



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

MÁRCIA JOSEFA DA SILVA

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS POR
***Trichoderma reesei* RUT C-30 EM MEIOS COM DIFERENTES CAPACIDADES DE**
INDUÇÃO

RECIFE
2014

MÁRCIA JOSEFA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS POR
Trichoderma reesei RUT C-30 EM MEIOS COM DIFERENTES CAPACIDADES DE
INDUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Maria Souto-Maior

Co-orientadora:
Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

**RECIFE
2014**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Márcia Josefa da

Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução / Márcia Josefa da Silva. – Recife: O Autor, 2014.

75 f.: il., fig., tab.

Orientadores: Ana Maria Souto-Maior, Márcia Vanusa da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2014.
Inclui bibliografia e apêndices

1. Enzimas 2. Enzimas de fungos I. Souto-Maior, Ana Maria (orient.) II. Silva, Márcia Vanusa da (coorient.) III. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-116

MÁRCIA JOSEFA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS POR
Trichoderma reesei RUT C-30 EM MEIOS COM DIFERENTES CAPACIDADES DE
INDUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Souto-Maior
Departamento de Antibióticos /UFPE

Prof^a. Dr^a. Gorete Ribeiro de Macedo
Departamento de Engenharia Química /UFRN

Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima
Departamento de Antibióticos /UFPE

Recife, 28 de Fevereiro de 2014.

*Aos meus pais Manuel e Maria. As
minhas irmãs Marcela e Marcilene. Ao
meu marido Roberto,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Para alcançar nossos sonhos, e assim chegarmos à vitória, é preciso enfrentar grandes obstáculos, mas quando temos por perto pessoas especiais que ajudam a tornar possíveis esses sonhos, os desafios se tornam apenas pequenas barreiras.

A Deus, por ser minha estrela guia, meu porto seguro, estando sempre presente em minha vida, me proporcionando o dom da sabedoria para fazer as escolhas certas e guiando meu caminho sempre com muito amor e muitas bênçãos.

Aos meus pais, Manuel e Maria, pelo amor, confiança, apoio e muita força nas horas em que o desânimo ou o cansaço apareceram. Sempre incentivando a dar mais um passo e nunca desistir. **Amo vocês!**

Em especial, ao meu marido Roberto, pelo amor, paciência e companheirismo. Pelo incondicional incentivo durante os longos dias de estudo para fazer a seleção para o mestrado. Pelas tantas horas de espera nas noites em que me fazia companhia até coletar a última amostra do dia, às nove horas da noite. E por tantas outras coisas, toda a minha gratidão. **RO TE AMO!!!**

À professora Ana Maria Souto-Maior, pelas orientações, competência, sabedoria, confiança e apoio em todos os momentos durante o desenvolvimento deste trabalho. **Muito Obrigada!**

À professora Márcia Vanusa da Silva, pela co-orientação e colaboração que foram necessários para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, Cynthia, Thiago, Jéssica e Nina, pelos conhecimentos passados e pela ajuda prestada durante as fermentações e análises cromatográficas. Pela agradável convivência, pela amizade e pelos bons momentos de descontração.

À Túlio Diego e Carolina Malafaia, que entre tantas coisas pra fazer de suas teses, disponibilizaram um pouco de tempo para me ensinar as etapas necessárias para a realização da proteômica. Vocês foram essenciais para esta etapa da dissertação.

Aos muitos amigos que fiz durante o mestrado em Biotecnologia Industrial, Mariana, Rafaela, Milka, Graciely, Livia, Raquel, Ednaldo, Temístocles e Bruno, pelos momentos de muitas alegrias, de companheirismo e troca de conhecimentos. Pelas horas de estudo no quarto andar durante e após as disciplinas, e mesmo quando estávamos escrevendo as dissertações. E aos muitos encontros divertidos da turma. ***Muito sucesso pra vocês!***

Aos amigos, Almerinda, Priscila, Juliana e Vinícius, que passaram pelo mestrado em Biotecnologia, mas hoje estão em outras pós, pelos momentos divertidos que passamos juntos. ***Muito sucesso!***

Aos Departamentos de Antibióticos e de Bioquímica, especialmente ao Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Biologia Molecular, respectivamente, pela infra-estrutura fornecida para o desenvolvimento dessa dissertação.

A CAPES pelo suporte financeiro.

E a todas as pessoas que durante este tempo foram envolvidas, direta ou indiretamente, na realização deste projeto, portanto, recebam desde já a minha sincera gratidão.

*“Renda-se, como eu me rendi.
Mergulhe no que você não
conhece como eu mergulhei. Não
se preocupe em entender, viver
ultrapassa qualquer
entendimento.”*

Clarice Lispector.

RESUMO

A biomassa lignocelulósica destaca-se como matéria-prima alternativa para a produção de combustíveis e outros produtos. Devido à alta complexidade desse material, é necessária uma hidrólise enzimática eficiente com a utilização de um pool enzimático adequado. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil de produção de enzimas celulolíticas e xilanolítica por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução. A produção de enzimas foi realizada em biorreator de bancada (Bioflo 110) com 1,3 ou 3 L de volume de trabalho, nas seguintes condições: 500 rpm, 28° C, 2 vvm e pH 5,0. As fontes de carbono investigadas foram: lactose, xilana, pectina, celulose microcristalina, melão, biomassa de palma forrageira e hidrolisado hemicelulósico. O hidrolisado foi obtido por tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em reator descontínuo de 20 L (Regmed AU/20), com volume de trabalho de 10 L e carga de sólidos de 5% (m/v), a 185°C, por 16 minutos. Em substratos solúveis, a determinação da concentração celular foi realizada por peso seco e as concentrações dos substratos foram obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência. Ao final dos cultivos, foram isoladas proteínas extracelulares, que servirão para futura análise do secretoma de *T. reesei* RUT C-30. Em meio de lactose, os valores de atividades enzimáticas obtidos com 54 horas de cultivo foram: FPase (1,43 UI mL⁻¹), CMCCase (15,67 UI mL⁻¹), xilanase (11,91 UI mL⁻¹) e β-glicosidase (0,24 UI mL⁻¹). A velocidade máxima específica de crescimento, μ_{\max} , e o coeficiente de rendimento de biomassa no substrato, $Y_{x/s}$, foram 0,06 h⁻¹ e 0,38 g g⁻¹, respectivamente. Em meio de melão, μ_{\max} e $Y_{x/s}$ foram 0,26 h⁻¹ e 0,52 g g⁻¹, respectivamente, e as atividades enzimáticas insignificantes. No hidrolisado, o crescimento do micro-organismo foi inibido devido à presença de compostos inibidores produzidos no tratamento hidrotérmico. Os valores de atividades enzimáticas com 54 horas foram: FPase (0,06 UI mL⁻¹), CMCCase (0,24 UI mL⁻¹), xilanase (1,40 UI mL⁻¹) e β-glicosidase nula. Em meio com celulose, também foram obtidos baixos valores de atividades enzimáticas, porém, a xilanase apresentou valor de 1,52 UI mL⁻¹ com 50 horas de cultivo. A xilanase foi a enzima mais evidente nos cultivos com xilana, atingindo valor máximo de 11,93 UI mL⁻¹, ao final do cultivo. Em meio com pectina: FPase, CMCCase, xilanase e β-glicosidase foram: 0,01 UI mL⁻¹, 1,25 UI mL⁻¹, 2,83 UI mL⁻¹ e 0,10 UI mL⁻¹, respectivamente. Nos cultivos em meio à base de palma, observaram-se os seguintes valores com 50 horas: FPase (0,29 UI mL⁻¹), CMCCase (3,30 UI mL⁻¹), xilanase (6,21 UI mL⁻¹) e β-glicosidase (0,09 UI mL⁻¹). Entre as fontes investigadas, a lactose é o melhor substrato para a indução de todas as enzimas estudadas, enquanto o melão favorece o crescimento rápido do micro-organismo. O hidrolisado hemicelulósico e a palma forrageira são potenciais meios para a produção de enzimas, em particular xilanases. Para a utilização do hidrolisado, no entanto, será necessária a sua detoxificação ou, alternativamente, a obtenção de linhagens resistentes aos inibidores por engenharia metabólica e/ou engenharia evolutiva.

Palavras-chave: Biorrefinaria; Celulases; Hemicelulases; *Trichoderma reesei*.

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass stands out as an alternative raw material for the production of fuels and other products. Due to the high complexity of this material, efficient enzymatic hydrolysis is required with the use of a suitable enzyme pool. The aim of this work was to study the production profile of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Trichoderma reesei* RUT C-30 in cultivation media with different capacities of induction. Enzyme production was performed in a bench bioreactor (Bioflo 110) with 1.3 or 3 L working-volume under the following conditions: 500 rpm, 28 °C, 2 vvm and pH 5.0. The carbon sources investigated were: lactose, xylan, pectin, microcrystalline cellulose, molasses, paddle cactus biomass and hemicellulose hydrolyzate. The hydrolyzate was obtained by hydrothermal treatment of sugarcane bagasse in a 20 L batch reactor (Regmed AU/20), with working-volume of 10 L and solids loading of 5% (w/v), at 185°C for 16 minutes. For soluble substrates, cell concentration was determined as dry-weight, and substrate concentration was obtained by high performance liquid chromatography. At the end of the cultivations, extracellular proteins were isolated for future analysis of the secretome of *T. reesei* RUT C-30. In lactose medium, enzymatic activities obtained with 54 hours of cultivation were: FPase (1.43 IU mL⁻¹), CMCCase (15.67 IU mL⁻¹), xylanase (11.91 IU mL⁻¹), and β-glucosidase (0.24 IU mL⁻¹). The maximum specific growth rate, μ_{\max} , and the biomass yield coefficient on the substrate, $Y_{x/s}$, were 0.06 h⁻¹ and 0.38 g g⁻¹, respectively. In molasses medium, μ_{\max} and $Y_{x/s}$ were 0.26 h⁻¹ and 0.52 g g⁻¹, respectively, and enzymatic activities negligible. In hemicellulosic hydrolyzate, the growth of the microorganism was inhibited by the presence of inhibitory compounds produced during the hydrothermal treatment. Values for enzyme activities at 54 hours were: FPase (0.06 IU mL⁻¹), CMCCase (0.24 IU mL⁻¹), xylanase (1.40 IU mL⁻¹) and β-glucosidase null. In cellulose medium, low levels of enzyme activities were obtained, but xylanase showed a value of 1.52 IU mL⁻¹ at 50 hours of cultivation. Xylanase activity was most evident in cultivation with xylan, reaching a maximum value of 11.93 IU mL⁻¹ at the end of the cultivation. In medium with pectin: FPase, CMCCase, xylanase and β-glucosidase were 0.01 IU mL⁻¹, 1.25 IU mL⁻¹, 2.83 IU mL⁻¹, and 0.10 IU mL⁻¹, respectively. In medium based on paddle cactus biomass, the following values were observed at 50 hours: FPase (0.29 IU mL⁻¹), CMCCase (3.30 IU mL⁻¹), xylanase (6.21 IU mL⁻¹) and β-glucosidase (0.09 IU mL⁻¹). Among the investigated sources, lactose is the best substrate for the induction of all enzymes studied and molasses favors a rapid growth of the microorganism. Hemicellulose hydrolyzate and paddle cactus biomass are potential media for producing enzymes, in particular xylanases. For using the hydrolyzate, however, it will be necessary to detoxify the medium, or, alternatively, construct inhibitors resistant strains by metabolic engineering and/or evolutionary engineering.

Key-words: Biorefinery; Cellulases; Hemicellulases; *Trichoderma reesei*.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Biorrefinarias.....	4
3.1.1 Biorrefinaria de material lignocelulósico.....	4
3.2 Composição da lignocelulose.....	6
3.3 Enzimas Celulolíticas.....	9
3.3.1 Celulases.....	9
3.3.2 Hemicelulases.....	11
3.4 Micro-organismos Produtores de Celulases.....	12
3.4.1 Micro-organismos anaeróbicos.....	13
3.4.2 Micro-organismos aeróbicos.....	14
3.4.2.1 <i>Bactérias</i>	14
3.4.2.2 <i>Fungos</i>	15
3.5 Regulação da Expressão de Celulases e Hemicelulases em <i>Trichoderma reesei</i>	19
3.6 Indução pela Lactose em <i>Trichoderma reesei</i>	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Micro-organismo.....	27

4.2	Meios de Cultivo.....	28
4.3	Procedimento Experimental.....	28
4.3.1	Obtenção do hidrolisado hemicelulósico.....	29
4.3.2	Produção de enzimas.....	30
4.3.3	Secretoma.....	31
4.4	Métodos Analíticos.....	32
4.4.1	Determinação da concentração de biomassa.....	32
4.4.2	Determinação das atividades enzimáticas.....	32
4.4.2.1	<i>Atividade em papel de filtro</i>	32
4.4.2.2	<i>Atividade em carboxmetilcelulose</i>	35
4.4.2.3	<i>Atividade em β-glicosidade</i>	35
4.4.2.4	<i>Atividade em xilanase</i>	36
4.4.3	Determinação da concentração de açúcares.....	37
4.4.4	Isolamento de proteínas extracelulares.....	38
4.4.4.1	<i>Quantificação das proteínas</i>	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Produção de Celulases e Hemicelulases por <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em Meios Industriais.....	40
5.1.1	Cultivo de <i>T. reesei</i> RUT C-30 em lactose.....	40
5.1.2	Cultivo de <i>T. reesei</i> RUT C-30 em melão de cana-de-açúcar.....	43
5.1.3	Cultivo de <i>T. reesei</i> RUT C-30 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	46
5.2	Produção de Celulases e Hemicelulases por <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em Polissacarídeos Constituintes de Biomassa.....	49
5.2.1	Meio a base de Celulose Microcristalina.....	49
5.2.2	Meio a base de Xilana Comercial.....	51
5.2.3	Meio a base de Pectina Comercial.....	52
5.2.4	Meio a base de Palma Forrageira.....	53

