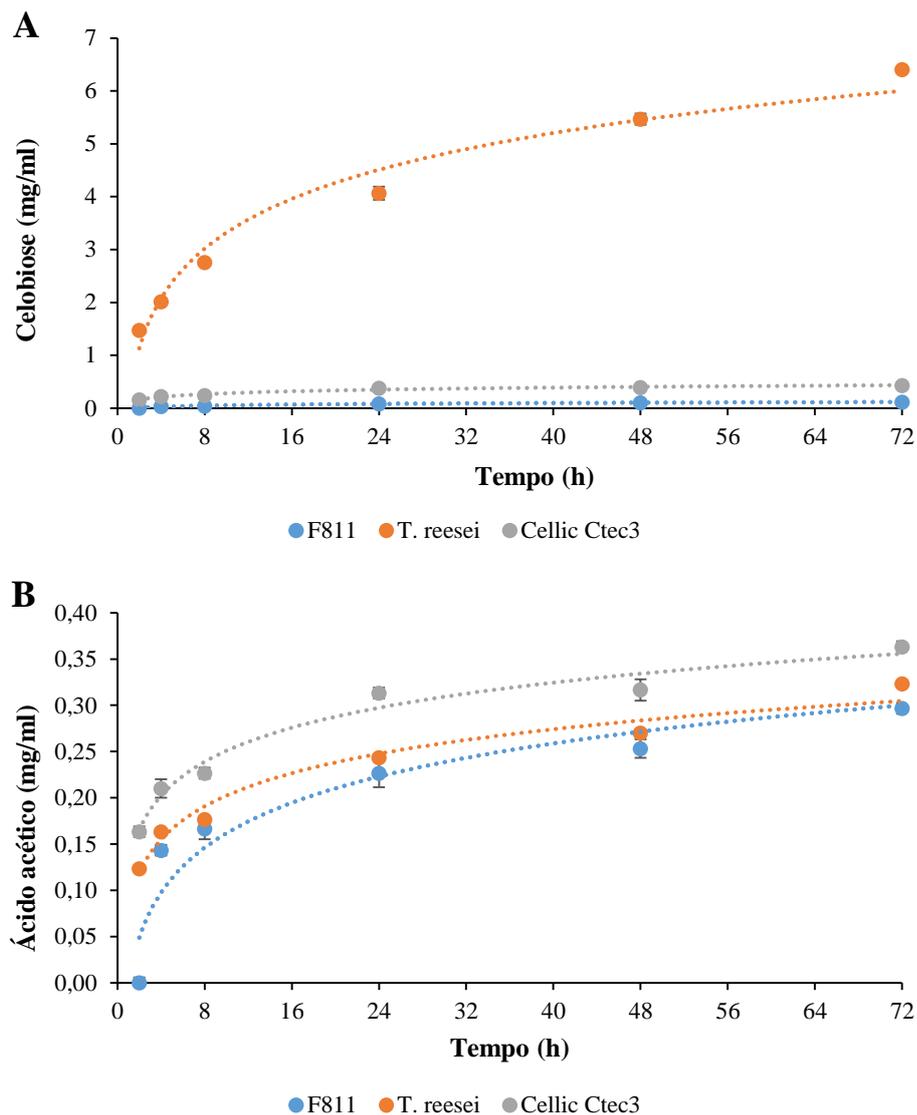


Figura 32 – Perfil de produção de celobiose (A) e ácido acético (B) ao longo do ensaio de hidrólise utilizando os preparados enzimáticos de F811 (*A. brasiliensis*), *T. reesei* e Cellic Ctec3

2.3.3.4 Análise geral dos ensaios de hidrólise

Os ensaios de hidrólise da biomassa utilizando preparados produzidos pelas linhagens F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei* mostram que ambas foram capazes de converter glicana e xilana em níveis similares. Esse fato é interessante, visto que o F811 (*A. brasiliensis*) é uma linhagem selvagem que não sofreu modificações genéticas. Além disso, esse isolado apresentou níveis maiores de produção de xilanases e β -glicosidades em comparação ao *T. reesei*. Esses resultados mostram que essa linhagem apresenta um perfil mais amplo de produção de enzimas hidrolíticas quando induzida no material pré-tratado.