5.3	Isolamento de Proteínas Extracelulares.....	55
6	CONCLUSÕES.....	56
7	PERSPECTIVAS.....	57
8	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE A- Produção de Celulases e Hemicelulases por <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em meios industriais.....	71
	APÊNDICE B- Produção de Celulases e Hemicelulases por <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em polissacarídeos constituintes de biomassas.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Organização estrutural da parede celular vegetal.....	6
Figura 3.2	Estrutura química da celulose destacando o dímero de celobiose.....	7
Figura 3.3	Organização das fibras celulósica.....	8
Figura 3.4	Esquema da estrutura básica de hemicelulose.....	8
Figura 3.5	Unidades fenilpropano precursoras da lignina.....	9
Figura 3.6	Representação esquemática da atuação sinérgica das enzimas celulolíticas nas regiões amorfa e cristalina da celulose.....	11
Figura 3.7	Representação esquemática do papel central do Xyr1 no sistema enzimático hidrolítico de <i>T. reesei</i> durante a degradação da xilana e celulose.....	21
Figura 3.8	Formas de assimilação da lactose.....	23
Figura 3.9	Principais vias do catabolismo da D-galactose.....	24
Figura 4.1	Cultura de <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em meio de manutenção PDA.....	27
Figura 4.2	Reator descontínuo (REGMED, AU/E-20) utilizado para obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de- açúcar.....	29
Figura 4.3	Fluxograma com as etapas do tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção do hidrolisado hemicelulósico.....	29
Figura 4.4	Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110) utilizado na produção de enzimas.....	30
Figura 4.5	Mesa agitadora rotativa (New Brunswick Scientific, modelo C25KC) utilizada no cultivo dos inóculos.....	31
Figura 4.6	Banho termostático utilizado nos ensaios de atividade enzimática (TECNAL, TE-2005).....	33
Figura 4.7	Espectrofotômetro utilizado nos ensaios de atividade enzimática (Hewlett-Packard, modelo 8453).....	33
Figura 4.8	HPLC para determinação das concentrações dos açúcares presentes nos meios de cultivo (Agilent Technologies, série 1100).....	37
Figura 4.9	Centrífuga refrigerada (Rotina 420R Hettich Zentrifugan, Analítica).....	38

Figura 5.1	Cinética de crescimento e consumo do substrato durante cultivo de <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio de lactose.....	41
Figura 5.2	Crescimento de <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 durante a fase exponencial em meio de lactose.....	41
Figura 5.3	Perfil de produção de enzimas durante o cultivo de <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio de lactose.....	42
Figura 5.4	Cinética de crescimento e consumo de substrato durante cultivo de <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio de melação de cana-de-açúcar.....	44
Figura 5.5	Crescimento de <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 durante a fase exponencial em meio de melação de cana-de-açúcar.....	45
Figura 5.6	Perfil de produção de enzimas durante o cultivo de <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio de melação de cana-de-açúcar.....	45
Figura 5.7	Consumo do substrato durante o cultivo de <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio à base de hidrolisado hemicelulósico.....	47
Figura 5.8	Perfil de produção de enzimas em meio à base de hidrolisado hemicelulósico.....	49
Figura 5.9	Perfil de produção de enzimas e crescimento do <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio à base de celulose.....	50
Figura 5.10	Perfil de produção de enzimas e crescimento do <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio à base de xilana.....	51
Figura 5.11	Perfil de produção de enzimas e crescimento do <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio à base de pectina.....	52
Figura 5.12	Perfil de produção de enzimas e crescimento do <i>T. reesei</i> RUT C-30 em meio à base de palma.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Composição do meio PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>).....	27
Tabela 4.2	Composição do meio de cultivo.....	28
Tabela 5.1	Composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.....	47
Tabela 5.2	Concentração das proteínas extracelulares ao final dos cultivos.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE I	Fator de transcrição repressor
ACE II	Fator de transcrição regulador positivo
APS	Persulfato de amônia
BCA	Bicinchoninic acid
BG	β -glicosidase
bga1	β -galactosidase extracelular
BSA	Bovine serum albumin
BXL I	β -xilosidase I
CBH I	Celobiohidrolase I
CBH II	Celobiohidrolase II
CCR	Carbon catabolite repression
cel7A	Gene que codifica a celobiohidrolase I
cel6A	Gene que codifica a celobiohidrolase II
cel7B	Gene que codifica a endoglucanase I
cel5A	Gene que codifica a endoglucanase II
cel12A	Gene que codifica a endoglucanase III
cel61A	Gene que codifica a endoglucanase IV
cel45A	Gene que codifica a endoglucanase V
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Atividade de endoglucanases sobre CMC
CRE I	Fator de transcrição repressor dependente da CCR
DNSA	Ácido 3,5-dinitro salicílico
EnG	Endoglucanase
ExG	Exoglucanase
FPase	Atividade de celulase total sobre papel de filtro

FPU	Unidade de papel de filtro
GAL1	Galactoquinase
GAL7	Uridililtransferase galactose-1-fosfato
GAL10	UDP-galactose-4-epimerase
GH	Glucanohidrolase
GOD	Glicose oxidase
HAP2/3/5	Fator de transcrição regulador positivo
HMF	Hidroximetil furfural
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
hvk1	Hexoquinase
LAC4	β -galactosidase intracelular
LAC12	Lactose permease
lad1	L-arabinitol desidrogenase
μ_{\max}	Velocidade específica máxima de crescimento
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
PDA	Agar batata dextrose
POD	Peroxidase
UI	Unidade internacional
X1	D-xilose
XYN I	Endo- β -1,4-xilanase I
XYN II	Endo- β -1,4-xilanase II
XYR 1	Fator de transcrição regulador da xilanase I
$Y_{x/s}$	Coefficiente de rendimento de biomassa em substrato

1 INTRODUÇÃO

A fim de reforçar a segurança energética e abrandar as mudanças climáticas, cresce o interesse em se encontrar combustíveis renováveis para substituir os baseados no petróleo. O emprego da biomassa vegetal (lignocelulósica), como fonte alternativa para produção de produtos e combustíveis, tornou-se atraente, por se tratar de uma matéria-prima barata, renovável e que se encontra disponível em abundância na natureza (OCTAVE E THOMAS, 2009).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, além de vários materiais inorgânicos, que estão fortemente interligados por ligações covalentes e pontes de hidrogênio, formando uma rede complexa e resistente. Devido à resistência apresentada por esses materiais, é necessário um pré-tratamento prévio dessa biomassa, para que as fibras celulósicas tornem-se acessíveis ao ataque enzimático, e assim possa ser utilizada em diversas aplicações industriais, como na produção de biocombustíveis de segunda geração, em especial o etanol (MENON E RAO, 2012).

As enzimas responsáveis pela hidrólise das fibras celulósicas são as celulasas, que representam um grupo de enzimas com diversas especificidades, que atuam sinergicamente para hidrolisar a celulose. Se classificam em três grandes grupos: as endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica, as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose e as β -glicosidases, que hidrolisam a celobiose em glicose (SIPOS *et al.*, 2010). Além das celulasas, também participam do processo de hidrólise das biomassas as hemicelulasas, sendo xilanases e mananases as principais desse grupo, e outras enzimas coadjuvantes (GÍRIO *et al.*, 2010).

A conversão da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol é hoje a aplicação mais investigada destas enzimas. Um dos principais obstáculos para a viabilidade econômica do etanol lignocelulósico é o alto custo das enzimas celulolíticas, devido à necessidade de utilização de cargas elevadas de enzimas para a hidrólise de biomassas. (MENON E RAO *et al.*, 2012).

Há uma grande diversidade de micro-organismos envolvidos na produção de celulasas e hemicelulasas, incluindo bactérias e fungos. A maior parte das celulasas exploradas para aplicações industriais são produzidas a partir de fungos filamentosos, tais como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*. *Trichoderma reesei* destaca-se entre os mais potentes produtores de celulasas, sendo a linhagem RUT C-30 a mais utilizada industrialmente, porque

é menos sensível à repressão pela glicose, o que lhe confere vantagem em comparação a outras linhagens (SINGHANIA *et al.*, 2010; SIPOS *et al.*, 2010).

Uma hidrólise eficiente de materiais lignocelulósicos requer um “pool” enzimático adequado a cada biomassa, por isso o desenvolvimento de pesquisas na busca de substratos indutores de enzimas, para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos diversificados, é importante do ponto de vista econômico. Diante disso, a proteômica torna-se uma excelente ferramenta para explorar e identificar proteínas expressas em resposta a diferentes tipos de biomassas. A análise do secretoma, com a utilização de técnicas proteômicas, permite a identificação e quantificação de enzimas potencialmente essenciais na degradação de biomassas, além das celulasas e hemicelulasas (CHAO *et. al.*, 2012).

Nesse contexto, o estudo da produção de enzimas em diversos substratos e o isolamento de enzimas secretadas, para estudo futuro do secretoma, são importantes para o desenvolvimento de processos de conversão de biomassas nas futuras biorrefinarias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a cinética e o perfil de produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução da produção de enzimas.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a cinética de crescimento em meio repressor a base de melaço de cana-de-açúcar.
- Investigar a cinética de produção de enzimas (celulase, β -glicosidase, hemicelulase e xilanase) em meios indutores a base de lactose, celulose, xilana, pectina, palma forrageira e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.
- Isolar proteínas extracelulares produzidas em meios a base de indutores para futura análise comparativa do perfil protéico diferencial no secretoma de *T. reesei* RUT C-30 nos diferentes meios estudados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biorrefinarias

O constante crescimento populacional passou a exigir, cada vez mais, um elevado consumo de energia e produtos, que, a princípio, derivam, sobretudo do petróleo. Com o aumento nos efeitos do aquecimento global, principalmente devido a elevada emissão de gases do efeito estufa, como o CO₂, oriundos da queima de combustíveis derivados do petróleo, somados ao aumento no preço desses combustíveis, torna-se uma realidade a busca por fontes alternativas renováveis.

Diante desse contexto global de dependência de energia fóssil, é essencial promover a utilização de produtos de base biológica. O emprego da biomassa vegetal (lignocelulósica), como fonte alternativa na produção de energia e produtos foi um passo importante e desafiador para a economia industrial, visto que a transformação desse material em produtos exigiria o desenvolvimento de tecnologias específicas (OCTAVE E THOMAS, 2009).

A produção e incremento de novos produtos, a partir da biomassa, baseiam-se no conceito de biorrefinaria. Este termo refere-se a um grupo de instalações que integra os processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, produtos químicos e energia (FERNANDO *et al.*, 2006). O objetivo do desenvolvimento e implantação dos processos de uma biorrefinaria é criar uma economia sustentável, incluindo o crescimento de novos mercados baseados em recursos biológicos renováveis, ambientalmente corretos, de baixo custo e que estejam disponíveis de forma abundante (OCTAVE E THOMAS, 2009).

Para desenvolver tecnologicamente rotas sustentáveis na biorrefinaria, toda a cadeia de produção de biomassa, como cultivo, colheita, pré-tratamento e conversão em produtos de interesse, deve ser considerada (MENON E RAO, 2012). Alguns eventos como o teor energético relativamente baixo, a sazonalidade e disponibilidade geográfica das fontes de biomassa, têm sido observados como barreiras para a produção em larga escala de produtos e combustíveis (SANDERS *et al.*, 2007).

3.1.1 Biorrefinaria de material lignocelulósico

A produção total de biomassa no planeta é de aproximadamente 100 bilhões de toneladas por ano de matéria orgânica seca e 50 milhões de toneladas de biomassa aquática,

desse total apenas 1,25% é utilizada como matérias-primas industriais. A biomassa vegetal, em sua maioria, é formada de materiais lignocelulósicos que constitui os resíduos das indústrias de papel e celulose, usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana), resíduos florestais (madeira, bambu, grammas) e resíduos agrícolas (palhas de cereais, de milho, de trigo). As principais vantagens apresentadas é que representa um dos recursos biológicos mais abundantes e baratos do planeta, além de não apresentar simultaneidade com as indústrias alimentares (NAIK *et al.*, 2010).

A biomassa lignocelulósica é composta de microfibrilas de celulose, envolvidas por hemicelulose e lignina e, em menor proporção, proteínas estruturais, lipídeos e cinzas. Para a utilização desse material fibroso, o passo inicial é separar as três frações principais (hemicelulose, celulose e lignina) através de pré-tratamentos, que podem ser químicos, físicos ou biológicos. Este passo é crítico porque tem impacto direto sobre a obtenção final de produtos de alto valor agregado, tais como etanol, ácido acético, acetona, butanol, e outros produtos de fermentação (OCTAVE E THOMAS, 2009).

A produção, inicialmente, de biocombustíveis de segunda geração baseada na transformação de materiais lignocelulósicos provocou o desenvolvimento de biorrefinarias de lignocelulose com base na obtenção de produtos derivados desses materiais (OCTAVE E THOMAS, 2009). Duas maneiras diferentes para o emprego da biomassa são observadas nessa biorrefinaria, termoquímica e biológica. A termoquímica se baseia, numa escala global, na utilização dos resíduos, sem separação, através de processos termoquímicos e de gaseificação, realizados a altas temperaturas e pressão, por exemplo, a produção de biocombustíveis sintéticos através do método de Fischer-Tropsch, onde se utiliza um gás de síntese constituído por uma mistura dos gases CO e H₂ (TJIMENSEN *et al.*, 2002).

A biológica, também chamada bioquímica, é baseada em métodos suaves usando enzimas e fermentação para transformar biomassa. As principais enzimas utilizadas são as celulasas, principalmente endoglucanases e celobiohidrolases, que degradam a celulose, e hemicelulasas, como as xilanases e mananases, que digerem a hemicelulose, e podem ser produzidas por bactérias (*Cellulomonas*) e por fungos (*Trichoderma*) (LYND *et al.*, 2002).

A degradação enzimática da celulose e hemicelulose levam a uma mistura de açúcares como a glicose, xilose, arabinose, galactose, fucose, que podem ser utilizados em bioprocessos para a obtenção de produtos como o etanol. O desafio da biotecnologia é gerar enzimas ou cepas microbianas capazes de degradar a lignocelulose, através de modificações por técnicas de engenharia metabólica, com o objetivo de desenvolver processos limpos por

via biológica, com linhagens capazes de metabolizar as hexoses e pentoses provenientes dos materiais lignocelulósicos (OCTAVE E THOMAS, 2009).

3.2 Composição da Lignocelulose

A biomassa lignocelulósica é a fonte renovável mais abundantemente encontrada na natureza, sendo incluídos neste grupo resíduos vegetais (madeira de angiospermas e gimnospermas), resíduos agroindustriais (milho, bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de arroz e soja) e resíduos urbanos (restos de alimentos, galhos e folhas de árvores, embalagens, vasilhames e entulho, ou seja, restos das atividades humanas, considerados indesejáveis). Dentre esses, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas (CASTRO E PEREIRA JR., 2010).

Os resíduos de lignocelulose são os principais componentes da biomassa, sendo constituídos de uma mistura de componentes individuais bem definidos tais como, celulose, hemicelulose e lignina, além de conter proteínas, ácidos orgânicos, minerais e açúcares livres como os seus componentes estruturais ou metabólicos, que estão fortemente interligados por forças covalentes e não-covalentes (Figura 3.1) (MENON E RAO, 2012; SANDERS *et al.*, 2012). Essas frações são responsáveis por 97-99% de toda massa seca desses materiais (CASTRO E PEREIRA JR., 2010). A celulose é o componente mais abundante nesses resíduos, representando aproximadamente 35 a 50% do peso seco da biomassa (LYND *et al.*, 2002).

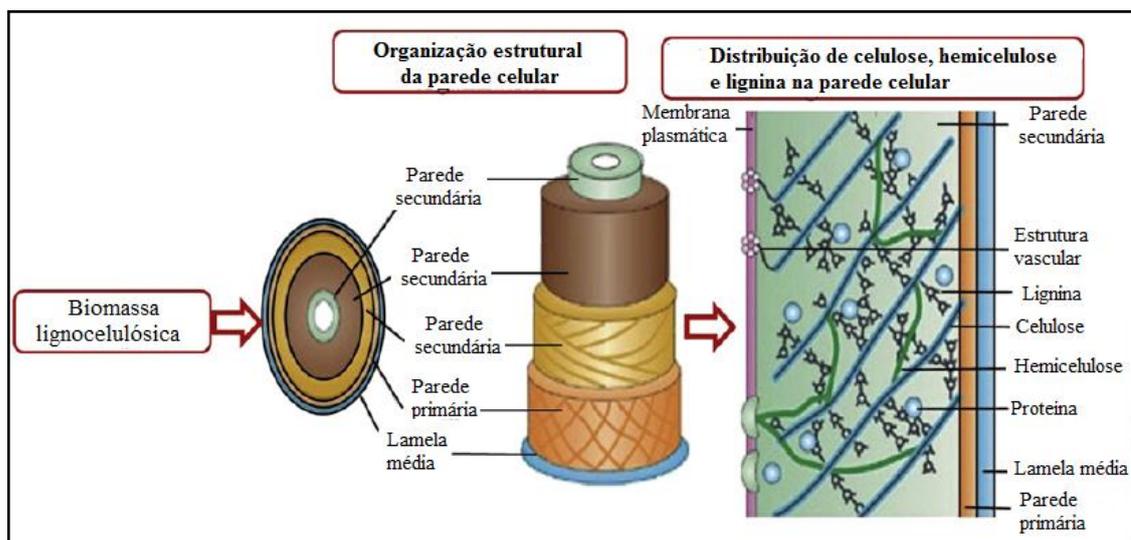


Figura 3.1 Organização estrutural da parede celular vegetal (Adaptado de MENON E RAO, 2012).

A celulose é um polímero linear, constituído por subunidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 formando o dímero celobiose (Figura 3.2). Apesar da composição química da celulose ser simples, sua estrutura física e morfológica é complexa e heterogênea, apresentando regiões altamente cristalinas (localizadas nas extremidades da celulose) e outras menos organizadas, as regiões amorfas (localizadas internamente).

Esse polímero é sintetizado na natureza como moléculas individuais, que sofrem automontagem no local da biossíntese. Cerca de 30 moléculas de celulose são organizadas em unidades maiores conhecidas como protofibrilas, que são embaladas em grandes unidades chamadas de microfibrilas, e estas se organizam em fibrilas maiores, as macrofibrilas, formando as fibras de celulose que constituem a parede celular vegetal (Figura 3.3) (ARANTES E SADDLER, 2011; LAVOINE *et al.*, 2012).

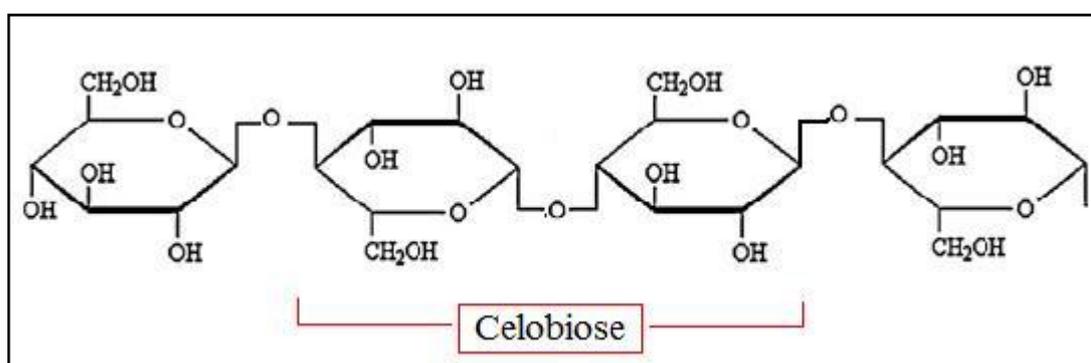


Figura 3.2 Estrutura química da celulose destacando o dímero de celobiose. (Adaptado de SANDERS *et al.*, 2012).

As microfibrilas estão organizadas de forma suficientemente firmes, com o objetivo de impedir, não só a penetração de enzimas, como também a de pequenas moléculas, como a de água. Em geral, a parede celular vegetal está subdividida em primária e secundária. A distribuição de celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre essas camadas. A parede secundária é dividida em mais três unidades, onde normalmente a segunda é mais espessa, que as outras, e é constituída na sua maioria de celulose (MENON & RAO, 2012).

Devido a tal complexidade, a hidrólise enzimática eficiente dos substratos celulósicos requer a presença de um complexo de enzimas atuando de forma sinérgica na degradação dessas substâncias. Essas enzimas são conhecidas como celulases e hemicelulases (CASTRO E PEREIRA JR., 2010).

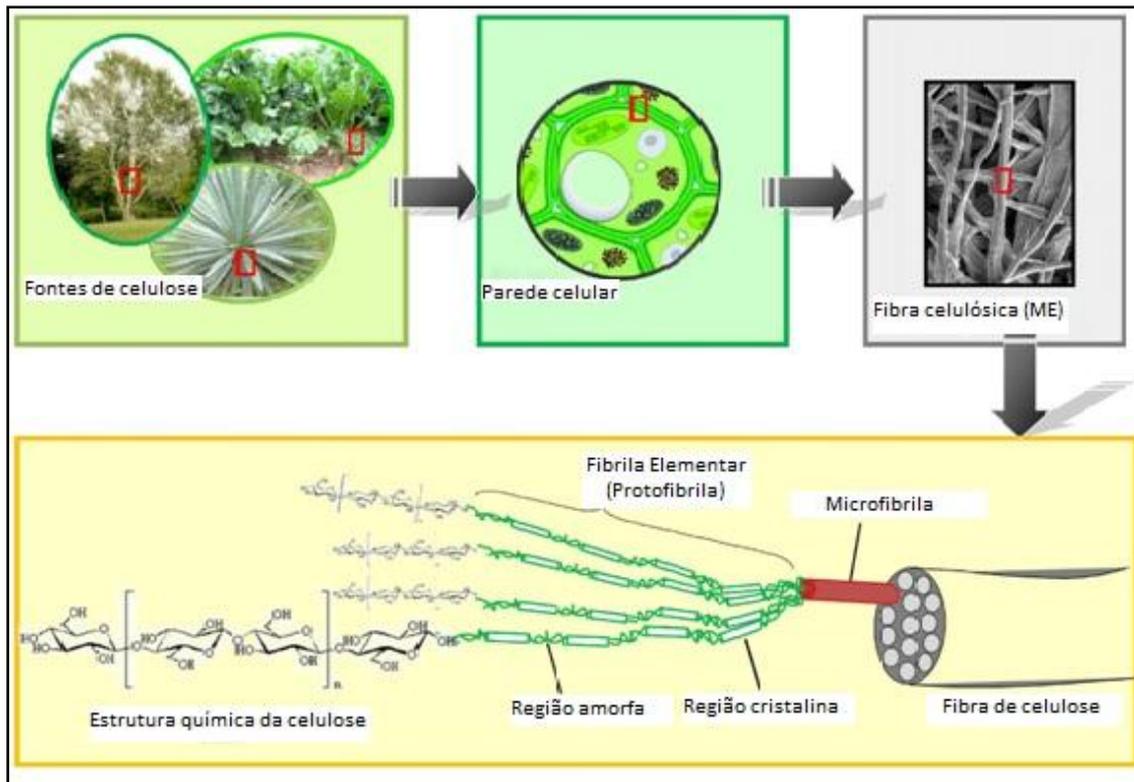


Figura 3.3 Organização das fibras celulósica (Adaptado de LAVOINE *et al.*, 2012).

A hemicelulose é um polissacarídeo com menor peso molecular que a celulose. É formada a partir de xilose, manose, galactose, glicose, arabinose, 4-O-metil-glicurônico, D-galacturônico e ácido D-glicurônico (Figura 3.4). Os açúcares, que constituem a hemicelulose estão ligados entre si por ligações glicosídicas, β -1,4 e β -1,3. Em contraste com a celulose, que é um composto cristalino e forte, a hemicelulose apresenta uma estrutura ramificada e amorfa com pouca resistência à hidrólise, sendo mais facilmente hidrolisada por ácidos (GÍRIO *et al.*, 2010).

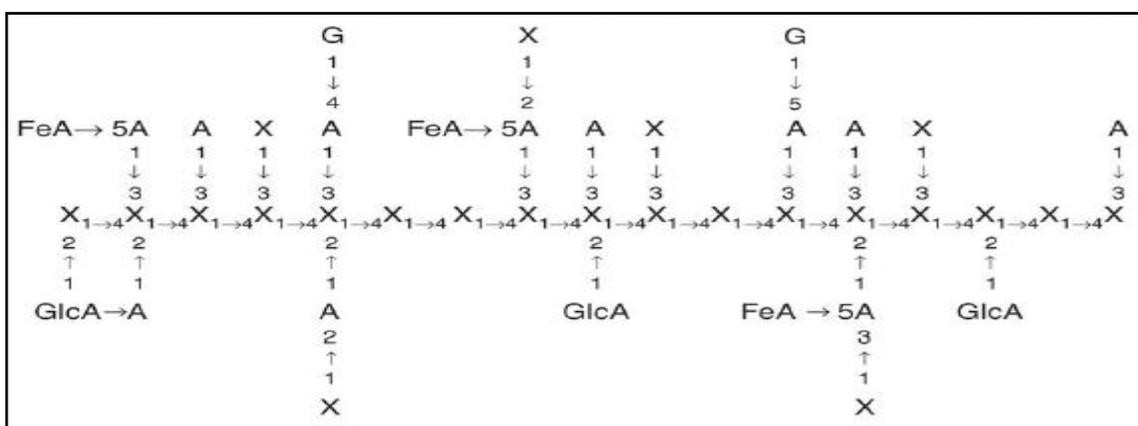


Figura 3.4 Esquema da estrutura básica de hemicelulose. A arabinose; FeA, ácido ferúlico; G, galactose; Glc, ácido glucurônico; X, xilose. (GRAY *et al.*, 2006).

A lignina é um heteropolímero amorfo, insolúvel em água, consistindo de precursores de unidades de fenilpropanóides, os álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico (Figura 3.5). Ela está presente na parede celular vegetal, ligada à hemicelulose e a celulose, formando uma espécie de barreira impenetrável, para dar suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataque microbiano e estresse oxidativo. Quanto maior a proporção de lignina, maior a resistência à degradação química e enzimática (SÁNCHEZ, 2009).

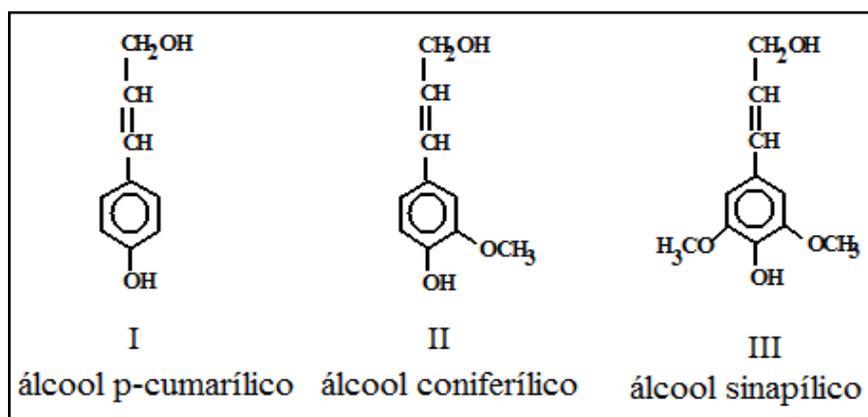


Figura 3.5 Unidades fenilpropano precursoras da lignina (ROCHA, 2000).

3.3 Enzimas Celulolíticas

3.3.1 Celulases

A hidrólise completa da celulose exige a ação de um complexo enzimático composto pelas celulases. Essas enzimas são hidrolases que clivam ligações glicosídicas do tipo β -1,4 entre os resíduos de glicose (LYND *et al.*, 2002). Todas as enzimas celulolíticas reconhecem tais ligações, mostrando, entretanto, seletividade em relação a diferentes sítios do substrato. Os componentes do sistema de enzimas celulolíticas, de uma forma geral, foram classificados com base no modo de ação catalítica e nas propriedades estruturais.

Três tipos principais de atividades enzimáticas foram encontrados de acordo com o local de atuação no substrato celulósico: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam a celobiose em glicose (CASTRO E PEREIRA JR., 2010).

As endoglucanases, (1,4- β -D-glicano-4-glicanoidrolase, EC 3.2.1.4), também chamadas de carboximetilcelulases (por causa do substrato artificial utilizado para a sua detecção) são responsáveis por iniciarem a hidrólise, atuando nas regiões internas (estrutura amorfa) da fibra

celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização com novos terminais, sendo um redutor (a glicose possui uma hidroxila livre) e um não redutor (a hidroxila da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (LYND *et al.*, 2002).

A EnG é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos, os cinco maiores grupos são EnGI/Cel7B, EnGII/Cel5A, EnGIII/Cel12A, EnGIV/Cel61A e EnGV/Cel45A (SALOHEIMO *et al.*, 1997; OLSSON *et al.*, 2003; NOGAWA *et al.*, 2001; SIPOS *et al.*, 2010).