Outro ponto importante para o isolado F811 (*A. brasiliensis*) é o fato de que a fonte de carbono que mais induziu a expressão de celulasas e xilanases foi a biomassa pré-tratada (BPT). O uso do mesmo material para a produção dos preparados enzimáticos e da hidrólise pode ajudar a reduzir os custos do processo de obtenção do etanol 2G (DELABONA et al., 2012b). Além disso, trata-se de um resíduo disponível na indústria sucroenergética, facilitando a possível produção *on-site* dessas enzimas.

Dessa maneira, os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise são indicativos de que a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) é promissora para produção de enzimas que atuam na quebra da biomassa em açúcares simples.

3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

As linhagens cedidas para o trabalho foram identificadas como: *Phanerochaete chrysosporium* (F88), *Trichoderma virens* (F108), *Penicillium citrinum* (F171) e *Aspergillus brasiliensis* (F811).

No *screening* inicial, as linhagens F108 (*T. virens*) e F811 (*A. brasiliensis*) apresentaram os maiores potenciais de sacarificação em papel de filtro. Para xilana, os maiores índices foram alcançados por F811 (*A. brasiliensis*) e F88 (*P. chrysosporium*). A linhagem padrão *Trichoderma reesei* QM9414 apresentou maior potencial de sacarificação em papel de filtro, enquanto *Aspergillus niger* ATCC 10004 se mostrou melhor no ensaio enzimático em xilana.

Segundos os dados da caracterização inicial e identificação molecular, as linhagens F88 (*P. chrysosporium*), F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei* QM9414 foram as selecionadas para os testes de otimização das condições de cultivo.

Para as fontes de nitrogênio, a melhor combinação entre sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura foi de 4:3:3; 5:3:2 e 6:3:1 para F88, F811 e *T. reesei*, respectivamente.

O ácido cítrico foi selecionado como melhor agente tamponante para as linhagens F88 (*P. chrysosporium*) e *T. reesei* QM9414, e para F811 (*A. brasiliensis*) selecionou-se PIPES.

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BPT) foi a melhor fonte de carbono indutora para a produção de celulasas e xilanasas para as linhagens F88 (*P. chrysosporium*) e F811 (*A. brasiliensis*). Já para *T. reesei*, a celulose purificada de Solka-floc[®] foi a responsável pelos maiores índices de indução.

Nas condições de cultivo otimizadas, a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) apresentou maior concentração de proteínas celulares, assim como atividade de β -glicosidases e xilanasas em comparação com *T. reesei*. No entanto, a linhagem padrão demonstrou sua supremacia celulolítica com a maior atividade enzimática em papel de filtro (FPA).

Ambas as linhagens, F811 (*A. brasiliensis*) e *T. reesei*, apresentaram valores de conversão de glicana e xilana muito similares nos ensaios de hidrólise. No entanto, apenas no ensaio de *T. reesei* ocorreu acúmulo de celebiose ao fim da reação.

Estes dados indicam que a linhagem F811 (*A. brasiliensis*) é promissora na produção de enzimas que degradam a biomassa devido a sua alta capacidade hidrolítica. Também as enzimas produzidas por esse fungo poderiam ser utilizadas como alternativas para suprir as deficiências de outros preparados, como o de *T. reesei*.

REFERÊNCIAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 40, n. 3, p. 399–407, 2008.

_____. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 100, n. 23, p. 5979–5987, 2009.

AHMED, S.; BASHIR, A.; SALEEM, H.; SAADIA, M.; JAMIL, A. Production and purification of cellulose- degrading enzymes from a filamentous fungus. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 3, p. 1411–1419, 2009.

ALVIRA, P.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Bioresource technology pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

ATANASOVA, L. Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. In: GUPTA, V.K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA; UPADHYAY, R.S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M.G. **Biotechnology and biology of *Trichoderma***. Oxford: Elsevier, 2014. p. 25–40.

BAILEY, M.J.; TÄHTIHARJU, J. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Gewerbestrasse, v. 62, n. 2/3, p. 156–162, 2003.

BAILEY, M.; BUCHERT, J.; VIKARI, L. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Gewerbestrasse, v. 40, n. 2/3, p. 224-229, Nov. 1993.

BARALDO JUNIOR, A.; BORGES, D.G.; TARDIOLI, P.W.; FARINAS, C.S. Characterization of beta -glucosidase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation and partially purified using MANAE-agarose. **Biotechnology Research International**, Cairo, v. 2014, p. 317092, 2014.