O grupo das exoglucanases (ExG) é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucanohidrolase (GH). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucanoglucano-hidrolase, hidrolisa a fibra celulósica liberando glicose diretamente do polímero (CASTRO E PEREIRA JR., 2010). A CBH (EC 3.2.1.91), que possui o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase, é responsável pela hidrólise, apenas dos terminais redutores, da fibra de celulose e de oligossacarídeos a celobiose. Estudos relatam que os terminais não-redutores também são atacados por essa enzima (SIPOS *et al.*, 2010).

A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que aumenta as taxas de hidrólise da celulose, pois as regiões cristalinas do polímero tornam-se amorfas, deixando-o mais exposto ao ataque das celulasas. A CBH está dividida em dois tipos: CBHI/Cel7A, que hidrolisa terminais redutores, e a CBHII/Cel6A, que hidrolisa terminais não redutores. Essas enzimas, geralmente, sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO E PEREIRA JR., 2010).

A β -glicosidase, ou β -glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21), que é seu nome sistemático, tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Essa enzima, assim como a CBH, tem a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise (glicose) (CASTRO E PEREIRA JR., 2010).

As enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento muito melhor quando atuam em conjunto, do que quando atuam isoladas (Figura 3.4). Tal efeito é conhecido como sinergia. SIPOS *et al.*, 2010 afirmam que três formas de sinergia são conhecidas: sinergia EnG-ExG, onde a endoglucanase atua nas regiões amorfas disponibilizando os terminais redutores e não redutores, onde irão atuar as CBH I e II, respectivamente, participando de outro tipo de sinergia, a ExG-ExG. A celobio-hidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são os substratos utilizados pela β -glicosidase, formando as sinergias ExG-BG e EnG-BG.

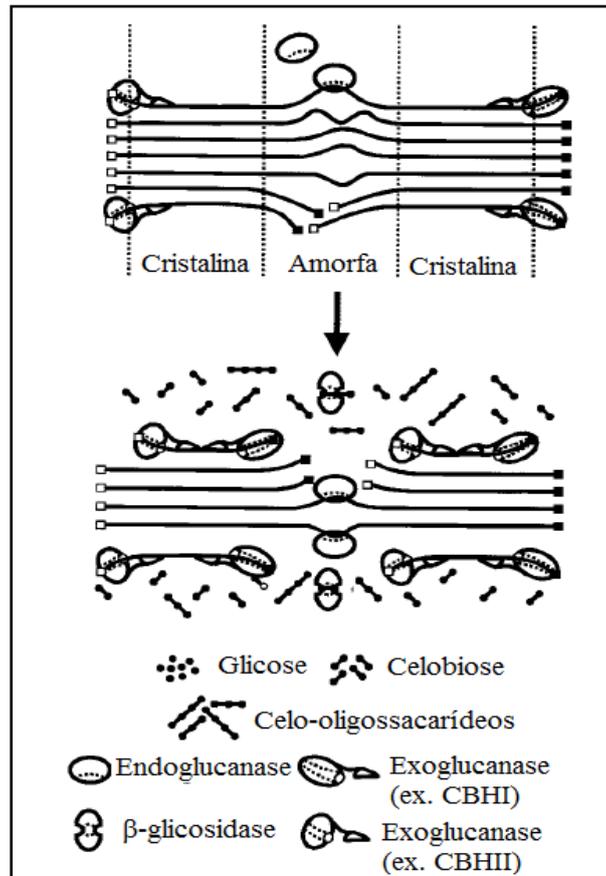


Figura 3.6 Representação esquemática da atuação sinérgica das enzimas celulolíticas nas regiões amorfa e cristalina da celulose (Adaptado de LYND *et al.*, 2002).

3.3.2 Hemicelulases

Para uma hidrólise completa dos substratos lignocelulósicos, além da degradação da celulose pelas celulases, enzimas específicas também atuam na quebra da hemicelulose, as hemicelulases. No grupo das hemicelulases, incluem-se enzimas que quebram as molécula de xilana (EC 3.2.1.8 xilanases), manana (mananases EC 3.2.1.78), as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) e β -manosidases (EC 3.2.1.25) atuam nos resíduos de xilose e manose, respectivamente.

Diversas atividades são realizadas por outras enzimas, como a desramificação pelas α -arabinosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), α -galactosidases (EC 3.2.1.22), esterases ácido ferrúlico (EC 3.1.1.73) e esterases acetil xilano (EC 3.1.1.72), agindo nos pontos de ramificação da hemicelulose (SORENCEN *et al.*, 2007).

A xilanase é responsável pela hidrólise da xilana. Esta enzima é amplamente utilizada no processamento de alimentos e nas indústrias químicas e de celulose (SEYIS E AKSOZ,

2005). Nas indústrias de papel e celulose, a utilização da xilanase diminui o consumo de cloro orgânico e a demanda de oxigênio, melhorando assim a qualidade das águas residuais (KAR *et al.*, 2006).

3.4 Micro-organismos Produtores de Celulases

As enzimas celulolíticas são encontradas em secreções de micro-organismo, como fungos e bactérias, e também estão presentes no sistema digestivo de alguns vertebrados, como os ruminantes. Esses micro-organismos são incapazes de transportar, para o interior de suas células, materiais insolúveis como a celulose, por isso secretam suas enzimas para fora dela, em seguida os açúcares provenientes da degradação da celulose são transportados para o interior da célula e metabolizado (WILSON, 2008).

Várias espécies de bactérias anaeróbicas que utilizam a celulose localizam suas celulases complexadas diretamente na superfície da célula ou na matriz do glicocálice (LYND *et al.*, 2002). Micro-organismos aeróbicos são responsáveis pela degradação da celulose no solo, no entanto várias espécies de bactérias anaeróbicas celulolíticas também são encontradas no solo, como o *Clostridium thermocellum*, *C. cellulovorans* e *Acetivibrio cellulosolvens* (DEMAIN *et al.*, 2005). Os cupins e outros insetos também são importantes na degradação da celulose, muitos desses insetos possuem micro-organismos celulolíticos simbióticos em seu interior, produtores de enzimas celulolíticas, capazes de digerir a celulose (OHKUMA, 2003).

Os micro-organismos simbióticos que habitam o trato gastrointestinal de ruminantes, especialmente no rúmen, são principalmente bactérias anaeróbicas, já que o rúmen é um ambiente extremamente anaeróbico, além delas participam igualmente fungos primitivos como o *Chytridomycetes*, que também é anaeróbico. Esses organismos são responsáveis pela degradação da celulose, que provém da alimentação, a açúcares solúveis que serão utilizados como fonte de energia por esses animais (DESVAUX, 2006; LYND *et al.*, 2002).

Outras espécies de micro-organismos celulolíticos se destacam como: as bactérias celulolíticas *Pseudomonas* e *Actinomicetos* dos gêneros *Streptomyces* e *Thermomonospora* (aeróbias); *Bacillus* e *Cellulomonas* (aeróbias facultativas). Entre os fungos, os gêneros mais estudados são: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Humicola*, por apresentarem à capacidade de produzir complexos celulolíticos em grandes quantidades (LYND *et al.*, 2002).

Entre os microrganismos produtores de xilanase, estão as eubactérias e arqueobactérias, no entanto, a quantidade de enzima produzida por estas bactérias é menor, comparando-se

com os fungos (SINGH *et al.*, 2003). Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* destacam-se como maiores produtores de xilanase do ponto de vista industrial, pelas seguintes razões: não são patogênicos, podem ser cultivados facilmente e são grandes produtores de enzimas extracelulares (KAR *et al.*, 2006).

3.4.1 Micro-organismos anaeróbicos

Os animais herbívoros não secretam as enzimas digestivas necessárias para a degradação dos polissacarídeos estruturais que formam a parede celular das células vegetais, por isso dependem da atividade de micro-organismos simbióticos para a obtenção de energia, a partir desses materiais provenientes de sua dieta. A quebra desses polissacarídeos estruturais é mediada por comunidades de micro-organismos anaeróbicos eucariontes e procariontes, compostas por bactérias, fungos e protozoários, que se desenvolvem no intestino grosso, no caso de cavalos e coelhos, enquanto que nos ruminantes o desenvolvimento ocorre no rumem (FLINT *et al.*, 2008).

Em ambos os casos, os produtos resultante da fermentação são absorvidos e utilizados como fonte de energia por esses animais. Muitos dos micro-organismos que habitam o rumem são considerados secundários, porque dependem de outros organismos que atacam primeiramente a estrutura recalcitrante das plantas (FLINT, 2004).

Três espécies de bactérias presentes no rúmeme são estudadas em relação à atividade celulolítica, *Rumminococcus flavefaciens* e *Rumminococcus albus*, representantes Gram-positivos e *Fibrobacter succinigenes*, do grupo das bactérias Gram-negativas. É evidente, que a maior parte das enzimas celulolíticas, produzidas por *R. flavefaciens*, esteja retida na superfície celular dessas bactérias na forma de celulosomas, que representam um tipo de complexo multienzimático (WILSON, 2009).

A partir da análise do proteoma de *R. albus* foram identificadas duas celulasas principais. Estas enzimas parecem não estar na forma de celulosoma, no entanto podem ainda ser retidas na superfície celular dessa bactéria por outros mecanismos (XU *et al.*, 2004). Outras espécies de Gram-positivas também são conhecidas, como *Eubacterium cellulosolvens* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, que apresentam atividade celulolítica e hemicelulolítica, respectivamente (TOYODA *et al.*, 2003).

Na análise genômica da *F. succinigenes* foram identificados 113 genes relacionados com a degradação da parede celular vegetal, incluindo 40 celulasas e 29 xilanasas. Essa espécie apresenta uma característica semelhante às bactérias Gram-positivas, que é a

complexa organização de suas enzimas, apresentando múltiplos domínios catalíticos e módulos de ligação ao substrato (MITSUMORI *et al*, 2002; QI *et al*, 2005).

Espécies de *Prevotella* e *Bacterioides* representam uma proporção muito significativa (>30%) do total de bactérias ruminais. Nenhum dos isolados disponíveis é conhecido por serem celulolíticos, mas as espécies *Prevotella bryantii* e *Prevotella ruminicola* possuem carboximetilcelulases, hemicelulases e pectinases (AVGUSTIN *et al*, 1997). A maior parte da xilanase encontrada em *P. bryantii* é liberada apenas após a ruptura das células, o que sugere que está localizada no periplasma ou membranas (MIYAZAKI *et al*, 1997).

Algumas espécies de fungos ruminais anaeróbicos foram identificados e estudados por apresentarem sistemas de celulase altamente ativos, como *Piromyces equi*, *Neocallimastix frontalis* e espécies do gênero *Orpinomyces*. Esses micro-organismos são utilizados como fonte de enzimas recombinantes com altas atividades específicas, o que têm atraído o interesse para uma variedade de aplicações biotecnológicas (EKINCI *et al*, 2002; STEENBAKKERS *et al*, 2001).

Os protozoários anaeróbicos representam até 50% da biomassa microbiana encontrada no rúmen. Certas espécies desempenham um papel significativo na degradação do material vegetal, como o *Polyplastron multivesiculatum* (DEVILLARD *et al*, 2003).

3.4.2 Micro-organismos aeróbicos

3.4.2.1 Bactérias

No grupo dos micro-organismos aeróbicos celulolíticos estão os fungos e as bactérias. Entre as bactérias, duas espécies se destacam tendo suas celulases bem caracterizadas são *Cellulomonas fimi* e *Thermobifida fusca*. O conjunto de seis celulases produzidas por esses micro-organismos apresentam atividade similar, porém diferentes seqüências e ordens de domínio, o que sugere que essas espécies não obtiveram os genes para as celulases de um ancestral comum, mas sim do resultado de uma evolução convergente (LYKIDIS *et al.*, 2007).

Essas bactérias são actinomicetos, sendo encontrados no solo. A *C. fimi* é mesofílica com temperatura ótima de crescimento perto de 30°C, enquanto que a *T. fusca* é moderadamente termofílica com temperatura ótima de crescimento de 50°C (LYKIDIS *et al.*, 2007; IRWIN *et al.*, 2003). Estes micro-organismos não estão estritamente relacionados; a *C.*

fimi pertence à subordem *Micrococccineae*, enquanto que a *T. fusca* a subordem *Streptosporangineae* (WILSON, 2008).

Em adição às seis celulases produzidas, *Thermobifida fusca* secreta também outras proteínas quando cultivada em celulose; entre elas estão a xiloglucanase, xilanase, β -1,3 endoglucanase e outras duas proteínas que aparentemente não apresentam atividade catalítica (IRWIN *et al.*, 2003; McGRATH E WILSON, 2006). O papel da xiloglucanase é degradar a xiloglucana ligada à celulose, permitindo o acesso e a ação catalítica das celulases (IRWIN *et al.*, 2003).

Outras espécies celulolíticas também são conhecidas como: *Saccharophagus degradans*, um representante aeróbico marinho que degrada a parede celular vegetal, cujo genoma está seqüenciado apresentando genes que codificam endoglucanases (TAYLOR II *et al.*, 2006); e *Cytophaga hutchinsonii*, que apresenta em seu genoma uma série de genes que codificam endoglucanases utilizadas em diferentes mecanismos de degradação da celulose.

3.4.2.2 Fungos

Os fungos são agentes bem conhecidos na decomposição de compostos orgânicos, em geral de substratos celulósicos. Algumas espécies de fungos se destacam em relação à produção industrial de celulases, entre elas estão *Humicola insolens* e o *Trichoderma reesei*, por apresentarem a habilidade de produzirem grandes quantidades de celulases com alta atividade específica para a celulose (WILSON, 2008).

Outras espécies importantes de fungos celulolíticos são: *Aspergillus aculeatus*, que produz nove celulases, destas três foram sequenciadas (Cel7A, Cel12A e Cel5A); *Talaromyces emersonii*, que produz duas exoglucanases (Cel7A e Cel6A) e várias endoglucanases, destas a Cel5a já foi seqüenciada; *Chrysosporium lucknowense*, que produz celulases semelhantes às produzidas pelo *T. reesei*; além de algumas espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (TAKADA *et al.*, 2002; GRASSICK *et al.*, 2004; BUKHTOJAROV *et al.*, 2004).

O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos ascomicetos filamentosos, mesófilos e saprófitos, estando amplamente distribuídos por todo mundo. Por apresentar a capacidade de crescerem em uma faixa ampla de diferentes condições ambientais e substratos,

este gênero pode ser utilizado em situações de interesse biotecnológico (GYALAI-KORPOS *et al.*, 2011). Dentre as espécies deste gênero, o *T. reesei* destaca-se devido ao seu grande potencial de aplicação industrial e biotecnológica, sendo muito utilizado na produção comercial de várias enzimas, em especial celulasas e hemicelulasas (PETERSON E NEVALAINEN, 2012).

No século XIX, foi criado um novo grupo taxonômico incluindo quatro espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, entre elas o *T. viride*, originalmente isolado das Ilhas Salomão, descoberto durante a Segunda Guerra Mundial, após ser identificado provocando a degradação do tecido das barracas dos militares americanos, sendo posteriormente denominado de *T. viride* QM6a, pois se destacava por sua habilidade de produzir celulasas (CHOY *et al.*, 2011). Pesquisas posteriores reconheceram como sendo espécies distintas e QM6a se tratava de uma nova espécie, que foi denominada *Trichoderma reesei* (PETERSON E NEVALAINEN, 2012).

Em relação à produção de celulasas, o *T. reesei* apresenta diversas vantagens para a produção em escala industrial, pois é um fungo fácil de cultivar, e não apresenta riscos aos seres humanos, porque não produz micotoxinas ou qualquer outra substância que possa tornar nociva sua utilização no processo de produção de enzimas celulolíticas. Com a finalidade de suprir a necessidade mundial de fontes alternativas de combustíveis, o desenvolvimento de pesquisas utilizando técnicas de mutagênese aleatória a partir do tipo selvagem do *T. reesei*, a fim de isolar mutantes com elevada produção de enzimas celulolíticas, tornou-se o objetivo principal para desenvolver uma produção economicamente viável dessas enzimas para a degradação da biomassa celulósica e produção de bioetanol (GYALAI-KORPOS *et al.*, 2011; CHOY *et al.*, 2011; PETERSON E NEVALAINEN, 2012).

Dentre essas, a linhagem RUT C-30 tem sido utilizada no desenvolvimento de processos para a produção de enzimas celulolíticas mais eficientes, não sendo afetadas pela glicose com tanta intensidade como outras linhagens (JUHÁSZ *et al.*, 2004; SINGHANIA *et al.*, 2007). A utilização de engenharia genética tem sido utilizada para obtenção de estirpes hipercelulolíticas para a degradação mais eficiente da biomassa (LIMÓN *et al.*, 2011).

O sistema celulolítico do *T. reesei* é composto por três classes principais de enzimas, são elas: endoglucanases, responsáveis pela quebra de ligações glicosídicas internas; exoglucanases, com a função de liberar resíduos de celobiose, no qual irão atuar as β -glicosidases na etapa final de hidrólise, produzindo glicose. Entre as proteínas secretadas, a celulase mais abundante produzida pelo *T. reesei* é a exoglucanase Cel7A, que representa cerca de 70% das proteínas secretadas pelo fungo. Em seguida está a Cel6A com um

percentual de 10% dessas proteínas (MARKOV *et al.*, 2005). Além destas, também são encontradas cinco endoglucanases, Cel5A, Cel12A, Cel61A, Cel45A e a Cel7B que é a mais representativa (YUAN *et al.*, 2001)

Atualmente, vários estudos são realizados com o objetivo de encontrar o substrato mais adequado ao processo de produção de enzimas celulolíticas pelo *T. reesei*, visto que a matéria-prima ideal deve ser disponível em grandes quantidades, barata e processada facilmente (JUHÁSZ *et al.*, 2005). Diversos compostos foram testados, dentre eles, a celulose foi considerada, em potencial, um dos melhores indutores para a formação do complexo de celulases (AHAMED E VERMETTE, 2008). Outros compostos, tais como sofrorose, lactose, celobiose e compostos sintéticos (tióis ou ésteres de dissacáridos) também apresentam a capacidade indutora, bastante eficaz, para a produção de enzimas nos processos biotecnológicos (SIPOS *et al.*, 2010).

Trichoderma reesei RUT C-30

O desenvolvimento de programas genéticos utilizando a técnica de mutagênese aleatória a partir do tipo selvagem *T. reesei* QM6a, tiveram como objetivo a obtenção de mutantes com elevada produção de enzimas celulolíticas. Inicialmente, utilizou-se irradiação de conídios para aquisição de mutantes, e o mais bem sucedido foi QM9414, que apresentou uma produção extracelular de celulase de 2-4 vezes maior do que QM6a. Posteriormente, na Universidade de Rutgers, em Nova Jersey, foi desenvolvido um método de triagem mais eficiente, que utilizava a mutagênese com luz UV e química, para gerar mutantes hipercelulolíticos e baixa taxa de repressão catabólica (MONTENECOURT E EVELEIGH, 1977).

A linhagem RUT C-30 foi obtida através de um processo realizado em três etapas: (1) mutagênese por N-nitroguanidina; (2) mutagênese por luz UV; (3) triagem para verificar a desrepressão catabólica por resistência ao antimetabólito 2-desoxiglicose (2DG) (MONTENECOURT E EVELEIGH, 1977; MONTENECOURT E EVELEIGH, 1979). Quando cultivada em celulose, a linhagem RUT-C30 apresentou uma produção micelial com um teor de proteína de 4-5 vezes maior do que a estirpe QM6a, com atividade de endoglucanase 30 vezes maior e de β -glicosidase três vezes maior (GHOSH *et al.*, 1984 ; GLENN *et al.*, 1985).

Com o advento da cariotipagem eletroforética, os pesquisadores MÄNTYLÄ *et al.* (1992) da Finlândia e CARTER *et al.* (1992), dos EUA utilizaram um campo elétrico

homogêneo na eletroforese em gel para comparar os genomas de QM6a, RUT-C30 e de outras linhagens de hiperclulolíticos. Foi observado para RUT C-30 um aumento de tamanho dos cromossomos I-V e uma diminuição no cromossomo VII, em comparação com QM6a, resultando num aumento global de tamanho do genoma, que passou de 32,5 para 34,7 Mpb. Através do mapeamento genético, foi evidenciada a ocorrência de rearranjos cromossômicos, com deslocalização dos genes que codificam enzimas celulolíticas (CARTER *et al.*, 1992).

A caracterização da expressão dos genes em *T. reesei* RUT C-30 por análise transcricional ajudou a diferenciar a atividade enzimática do mutante e detectar possíveis causas genéticas que dificultam a secreção de proteínas heterólogas. O genoma de *T. reesei* QM6a foi totalmente seqüenciado (MARTINEZ *et al.*, 2008) e logo a seguir, foi realizado o sequenciamento parcial do RUT C-30, como parte de uma investigação de um gene aparentemente ausente (SEIDL *et al.*, 2008).

Investigações foram realizadas para se verificar um vínculo fenotípico com os genes ausentes. Observou-se na estirpe RUT C-30 a ausência de um fragmento genômico de 85 kb, que expressa enzimas relacionadas ao metabolismo primário (desidrogenases) e transporte (permeases), enzimas extracelulares (imidases) e associadas a desintoxicação celular (glutathion enxofre-transferase) (SEIDL *et al.*, 2008).

Estudos mostraram que o crescimento de RUT C-30 em meio com os polissacarídeos maltose, amido e dextrina era prejudicado pela ausência do gene que codifica a enzima maltose-permease, responsável pelo transporte da maltose através da membrana plasmática. Também foi observado um inchaço nos conídios, característico de problemas com a homeostase, resultante da ausência do gene que expressa a enzima glicerol desidrogenase, que tem como efeito uma fase de latência prolongada. Antes da formação dos micélios, alguns desses conídios não são capazes de germinar e sofrem morte celular autofágica (SEIDL *et al.*, 2008).

Ferramentas proteômicas, tais como a eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, têm sido amplamente utilizadas para investigar o secretoma e/ou proteínas intracelulares produzidas pelos fungos filamentosos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). A análise do secretoma do *T. reesei* RUT C-30, cultivado em lactose como única fonte de carbono, apresentou uma alta proporção de CBHI (Celobiohidrolases I), quando comparado ao mutante *T. reesei* QM9414 CL847 que foi mais diversificada, apresentando menos CBHI e níveis mais elevados de β -glucosidase, mananase e xilanase (HERPOËL-GIMBERT *et al.*, 2008).

Também foi observado, com base na espectrometria de massas do secretoma do RUT C-30, uma quantidade maior de CBHI quando cultivado em palha de milho (NAGENDRAN *et al.*, 2009). A produção de proteínas heterólogas em *T. reesei* RUT C-30 foi moderadamente bem sucedida, apresentando rendimentos consideravelmente mais baixos que aqueles obtidos pelo *T. reesei* selvagem, que, de acordo com CHERRY E FIDANTSEF (2003), tem produz cerca 100 g/L quando cultivado em fermentadores controlados.

3.5 Regulação da Expressão de Celulases e Hemicelulases em *Trichoderma reesei*

Pesquisas sobre a regulação de genes de expressão das celulases e hemicelulases podem ser muito úteis para aumentar a produção destas enzimas nos seus produtores nativos. Os mecanismos de regulação dos genes que codificam as celulases e hemicelulases foram estudados em fungos filamentosos, principalmente em *Aspergillus* (NOGUCHI *et al.*, 2009) e *Trichoderma* (STRICKER *et al.*, 2008a), por serem os principais micro-organismos produtores destas enzimas em escala industrial.

A produção destas enzimas extracelulares é um processo, que requer um alto consumo de energia por parte do micro-organismo, por isso as enzimas são produzidas apenas nas condições em que o fungo necessita utilizar os polímeros, oriundos da planta, como fonte de carbono e energia. Os mecanismos de indução da expressão dos genes das celulases e hemicelulases envolvem a ativação do gene pelos respectivos produtos da hidrólise da celulose e da hemicelulose, ou por modificação subsequente desse produto, como a sofrorose, para *A. terreus* e *T. reesei* (HRMOVÁ *et al.*, 1991; MANDELS *et al.*, 1962).

Em adição à indução por mono e oligossacarídeos, genes que codificam enzimas hidrolíticas, envolvidas na desconstrução da parede celular vegetal em fungos filamentosos, podem ser reprimidos durante o crescimento na presença de fontes de carbono, que são facilmente metabolizados, tais como a glicose. Esse importante mecanismo é chamado de repressão catabólica (CCR-*carbon catabolite repression*) (RUIJTER E VISSER, 1997; ARO *et al.*, 2005; KUBICEK *et al.*, 2009).

Devido à alta produção, pelo *T. reesei*, de enzimas celulolíticas, esse micro-organismo revelou-se um candidato em potencial para o avanço na produção do etanol celulósico nos bioprocessos (AMORE E FARACO, 2012). A incapacidade das células fúngicas de incorporar compostos poliméricos insolúveis, tais como celulose e xilana, despertou o interesse em estudar como estes polímeros podem iniciar a produção de enzimas hidrolíticas.

Vários estudos investigando esse aspecto postularam a função indutora de um composto solúvel, derivado da celulose, de baixo peso molecular. Um dos mecanismos propostos é que o fungo produz níveis basais de celulase (principalmente CEL7A e CEL6A) e que a atividade destas enzimas extracelulares sobre a celulose produz um indutor solúvel, que pode entrar na célula e promover a indução (EL-GORARY *et al.*, 1989; CARLE-URIOSSTE *et al.*, 1997).

ILMÉN *et al* (1997) investigaram características básicas da regulação da expressão, em *T. reesei*, das celobiohidrolases (*cbh1* e *cbh2*) e endoglucanases (*egl1*, *egl2* e *egl5*) a nível de mRNA, mostrando que esses genes são coordenadamente expressos. Observou-se que o nível mais elevado de indução era obtido na presença de celulose e sofrorose, e que a expressão moderada foi observada quando a celobiose ou a lactose foram usadas como fontes de carbono.

Posteriormente, FOREMAN *et al* (2003) identificaram mais genes, cujo comportamento regulatório é consistente com o seu papel na formação do indutor primário para a expressão das celulases. Entre eles, o *cel5b* foi moderadamente expresso durante o crescimento em glicerol, glicose, sofrorose e lactose, e que apenas um pouco acima desse nível foi induzido por celulose. Verificou-se também que o glicerol e o sorbitol não promovem a expressão, mas, ao contrário da glicose, não inibem.

A utilização da tecnologia de microarranjo, empregada no estudo da regulação da expressão de genes que codificam celulases e hemicelulases em *T. reesei*, mostrou que a maioria dos genes, que codificam essas enzimas de degradação da biomassa, é transcricionalmente co-regulados (FOREMAN *et al.*, 2003).

Esta co-regulação indica uma cooperação fortemente coordenada pelos fatores de transcrição, dos quais cinco já foram identificados: os reguladores positivos XYR1, ACE2 e o Complexo HAP2/3/5, o repressor ACE1 e o CRE1, repressor mediado pela CCR (KUBICEK *et al.*, 2009). O principal regulador positivo da transcrição é representado por XYR1 (xilanase regulador 1), sua atuação está representada na Figura 3.7 (STRICKER *et al.*, 2005; STRICKER *et al.*, 2008a).