BECKHAM, G.T.; BOMBLE, Y.J.; BAYER, E.A.; HIMMEL, M.E.; CROWLEY, M.F. Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v.22, p. 231-238, 2011.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 36, p. 91–106, 2014.

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; CLAEYSSSENS, M. The endo-1,4-beta-glycanase I from *Trichoderma reesei*. Action on beta-1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 200, n. 1991, p. 157–163, 1991.

BISCHOF, R.; FOURTIS, L.; LIMBECK, A.; GAMAUF, C.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C.P. Comparative analysis of the *Trichoderma reesei* transcriptome during growth on the cellulase inducing substrates wheat straw and lactose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, n. 1, p. 127, Jan. 2013.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic ethanol. In: **FAO Symposium on the Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries**. Rome: Food and Agriculture Organization, 2007, 11 p. Disponível em <http://www.fao.org/biotech/docs/bon.pdf>.

BON, E.P.S.; GÍRIO, F.; PEREIRA, N. Jr. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 253-269.

BORASTON, A.B.; BOLAM, D.N.; GILBERT, H.J.; DAVIES, G.J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **The Biochemical Journal**, London, v. 382, n. 3, p. 769–781, 2004.

BUGG, T.D.H.; AHMAD, M.; HARDIMAN, E.M.; RAHMANPOUR, R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 28, n. 12, p. 1883, 2011.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; DA SILVA, S.S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2012, p. 1-15, 2012.

CHIPETA, Z.A.; DU PREEZ, J.C.; CHRISTOPHER, L. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 35, n. 6, p. 587–594, June 2008.

CHUNDAWAT, S.P.S.; BECKHAM, G.T.; HIMMEL, M.E.; DALE, B.E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, Palo Alto, v. 2, p. 121–145, Jan. 2011.

CRAGG, S.M.; BECKHAM, G.T.; BRUCE, N.C.; BUGG, T.D.H.; DISTEL, D.L.; DUPREE, P.; ETXABE, A.G.; GOODELL, B.S.; JELLISON, J.; MCGEEHAN, J.E.; MCQUEENMASON, S.J.; SCHNORR, K.; WALTON, P.H.; WATTS, J.E.M.; ZIMMER, M. Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life. **Current Opinion in Chemical Biology**, Amsterdam, v. 29, p. 108–119, 2015.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, Sidney, v. 5, n. 6, p. 578–595, 2009.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K.T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 30, n. 4, p. 1–8, 2010.

DE OLIVEIRA BUANAFINA, M.M.; COSGROVE, D.J. Cell walls: structure and biogenesis. In: MOORE, P.H.; BOTHA, F.C. **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology**. Chichester: John Wiley, 2013. p. 307–329.

DE PAULA SILVEIRA, F.Q.; SOUZA, M.V.; RICART, C.A.; MILAGRES, A.M.; MEDEIROS, C.L.; FILHO, E.X. A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 23, n. 1, p. 682–685, July 1999.

DE SOUZA, W.R.; DE GOUVEA, P.F.; SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; BERNARDES, L.A.S.; GOLDMAN, M.H.S.; DE VRIES, R.P.; OLIVEIRA, J.V.C.; GOLDMAN, G.H. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 1, p. 40, 2011.

DELABONA, P.D.S.; FARINAS, C.S.; LIMA, D.J.S.; PRADELLA, J.G.C. Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 132, p. 401–405, 2013.

DELABONA, P.D.S.; FARINAS, C.S.; DA 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**, Amsterdam, v. 107, p. 517–521, 2012a.

DELABONA, P.D.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 37, p. 243–250, 2012b.

DODD, D.; CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, Malden, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2010.

DOHERTY, W.O.S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 259–276, 2011.

DOI, R.H.; KOSUGI, A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 2, n. 7, p. 541–551, 2004.

DOMINGUES, F.C.; QUEIROZ, J.A.; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, L.P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 26, n. 5/6, p. 394–401, 2000.

DONG, X.Q.; YANG, J.S.; ZHU, N.; WANG, E.T.; YUAN, H.I. Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 131, p. 443–451, 2013.

DOS REIS, L.; FONTANA, R.C.; DELABONA, P.S.; LIMA, D.J.S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J.G.C.; DILLON, A.J.P. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 146, p. 597–603, 2013.