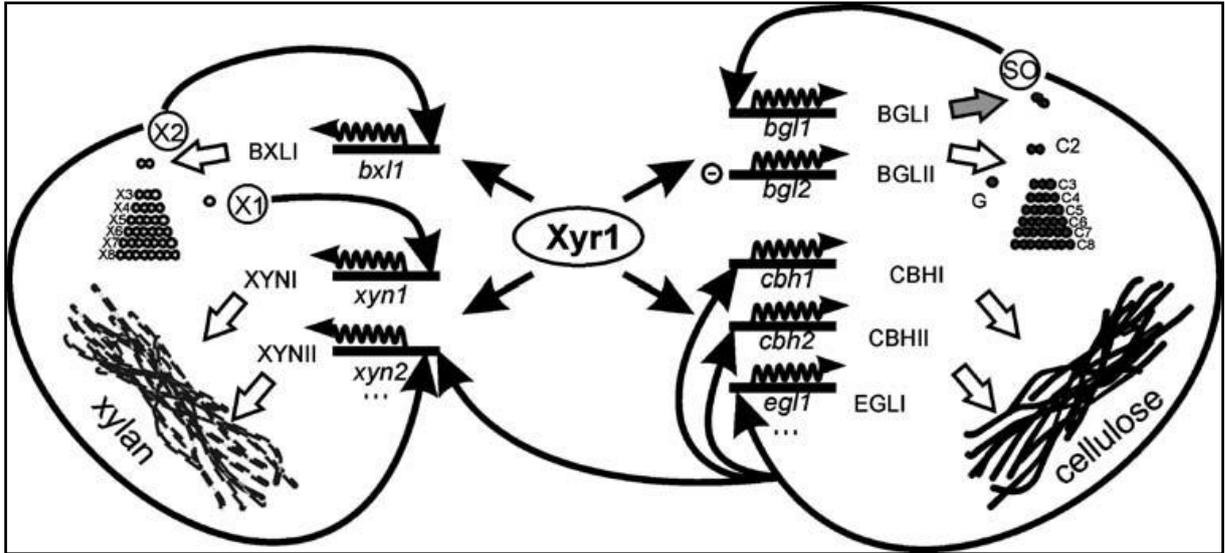


Figura 3.7 Representação esquemática do papel central do Xyr1 no sistema enzimático hidrolítico de *T. reesei* durante a degradação da xilana e celulose (STRICKER *et al.*, 2008a). (Xyr1) Fator da transcrição; (XYNI e XYNII) Endo- β -1,4-xilanase I e II; (CBHI e CBHII) Celobiohidrolases I e II; (EGLI) Endoglucanase I; (BXL1) β -xilosidase I; (BGLI e BGLII) β -glucosidase I e II; (X1) D-xilose; (X2) Xilobiose; (SO) Soforose.

O Xyr1 atua como um fator da transcrição, agindo diretamente na expressão das xilanases XYNI e XYNII (endo- β -1,4-xilanase I e II) e celulasas (CBHI, CBHII, EGLI), bem como sobre o indutor correspondente (D-xilose, X1). Esse fator também age na expressão da enzima β -xilosidase I (BXL1), no caso da utilização da xilana, e no indutor correspondente (soforose, SO) fornecendo enzima β -glucosidase I (BGLI), no caso da utilização da celulose (STRICKER *et al.*, 2008a).

A exclusão de *xyr1* elimina a indução dos genes de celulasas na presença de celulose e soforose e prejudica a indução de genes de hemicelulasas envolvidos na degradação de xilana (AKEL *et al.*, 2009), provando, assim, o seu papel essencial no processo de indução. A transcrição de *xyr1* parece não ser induzida durante o crescimento em celulose (MACH-AIGNER *et al.*, 2008).

A maioria dos ativadores da transcrição eucariótica está presente nas células apenas em pequenas quantidades necessárias para iniciar a expressão dos genes (PTASHNE, 1998), e, em muitos casos, eles são adicionalmente induzidos pelas condições para as quais são necessários e são degradados uma vez que não são mais necessários (TANSEY, 2001). A expressão de *xyr1* é regulada unicamente por CRE1, CCR dependente, e pela repressão da transcrição do fator ACE1, não por indução (STRICKER *et al.*, 2007; MACH-AIGNER *et al.*, 2008).

A supressão de *ace2* baixa o nível da transcrição e provoca uma diminuição da atividade das celulasas durante o crescimento em celulose, ao passo que ela não afeta a indução de celulase por sofrorse. A fosforilação é um processo necessário para a ligação de ACE2 ao promotor (ARO *et al.*, 2001; STRICKER *et al.*, 2008b). A supressão de *ace1* resultou em um aumento na expressão de todos os genes principais das celulasas e hemicelulasas nas culturas induzidas por sofrorse e celulose, confirmando que ACE1 atua como um repressor da expressão das celulasas e xilanasas (ARO *et al.*, 2003) e de *xyl1* durante o crescimento em D-xilose (MACH-AIGNER *et al.*, 2008).

O complexo HAP2/3/5 é considerado necessário para originar uma cromatina com estrutura aberta necessária à ativação da transcrição. O papel desse complexo pode ser de um potencializador da transcrição, aumentando a acessibilidade dos outros fatores ao promotor das celulasas (ZEILINGER *et al.*, 2003). ZOU *et al.*, (2012) demonstraram que a substituição em *T. reesei* dos sítios de ligação do CRE1, dentro do promotor *cbh1*, pelos sítios de ligação do ativador da transcrição, levou a uma melhoria da eficiência do promotor.

A expressão dos genes das celulasas e hemicelulasas, em *T. reesei*, não ocorrem na presença de glicose. Dois mecanismos são responsáveis por este fenômeno: a exclusão do indutor e a repressão por glicose (ILMÉN *et al.*, 1997; ZEILINGER *et al.*, 2003). A repressão pela glicose especifica uma regulação transcricional que controla o uso preferencial dos substratos, tais como D-glicose ou outros monossacarídeos, cujo catabolismo fornece um elevado rendimento de ATP (ILMÉN E PENTTILA, 1996; DOWZER E KELLY, 1991).

Apesar dos avanços, mais pesquisas são ainda necessárias para se conhecer completamente os mecanismos moleculares de regulação da expressão gênica, das celulasas e hemicelulasas, em *T. reesei*. Seu esclarecimento pode fornecer uma base para o desenvolvimento racional de linhagens, e/ou processos que conduzam a uma eficiente produção de enzimas para aplicação em biorrefinarias.

3.6 Indução pela Lactose em *Trichoderma reesei*

O *Trichoderma reesei* é o principal fungo filamentoso utilizado industrialmente na produção de celulasas e hemicelulasas utilizando a lactose como indutor. Diversos estudos sobre a fisiologia deste micro-organismo e do catabolismo da lactose e formação das enzimas têm sido realizados, com o objetivo de conhecer as estratégias utilizadas por esse fungo para a assimilação da lactose. Os fungos apresentam duas diferentes maneiras para iniciar a utilização da lactose, que consistem na: (i) hidrólise extracelular e subsequente absorção dos

monômeros resultantes, e (ii) absorção do dissacarídeo e subsequente hidrólise intracelular, expostas na Figura 3.8 (SEIBOTH *et al*, 2007).

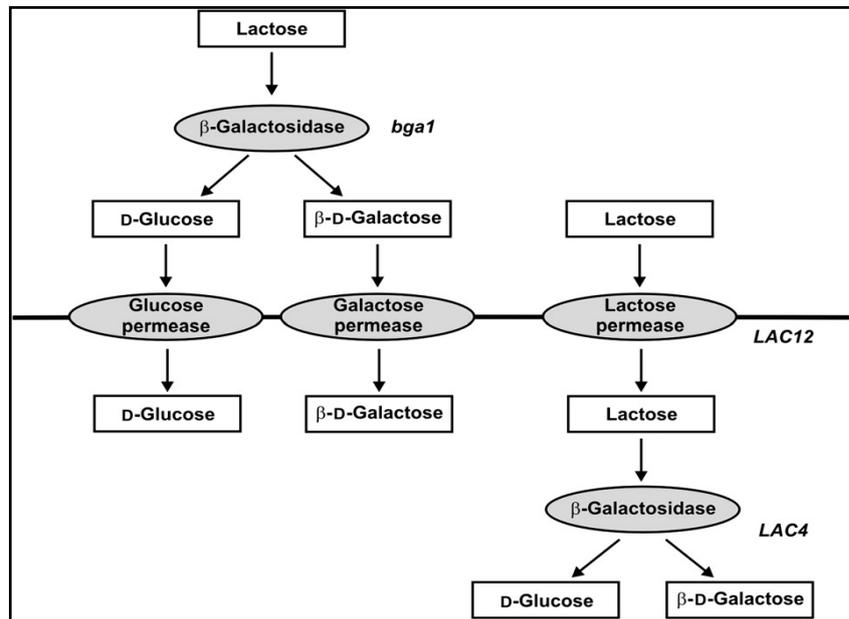


Figura 3.8: Formas de assimilação da lactose (SEIBOTH *et al*, 2007).

A análise do genoma dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* e *Fusarium graminearum* sugere que esses micro-organismos não possuam a β -galactosidase (*bga1*) extracelular, e por isso internalizem a lactose por meio de uma lactose permease (LAC12), e hidrolisem a lactose intracelularmente utilizando a β -galactosidase intracelular (LAC4) (FEKETE *et al*, 2002). Em contraste, a hidrólise da lactose em *Trichoderma reesei* ocorre no meio extracelular com a atuação da β -galactosidase (*bga1*), sendo captados os monômeros resultantes D-glicose e D-galactose pela glicose permease e Galactose permease, respectivamente (SEIBOTH *et al*, 2005).

Os monômeros resultantes da hidrólise da lactose são metabolizados por vias distintas. A D-glicose entra diretamente na via glicolítica, enquanto que a D-galactose pode seguir duas vias diferentes: a via de Leloir ou uma via alternativa, apresentadas na Figura 3.9.

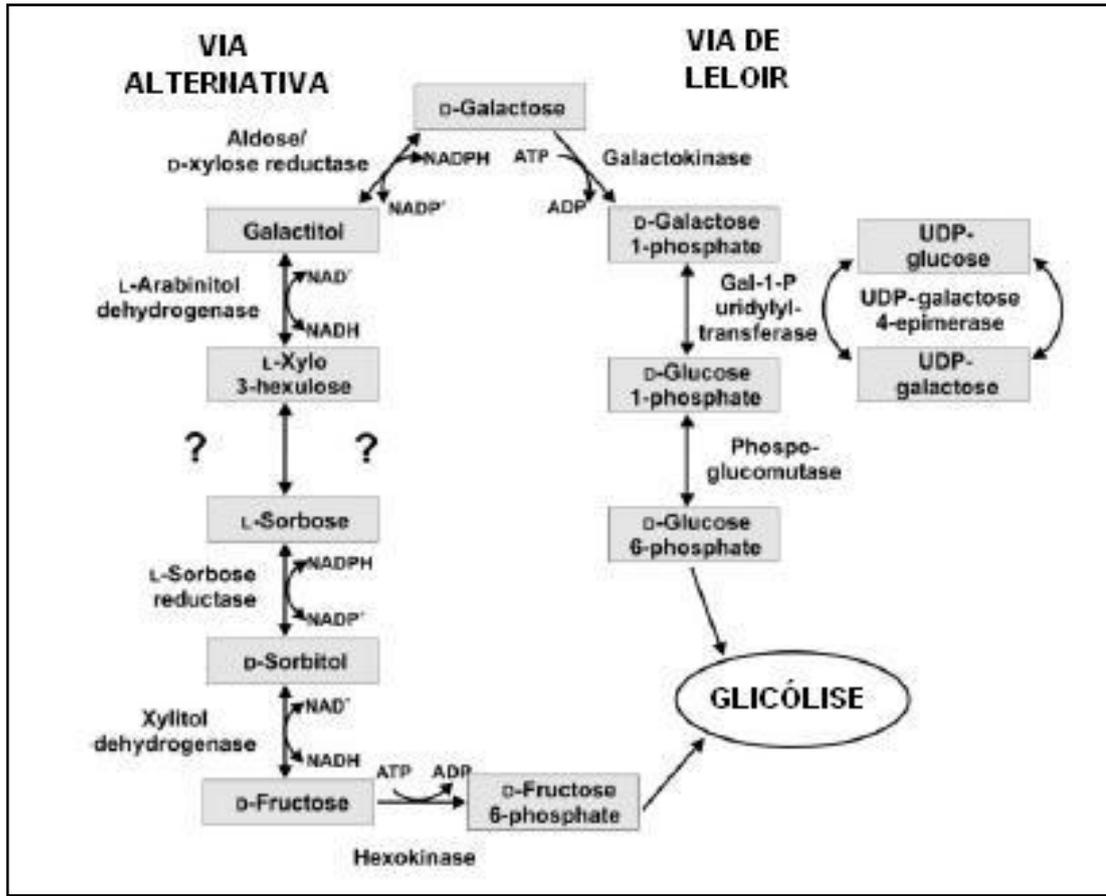


Figura 3.9 Principais vias do catabolismo da D-galactose (Adaptado de FEKETE *et al*, 2007).

Na maioria dos eucariotos a D-galactose é convertida a D-glicose-1-fosfato pela via de Leilor antes de entrar na via glicolítica (HOLDEN *et al*, 2003). A via de Leilor consiste de uma sequencia de etapas enzimáticas catalisadas por galactoquinase (GAL1), uridililtransferase galactose-1-fosfato (GAL7) e UDP-galactose-4-epimerase (GAL10) (SEIBOTH *et al*, 2007). Uma característica fisiologicamente importante da galactoquinase é a especificidade para a α -D-galactose que é produzida pela Aldose-1-epimerase, através da mutarrotação da β -D-galactose.

Em leveduras, tais como *S. cerevisiae* e *K. lactis* os domínios para a epimerase são encontrados no gene bifuncional *gal10*, enquanto que, em procariotos, tais como *E. coli*, a aldose-1-epimerase é codificada por um gene separado (BHAT E MURTHY, 2001; RUBIO – TEXEIRA, 2005). A ausência ou baixa atividade desta enzima poderia ser uma razão para o catabolismo lento da lactose por causa do tempo necessário para mutarrotação não enzimática, que em 30 ° C e pH 6,5-7,0 leva várias horas, de acordo com estudos realizados por PETTERSSON e PETTERSSON (2001).

As leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* utilizam a via de Leloir exclusivamente para o catabolismo da D-galactose, portanto, todos os genes *gal* são essenciais para o crescimento nesse substrato (SLEPAK *et al*, 2005). Algumas cepas de *Trichoderma reesei* são capazes de crescer em meio com D-galactose, embora nenhuma atividade de galactoquinase fosse encontrada (SEIBOTH *et al*, 2004). ROBERTS (1963, 1970) descreveu a utilização de uma via alternativa para a utilização da D-galactose em *Aspergillus nidulans*, que se inicia com a redução desse monômero para galactitol.

O percurso catabólico, em *T. reesei*, se inicia com a atuação da enzima D-xilose redutase (*xyl1*), que catalisa a redução da D-galactose a galactitol, utilizando o NADPH como cofator. Esta enzima também participa da redução da D-xilose e L-arabinose. A etapa seguinte é a oxidação do galactitol a L-xilo-3-hexulose, catalisada pela L-arabinitol desidrogenase (*lad1*), dependente do NAD (SEIBOTH *et al*, 2007).