DOS SANTOS CASTRO, L.; PEDERSOLI, W.R.; ANTONIÊTO, A.C.; STEINDORFF, A.S.; SILVA-ROCHA, R.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; ROSSI, A.; BROWN, N.A.; GOLDMAN, G.H.; FAÇA, V.M.; PERSINOTI, G.F.; SILVA, R.N. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 7, n. 1, p. 41, Jan. 2014.

FANG, X.; YANO, S.; INOUE, H.; SAWAYAMA, S. Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 115–120, 2008.

FERREIRA, S.M.P.; DUARTE, A.P.; QUEIROZ, J.A.; DOMINGUES, F.C. Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 12, n. 3, p. 1-9, 2009.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Gewerbestrasse, v. 59, n. 6, p. 618–628, Sept. 2002.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Malden, n.2, p. 113-118, 1993.

GAUTAM, S.P.; BUNDELA, P.S.; PANDEY, A.K.; JAMALUDDIN; AWASTHI, M.K.; SARSAIYA, S. Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. **International Journal of Environmental Science**, New Delhi, v. 1, n. 4, p. 656–665, 2010.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, London, v. 59, n. 5, p. 695–702, 1987.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, New York, v. 315, n. 5813, p. 808–810, 2007.

_____. The role of biomass in the world's energy system. In: BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. (Ed.). **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer, 2011. p. 3–14.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J-F.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K.S. Deconstructing plant biomass: focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. **Plant Science**, Amsterdam, v. 234, p. 180–193, 2015.

GUPTA, V.K.; GAUR, R.; YADAVA, S.K.; DARMWAL, N.S. Optimization of xylanase production from free and immobilized cells of *Fusarium solani* F7. **BioResources**, Raleigh, v. 4, n. 3, p. 932–945, 2009.

- GUSAKOV, A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 29, n. 9, p. 419–425, 2011.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 549–556, 2006.
- HAMMAN, O. ben; RUBIA, T.D. Ia; MARTINEZ, J. Effect of carbon and nitrogen limitation on lignin peroxidase and manganese peroxidase production. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, p. 751–757, 1997.
- HANSEN, G.H.; LÜBECK, M.J.C.; LÜBECK, P.S. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.
- HARRIS, P.V.; XU, F.; KREEL, N.E.; KANG, C.; FUKUYAMA, S. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. **Current Opinion in Chemical Biology**, Amsterdam, v. 19, p. 162–170, 2014.
- HIMMEL, M.E.; DING, S-Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, New York, v. 315, n. 804, p. 804–807, Feb. 2007.
- HIMMEL, M.E.; XU, Q.; LUO, Y.; DING, S-Y.; LAMED, R.; BAYER, E.A. Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. **Biofuels**, London, v. 1, n. 2, p. 323–341, 2010.
- IKEDA, Y.; HAYASHI, H.; NAOYUKI, O.; PARK, E.Y. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Biotechnology Progress**, Malden, v. 23, n. 2, p. 333–338, 2007.
- IKRAM-UL-HAQ; KHURSHID, S.; ALI, S.; ASHRAF, H.; QADEER, M.A.; RAJOKA, M.I. Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 17, n. 1, p. 35–37, 2001.
- JP MORGAN. The complete guide to the brazilian ethanol industry. New York: JPMorgan Chase, 2015. (Ethanol, 101).
- JUHÁSZ, T.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Beta-glucosidase production by *Trichoderma reesei*. **Applied biochemistry and biotechnology**, Heidelberg, v. 121/124, p. 243–254, 2005.
- JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; SZIJÁRTÓ, N.; RÉCZEY, K. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Heidelberg, v. 211, n. 11, p. 113–116, 2004.
- KADAM, K.L.; KEUTZER, W.J. Enhancement in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30 due to citric acid. **Biotechnology Letters**, Heidelberg, v. 17, n. 10, p. 1111–1114, 1995.

KEYSER, P.; KIRK, T.K.; ZEIKUS, J.G. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 135, n. 3, p. 790–797, 1978.

KHALIL, A.I. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 18, n. 8, p. 753–759, 2002.

KUBICEK, C.P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 2, n. 1, p. 19, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 35, n. 5, p. 377–391, 2008.

LOMBARD, V.; RAMULU, H.G.; DRULA, E.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.

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**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 38–44, 2013.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 73, n. 2, p. 269–278, 1957.

_____. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 79, p. 816–826, 1960.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, Washington, v. 95, p. 391–413, 1969.