FEKETE *et al* (2004) mostraram que, em *A. nidulans*, a L-sorbose era acumulada quando cultivada em D-galactose, e este acúmulo foi eliminado desta linhagem com a perda da atividade da L-arabinitol desidrogenase, o que sugere que a L-sorbose é outro metabolito desta via. O metabolismo da L-sorbose prossegue com sua redução a D-sorbitol, catalisada pela L-sorbose redutase, e subsequente oxidação a D-frutose, onde atua a xilitol desidrogenase (*xdh1*). Em seguida, a enzima hexoquinase (*hvk1*) catalisa a fosforilação da D-frutose a D-frutose-6-fosfato, que entra na via glicolítica.

Utilizando culturas de *T. reesei* em meios com D-galactose, galactitol e lactose como fonte de carbono limitante, KARAFFA *et al* (2006) mostraram que os níveis de indução da β -galactosidase está correlacionada com a taxa de crescimento e que as maiores atividades desta enzima foram observadas nos meios com galactitol e D-galactose. Mostraram, também, que o indutor da expressão da β -galactosidase é formado na via alternativa do metabolismo da D-galactose, consistindo no galactitol o verdadeiro indutor.

A expressão de celulasas em *T. reesei* durante seu crescimento em meio com lactose revelou-se como um processo dependente da taxa de crescimento. KARAFFA *et al* (2006) observaram que a maior expressão das enzimas celulolíticas foi encontrada em baixas taxas de crescimento. Um baixo nível de atividade da β -galactosidase extracelular é essencial para a expressão de celulasas, enquanto que níveis mais elevados dessa enzima reprimem a formação das celulasas (SEIBOTH *et al*, 2005).

A deleção do primeiro gene da via de Leloir (*gal1*) reduz drasticamente a expressão dos genes das celulasas durante o crescimento em lactose, enquanto que uma deleção da etapa subsequente codificado por *gal7* não apresentou efeito significativo sobre a indução de

celulase, portanto a indução, por lactose, da transcrição dos genes que codificam as celulasas requer atividade da galactoquinase (SEIBOTH *et al*, 2004). A via alternativa do catabolismo da D-galactose também é de grande importância para o metabolismo da lactose, estudos realizados por SEIBOTH *et al* (2007) mostraram que a indução dos genes das celulasas também é dependente de outra enzima a D-xilose redutase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado nas fermentações foi a linhagem *Trichoderma reesei* RUT C-30, cedido pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

A propagação do micro-organismo e obtenção dos esporos foi realizada a partir do cultivo em placas de Petri (Figura 4.1), utilizando o meio de manutenção PDA (*Potato Dextrose Agar*), cuja composição está descrita na Tabela 4.1. Foram utilizados 0,1 mL da suspensão microbiana em placas contendo 10 mL do meio PDA, em seguida, com o auxílio da alça Drigalski, a suspensão foi uniformizada sob a superfície das placas, que posteriormente foram postas em estufa a 30°C durante sete dias. Após o crescimento, as placas foram mantidas sob-refrigeração a 5°C.

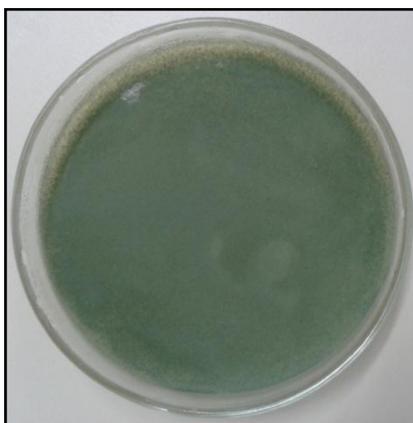


Figura 4.1 Cultura de *Trichoderma reesei* RUT C.

Tabela 4.1 - Composição do meio PDA (*Potato Dextrose Agar*).

Composição	Concentrações (g L ⁻¹)
Extrato de Batata	200
Glicose ou Dextrose	20
Ágar	15

4.2 Meios de Cultivo

A composição do meio de cultivo utilizado para o crescimento e produção de enzimas, descrito na Tabela 4.2, foi formulada a partir da composição elementar média, em base seca, do micro-organismo (STANBURY *et al.*, 1995), de forma que a fonte de carbono fosse o substrato limitante. As fontes de carbono investigadas foram: lactose (Dinâmica), xilana (Sigma-Aldrich), pectina (Sigma-Aldrich), celulose microcristalina (Merck), melão (resíduo da indústria sucroalcooleira), hidrolisado hemicelulósico (fração líquida resultante do tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar) e palma forrageira.

Tabela 4.2 - Composição do meio de cultivo.

Reagentes	(g L ⁻¹)	Solução de sais	
		Reagentes	(g L ⁻¹)
Fonte de Carbono	5		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,1		
KH ₂ PO ₄	0,59		
CaCl ₂	0,12		
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,15	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,005
Peptona	0,75	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,002
Extrato de levedura	0,25	MnSO ₄ . H ₂ O	0,0016
Tween 80	0,2 mL/L	ZnSO ₄ . H ₂ O	0,0014
Solução estoque de sais	5 mL/L		

* A formulação do meio foi calculada de acordo com a composição química de fungos (% por peso seco) STANBURY *et al.*, 1995.

Os meios a base de lactose e melão tiveram todos os componentes solubilizados em água destilada, já o meio a base de hidrolisado teve seus componentes diluídos no próprio hidrolisado, onde a fonte de carbono já estava presente. Os meios, depois de prontos, foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.3 Procedimento Experimental

4.3.1 Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi originado a partir do processo de moagem e extração do caldo na Usina Central Olho D'água, localizada no município de Camutanga no Estado de Pernambuco. Esse material foi tratado hidrotêrmicamente, à temperatura de 185 °C, por 16 minutos, em reator descontínuo com capacidade de 20 litros (REGMED AU/E-20), com sistema de mistura por rotação completa (Figura 4.2). Para o tratamento, foram utilizados 500 gramas de bagaço de cana-de-açúcar, em massa seca, e 10 litros de água destilada.

Após o tratamento, duas frações foram obtidas (Figura 4.3): uma sólida (celulignina) e uma líquida (hidrolisado hemicelulósico). O hidrolisado foi separado dos resíduos sólidos, com auxílio de filtro de pano, e posteriormente armazenado em garrafas âmbar no congelador até a sua utilização, para evitar a degradação dos componentes fotossensíveis presentes. A composição do hidrolisado hemicelulósico foi obtida através de análise cromatográfica, descrita na Tabela 4.3.



Figura 4.2 Reator descontínuo (REGMED, AU/E-20) utilizado para obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

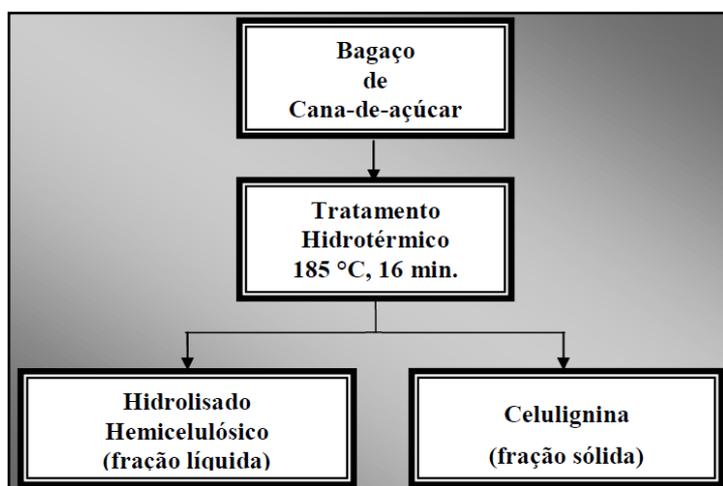


Figura 4.3 Fluxograma com as etapas do tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção do hidrolisado hemicelulósico.

4.3.2 Produção de Enzimas

Os experimentos para acompanhamento da produção de enzimas ocorreram em biorreator de bancada instrumentado de 3L (New Brunswick Scientific, BioFlo 110) (Figura 4.4), no qual foram adicionados 2 litros do meio de cultivo, descrito na Tabela 4.2, variando-se apenas as fontes de carbono: lactose, melação e hidrolisado hemicelulósico.

Os cultivos ocorreram com 500 rpm de agitação, 2 vvm de aeração, 28 °C de temperatura e pH 5,0, por um período de 72 horas. O controle do pH foi realizado por meio da adição automática de solução de ácido sulfúrico 3 M e hidróxido de sódio 3 M, e, para o controle da espuma, utilizou-se o antiespumante polipropilenoglicol P 2000 (Fluka Analytical) (SILVA, 2010).



Figura 4.4 Biorreator de bancada (New Brunswick Scientific, BioFlo 110) utilizado na produção de enzimas.

Para o cultivo do inóculo foi utilizada a lactose (produção em lactose) e glicose (produção em melação e hidrolisado) como fontes de carbono na concentração de 5 gL⁻¹. Os frascos foram incubados em mesa agitadora rotativa (New Brunswick Scientific, modelo C25KC), apresentada na Figura 4.5, com agitação de 250 rpm e temperatura de 30°C, por um período de 36 horas. Após esse período, 10% de inóculo foram transferidos ao biorreator.

O acompanhamento da cinética de produção de enzimas e o crescimento microbiano do processo foram observados, por meio de amostras coletadas não excedendo um total de 20% do volume inicial. Em seguida, essas amostras foram filtradas para determinação da concentração de biomassa, análise cromatográfica e determinação de atividades enzimáticas.

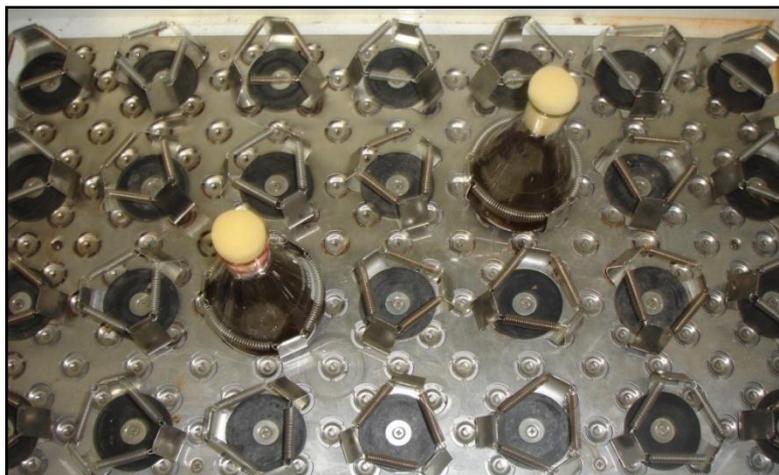


Figura 4.5 Mesa agitadora rotativa (New Brunswick Scientific, modelo C25KC) utilizada no cultivo dos inóculos.

4.3.3 Secretoma

Um segundo grupo de experimentos foi realizado com algumas alterações nas condições apresentadas acima, com o objetivo de isolar proteínas extracelulares para análise comparativa de secretomas. Para a realização dos cultivos foi utilizado um biorreator de 1,3L do mesmo modelo do citado anteriormente.

Nele foram adicionados apenas 500 mL do meio de cultivo (Tabela 4.2) e as fontes de carbono utilizadas foram: lactose, xilana, pectina, celulose microcristalina e a palma forrageira (seca e moída). Todos os meios tiveram seus componentes diluídos em água destilada e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

As condições, nas quais ocorreram os cultivos foram: 500 rpm de agitação, 0,5 vvm de aeração, 28°C de temperatura e pH 5,0, por um período de 50 horas. O controle do pH e da formação de espuma também foram controlados da mesma maneira apresentada acima.

A preparação do inóculo foi padronizada utilizando-se glicerol como fonte de carbono, na concentração de 5 g L⁻¹. Os frascos foram incubados em mesa agitadora com rotação de

250 rpm, a 30°C, por um período de 36 horas. Após esse período, 10% de inóculo foi transferido ao biorreator.

A cinética de produção e crescimento foi acompanhada, igualmente, através da coleta de amostras, e quantificadas pelos mesmos métodos analíticos citados abaixo. O conteúdo obtido ao final dos cultivos foi utilizado para o isolamento de proteínas extracelulares e realização de análise proteômica.

4.4 Métodos Analíticos

4.4.1 Determinação da concentração de biomassa

A biomassa fúngica foi obtida pelo método de peso seco. Amostras de 10 mL foram filtradas em membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro, previamente pesadas em balança analítica, utilizando-se um sistema de filtração a vácuo (Millipore). Após lavagem com água destilada, as membranas, contendo a biomassa, foram secas em estufa a 80°C por 24 horas. Depois da secagem, as membranas foram postas em dissecador até atingirem a temperatura ambiente, sendo, em seguida, pesadas novamente.

4.4.2 Determinação das atividades enzimáticas

Os ensaios enzimáticos, detalhados a seguir, foram determinados de acordo com metodologia padrão descritos pela IUPAC (GHOSE, 1987), com algumas modificações. Tais procedimentos são adequados para determinação de celulases de fungos. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. Uma Unidade Internacional de atividade enzimática é definida pela produção de um µmol de produto/minuto.

4.4.2.1 Atividade em papel de filtro

O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro.

Atividade FPU

Para o ensaio enzimático, tiras do papel de filtro Whatman nº1, medindo 1,0 cm x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg), enroladas em formas de espiral, foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais se adicionou 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM. Os tubos foram colocados em banho termostático (TECNAL, TE-2005) (Figura 4.6) a 50 °C, por 1 minuto, antes de se adicionar a enzima, para que ocorresse o equilíbrio da temperatura. Após 1 minuto, adicionou-se 0,5 mL de amostra, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

No ensaio para controle da enzima, foi adicionado 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e 0,5 mL de enzima em tubos de ensaio, sem a adição do substrato (papel de filtro). O branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizando-se 1,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM.

As reações foram conduzidas a 50 °C, em banho termostático, durante 60 minutos. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela adição de 3,0 mL de DNSA (ácido 3,5-dinitro salicílico). Todos os tubos foram submetidos a um banho em água a 100 °C, durante 5 minutos, e, em seguida, resfriados até a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas com 20 mL de água destilada, procedendo-se, então, à leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) (Figura 4.7), a 540 nm. A determinação da concentração dos açúcares redutores em cada ensaio enzimático foi realizada por meio da utilização de uma curva de calibração previamente preparada.