MARTINEZ, D.; LARRONDO, L.F.; PUTMAN, N.; GELPKE, M.D.S.; HUANG, K.; CHAPMAN, J.; HELFENBEIN, K.G.; RAMAIYA, P.; DETTER, J.C.; LARIMER, F.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; BERKA, R.; CULLEN, D.; ROKHSAR, D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature Biotechnology**, London, v. 22, n. 6, p. 695–700, 2004.

MATEJTSCHUK, P. Lyophilization of proteins. In: DAY, J.G.; STACEY, G.N. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Totowa: Humana Press, 2007. p. 59–72.

MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Amsterdam, v. 78, p. 24–33, Mar. 2013.

MEYER, V.; FIEDLER, M.; NITSCHKE, B.; KING, R. The cell factory *Aspergillus* enters the big data era: opportunities and challenges for optimising product formation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Heidelberg, v. 149, p. 91–132, Jan. 2015.

MILAGRES, A.M.F.; LACIS, L.S.; PRADE, R.A. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 248–253, 1993.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 1119–1127, July 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Adoção do acordo Paris**. Nova Iorque, 2015. v. 4, 42 p.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 81–84, Mar. 2003.

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

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Malden, v. 54, n. 4, p. 559–568, May 2008.

PAYNE, C.M.; KNOTT, B.C.; MAYES, H.B.; HANSSON, H.; HIMEEL, M.E.; SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; BECKHAM, G.T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

PEREIRA RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

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

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Gewerbestrasse, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PUSHALKAR, S.; RAO, K.K.; MENON, K. Production of α -glucosidase by *Aspergillus terreus*. **Current Microbiology**, Gewerbestrasse, v. 30, n. 5, p. 255–258, May 1995.

RASS-HANSEN, J.; FALSIG, H.; JØRGENSEN, B.; CHRISTENSEN, C.H. Bioethanol: fuel or feedstock. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Malden, v. 82, p. 329–333, May 2007.

ROBERT, V.; VU, D.; AMOR, A.B.H.; VAN DE WIELE, N.; BROUWER, C.; JABAS, B.; SZOKE, S.; AHMED, D.; TRIKI, M.; DAOUD, S.B.; CHOUCHE, O.; VAAS, L.; DE COCK, A.; STALPERS, J.A.; STALPERS, D.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, M.; DOS SANTOS, F.B.; STEGEHUIS, G.; LI, W.; WU, L.; ZHANG, R.; MA, J.; ZHOU, M.; GORJÓN, S.P.; EURWILAICHITR, L.; INGSRISWANG, S.; HANSEN, K.; SCHOCH, C.; ROBBERTSE, B.; IRINYI, L.; MEYER, W.; CARDINALI, G.; HAWKSWORTH, D.L.; TAYLOR, J.W.; CROUS, P. W. MycoBank gearing up for new horizons. **IMA Fungus**, Surrey, v. 4, n. 2, p. 371–379, 2013.

ROCHA, V.A.L.; MAEDA, R.N.; SANTA ANNA, L.M.M.; PEREIRA JUNIOR, N. Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 16, n. 5, p. 1–13, 2013.

RUIZ, D.M.; TUROWSKI, V.R.; MURAKAMI, M.T. Effects of the linker region on the structure and function of modular GH5 cellulases. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 28504, p. 1–13, 2016.

SALOHEIMO, M.; PALOHEIMO, M.; HAKOLA, S.; PERE, J.; SWANSON, B.; NYSSÖNEN, E.; BHATIA, A.; WARD, M.; PENTTILÄ, M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 269, n. 17, p. 4202–4211, Sept. 2002.

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

SEIBOTH, B.; IVANOVA, C.; SEIDL-SEIBOTH, V. *Trichoderma reesei*: a fungal enzyme producer for cellulosic biofuels, biofuel production-recent developments and prospects. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, n. 1, p. 127, 2011.

SILVEIRA, M.H.L.; SIIKA-AHO, M.; KRAUUS, K.; GARRIGA, L.M.; RAMOS, L.P. The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: current status and future challenges. In: DA SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K. (Ed.). **Biofuels in Brazil**. Gewerbestrasse: Springer International, 2014. p. 151–172.

SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Gewerbestrasse, v. 81, n. 3, p. 399–417, 2008.

SINHA, B.K.; MANDAL, N.K.; MANISHA, P.; DAS, P. Mixture models and mixture designs: scope of the monograph. In: SINHA, B.K.; MANDAL, N.K.; MANISHA, P.; DAS, P. (Ed.). **Optimal mixture experiments**. New Delhi: Springer India, 2014. p. 1–7.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**, Golden, v. 2011, p. 1–15, June 2011.

SMITH, D.C.; WOOD, T.M. Xylanase production by *Aspergillus awamori*: development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and beta-xylosidase while maintaining low protease production. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 38, n. 8, p. 883–90, Oct. 1991.

SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 22, n. 1, p. 53–78, 2006.

_____. Biofuels. **Current Biology**, Maryland Heights, v. 17, n. 4, p. R115–R119, 2007.

SØRENSEN, A.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P.S.; AHRING, B.K. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, Basel, v. 3, n. 3, p. 612–631, 2013.

STERNBERG, D.; MANDELS, G.R. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 139, n. 3, p. 761–769, 1979.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 199, p. 49–58, 2016.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, p. 1621–1651, 2008.

TERRASAN, C.R.F.; TEMER, B.; DUARTE, M.C.; CARMONA, E.C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 11, p. 4139–4443, 2010.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção de etanol no Brasil durante a safra 2014/2015**. São Paulo, 2015.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R.P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Gewerbestrasse, v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 2011.

VLASENKO, E.; SCHÜLEIN, M.; CHERRY, J.; XU, F. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglycanases. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 7, p. 2405–2411, 2010.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed). **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990, p. 315–322.

XIONG, H.; VON WEYMARN, N.; TURUNEN, O.; LEISOLA, M.; PASTINEN, O. Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 96, n. 7, p. 753–759, May 2005.

XU, Z.; HUANG, F. Pretreatment methods for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Heidelberg, v. 174, p. 43–62, Jan. 2014.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.-Y.; WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, London, v. 2, n. 4, p. 421–450, 2011.

ZAHMATKESH, M.; TABANDEH, F.; EBRAHIMI, S. Biodegradation of reactive orange 16 by phanerochaete *Chrysosporium fungus*: application in a fluidized bed bioreactor. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, London, v. 7, n. 5, p. 385–390, 2010.

ZAHOOR, S.; JAVED, M.M.; AFTAB, S.; LATIF, F.; UL-HAQ, I. Metabolic engineering and thermodynamic characterization of an extracellular β -glucosidase produced by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v. 10, n. 41, p. 8107–8116, 2011.

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; VIIKARI, L. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 1, p. 60, 2011.

ZHANG, P.Y.-H.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 452–481, 2006.

ANEXO

Anexo A

Sequência de nucleotídeos obtidos através do sequenciamento da região ITS dos isolados:

F88

AACTGAACAGGTTGTAGCTGGCCTCTCGGGGCATGTGCACGCCTGGCTCATCCAC
TCTTCAACCTCTGTGCACTTGTGTAGGTCGGTAGAAGAGCGAGCATCCTCTGAT
GCTTTGCTTGGAAGCCTTCCTATGTTTTACTACAAACGCTTCAGTTTAAGAATGTC
TACCTGCGTATAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCCTGGTATTCCGGGGAGCATG
CCTGTTTGAGTGTCATGGTATCCTCAACCTTCATAACTTTTTGTTATCGAAGGCTT
GGACTTGGAGGTTGTGCTGGCTTCTAGTCGAGTCGGCTCCTCTTAAATGTATTAGC
GTGAGTGTAACGGATCGCTTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTTCGTGAAGT
AACATAAGCTTGCGCTTCTAACCGTCCTTCAGT

F108

TGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCGTTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCCG
CCGGAGGACCAACCAAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTACTATCT
GAGCCATCTCGGCGCCCCTCGTGGGCGTTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC
AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCG
GGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGG
CGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGC
GGCGGTCCACAGCCGTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCA
GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

F171

CCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCC
CCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAARAACSCAGCGAAATGCRAW
AACTARKGKGAATTGCARAATTCAGKGAATCATCTCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAA

GCCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCCCCGCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGG
CAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTA
GTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCCAACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTT

F811

CATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCT
GTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCTTGTTCGGCCGCCGGGGGGGGCGCCTCTGCCCCC
GGGCCCGTGCCCCGCCGAGACCCCAACACGAACCCTGTCTGAAAGCGTGCAGTCT
GAGTCGATTGTTTGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGC
CTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCC
CTCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTC
GAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGT
TTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACT
T