Figura 4.6 Banho termostático utilizado nos ensaios de atividade enzimática (TECNAL, TE-2005)

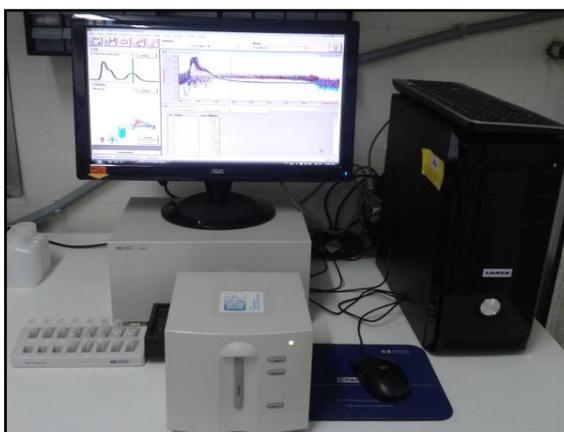


Figura 4.7 Espectrofotômetro utilizado nos ensaios de atividade enzimática (Hewlett-Packard, modelo 8453)

A atividade FPU é a forma correta de se dosar a atividade em papel de filtro. Porém, devido às baixas atividades obtidas durante os cultivos, a metodologia acima não pode ser seguida, pois era necessário que fossem liberados 2 mg de glicose para que a FPU fosse realizada. Diante disso, foi dosada a atividade FPase, descrita abaixo.

Atividade FPase

Para a realização dos ensaios enzimáticos, tiras de papel de filtro Whatman nº1, medindo 1,0 cm x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg), enroladas em forma de espiral, foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 1,0 mL do tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). Os tubos foram colocados em banho termostático a 50 °C, por 1 minuto, antes de se adicionar a amostra, para que ocorresse o equilíbrio da temperatura do substrato. Após 1 minuto, adicionou-se 0,5 mL da amostra, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

Em paralelo, foi realizado o ensaio para controle da enzima o qual teve como objetivo a determinação da concentração inicial de açúcares redutores presentes na amostra de enzima. Neste caso, foram colocados nos tubos 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 0,5 mL da amostra. O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro, era composto apenas de 0,5 mL de tampão citrato de sódio.

Todas as reações ocorreram a 50° C, em banho termostático (TECNAL, TE-2005), durante 60 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela retirada de 0,5 mL da mistura reacional, que foi colocada imediatamente em tubos com 0,5 mL do reagente DNSA (ácido 3,5-dinitro salicílico), utilizado para a quantificação dos açúcares redutores de acordo com MILLER (1959). O mesmo procedimento foi feito para os tubos que continham os controles da enzima e o branco.

Para dosar os açúcares redutores totais, os tubos foram colocados em banho a 100°C por 5 minutos, e, em seguida, resfriados até a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) em banho de gelo. As amostras foram diluídas adicionando-se 6,5 mL de água destilada, procedendo-se, então, à leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 540 nm. A determinação da concentração dos açúcares redutores em cada ensaio enzimático foi realizada por meio da utilização de uma curva de calibração previamente preparada.

4.4.2.2 Atividade em carboximetilcelulose (CMCase)

Este método se baseia na determinação de açúcares redutores liberados durante a hidrólise da carboximetilcelulose (CMC).

Nesta atividade, meio reacional foi composto por 0,25 mL de uma solução de CMC 4% (p/v) e 0,25 mL da amostra (diluída em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), quando necessário). Os tubos controles da enzima não continham o substrato, apenas 0,25 mL da amostra e 0,25 mL do tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, era composto por 0,25 mL da solução de CMC 4% e 0,25 mL de tampão citrato de sódio.

Todos os tubos foram incubados a 50° C, em banho termostático (TECNAL, TE-2005) durante 10 minutos. Após este tempo, reação enzimática foi interrompida pela adição imediata de 0,5 mL de DNSA (ácido 3,5-dinitro salicílico), que, além de interromper a reação enzimática, possibilitou a realização da dosagem da concentração de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática.

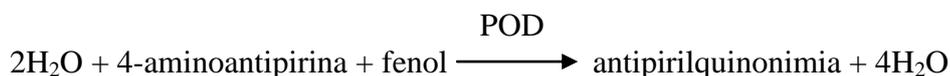
Para determinar a dosagem dos açúcares redutores, os tubos foram colocados em banho Maria a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados até atingir a temperatura ambiente, em banho de gelo. As amostras foram diluídas com 6,5 mL de água destilada e, em seguida, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 540 nm, sendo a determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático, realizada por meio da utilização de uma curva de calibração de glicose.

4.4.2.3 Atividade de β -glicosidase

Para a determinação da atividade β -glicosidase utilizou-se uma solução de celobiose a 15 mM como substrato. A determinação da concentração de glicose liberada pela β -glicosidase foi realizada através da utilização de um kit de análise de glicose (Reagente GOD-POD, BioSystems®), o qual se baseia na reação das enzimas glicose oxidase e peroxidase. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



Por sua vez, o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação da enzima peroxidase. O produto final dessa reação é a antipirilquinonimina de coloração vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. Tal reação está representada a seguir.



Para os ensaios enzimáticos, foram utilizados tubos de ensaio contendo 0,5 mL da solução de celobiose 15 mM e 0,5 mL da amostra. Aos tubos com os controles foram adicionados 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 0,5 mL da amostra. O branco foi formado de 1,0 mL do reagente GOD-POD, o qual foi utilizado para zerar o espectrofotômetro.

Os tubos foram incubados a 50°C, em banho termostático (TECNAL, TE-2005), durante 30 minutos. Após este tempo a reação foi interrompida após a imersão dos tubos em banho a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos e resfriados em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente.

Para a determinação da glicose produzida, foram adicionados 0,01 mL da mistura reacional em tubos com 1,0 mL do reagente GOD-POD. Os tubos foram incubados a 37°C, novamente em banho termostático durante 15 minutos. Em seguida, as leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 505 nm. A determinação da concentração de glicose liberada em cada reação enzimática foi realizada utilizando-se uma curva de calibração de glicose.

4.4.2.4 Atividade xilanase

Esse método se baseia na determinação de açúcares redutores liberados durante a hidrólise da xilana.

Para a determinação da atividade enzimática da xilanase, foram colocados em tubos de ensaio 1,0 mL de solução de xilana 1% e 0,5 mL da amostra. Aos tubos controles foram adicionados 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 0,5 mL da amostra. O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi composto apenas de 0,5 mL da solução de xilana 1%.

Todos os tubos, com a mistura reacional, foram incubados a 50°C, em banho termostático (TECNAL, TE-2005), durante 5 minutos. Ao final deste tempo, 0,5 mL de cada uma das misturas foi colocado imediatamente em outros tubos de ensaio contendo 0,5 mL de reagente DNSA. Para dosar os açúcares redutores totais, os tubos foram colocados em banho Maria a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados até atingir a temperatura ambiente, em banho de gelo. Antes de realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 540 nm, foram realizadas diluições das amostras com 6,5 mL de água destilada. A determinação da concentração de xilose liberada em cada reação enzimática foi realizada, usando-se uma curva de calibração de xilose.

4.4.3 Determinação da concentração de açúcares

A quantificação de açúcares foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando HPLC (Agilent Technologies, Série 1100), com detecção por índice de refração, apresentado na Figura 4.8. Para esta análise, foi utilizada uma coluna Aminex® HPX87H (BIO-RAD) com dimensões de 300 mm x 7,8 mm, ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 60°C. A fase móvel foi preparada com água ultrapura e, posteriormente, filtrada em membrana microporosa de 0,2 µm de diâmetro de poro. Para a quantificação foi utilizado o método do padrão externo, através de curvas de calibração. Todas as amostras e os padrões foram diluídos em fase móvel, filtrados em membrana 0,2 µm e injetados automaticamente um volume de 5 µL.



Figura 4.8 HPLC para determinação das concentrações dos açúcares presentes nos meios de cultivo (Agilent Technologies, série 1100).

4.4.4 Isolamento de proteínas extracelulares

Para a análise futura do secretoma, as amostras foram coletadas ao final dos cultivos, na fase estacionária de crescimento do micro-organismo. Inicialmente, as células foram removidas por centrifugação, utilizando-se uma centrífuga refrigerada (Analítica, Rotina 420R Hettich Zentrifugan) (Figura 4.9), a 7000 x g por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi clarificado por filtração a vácuo através de membrana de 0,2 µm de diâmetro de poro, utilizando um sistema de filtração a vácuo (Millipore). Em seguida, o filtrado resultante foi submetido a diálise por 26 horas. Para a realização desse processo, utilizou-se membrana de celulose para diálise em tubo, Dialysis tubing cellulose membrane (Sigma-Aldrich). Após a diálise, as amostras foram concentradas por secagem com a utilização da técnica de liofilização (ADAV *et al.*, 2012).

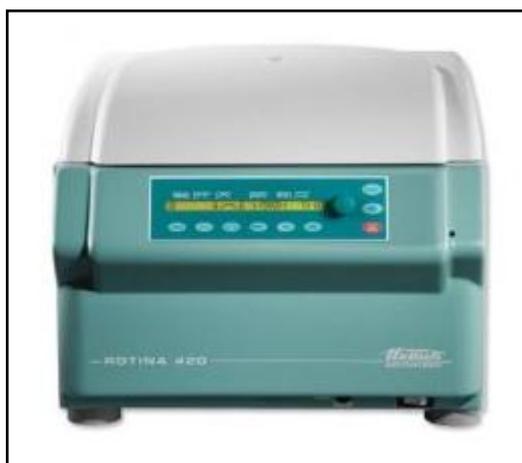


Figura 4.9 Centrífuga refrigerada (Analítica, Rotina 420R Hettich Zentrifugan,).

4.4.4.1 Quantificação das Proteínas

A concentração das proteínas presentes em cada amostra foi determinada com a utilização do kit BCA (Thermo Scientific Pierce® BCA Protein Assay), que se baseia na detecção colorimétrica da reação do ácido bicinconínico (BCA) com o cátion cuproso (Cu^{1+}), obtido pela redução de Cu^{2+} por proteínas em meio alcalino, segundo a metodologia de LOWRY (1951). A proteína albumina bovina sérica (BSA) foi utilizada para se construir uma curva padrão.

Foram pesados 0,2 g das amostras liofilizadas em micro tubos e adicionados 600 µL de água ultrapura autoclavada. As amostras foram agitadas por 20 segundos à temperatura

ambiente e diluídas 50 vezes. Para formação do reagente AB, foi utilizada a proporção de 50 partes do reagente A para 1 parte do reagente B, de acordo com o protocolo do fabricante. Em uma microplaca de Elisa, foram adicionados 200 μ L do reagente AB e 25 μ L da amostra em cada poço. Posteriormente, a microplaca foi colocada em estufa a 37 °C durante 30 minutos e lidas em espectrofotômetro com absorvância de 562 nm (BIORAD, xMark™ Microplate Spectrophotometer). A quantificação das amostras foi realizada em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de Celulases e Hemicelulases por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios industriais

O fungo filamentosso *T. reesei* é um atraente produtor de enzimas celulolíticas, que são usadas para a despolimerização de polissacarídeos de biomassas. Estudos prévios, discutidos no Item 3.6, indicaram que a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas de *T. reesei* é regulada em nível transcricional e, também, é dependente da fonte de carbono. Os genes das principais celulases, endoglucanases (CMCase), exoglucanases (FPase) e hemicelulases (xilanase) são induzidos, além da lactose, por outros dissacarídeos como a celobiose e a sofrose e monossacarídeos como a xilose.

Nos itens 5.1.1-5.1.3, estão apresentados os resultados de produção de enzimas por *T. reesei* RUT C-30, obtidos neste trabalho, em diferentes meios industriais: lactose, melão e hidrolisado de hemicelulósico.

5.1.1 Cultivo de *T. reesei* RUT C-30 em lactose

O crescimento celular, o consumo do substrato e a produção de enzimas de *T. reesei* RUT C-30 em lactose foram avaliados em cultivos conduzidos em biorreator de bancada nas condições descritas no Item 4.3.2.

Na Figura 5.1, estão apresentados os resultados de crescimento e consumo de substrato. Após 7 horas de cultivo, observa-se que o micro-organismo entra na fase exponencial de crescimento. O meio apresenta aproximadamente 3,6 g L⁻¹ de lactose, portanto, ainda existe uma quantidade considerável de substrato para que o micro-organismo utilize para o seu crescimento. Nesta fase, *T. reesei* apresentou uma velocidade máxima de crescimento, μ_{\max} , de 0,06 h⁻¹, observada na Figura 5.2.

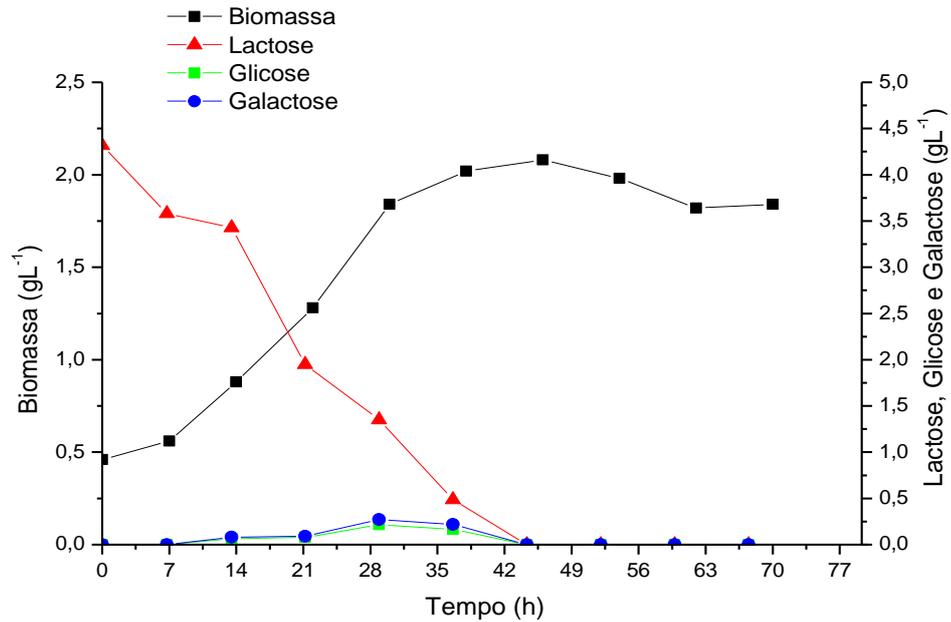


Figura 5.1 Cinética de crescimento e consumo de substrato durante o cultivo de *T. reesei* RUT C-30 em meio de lactose.

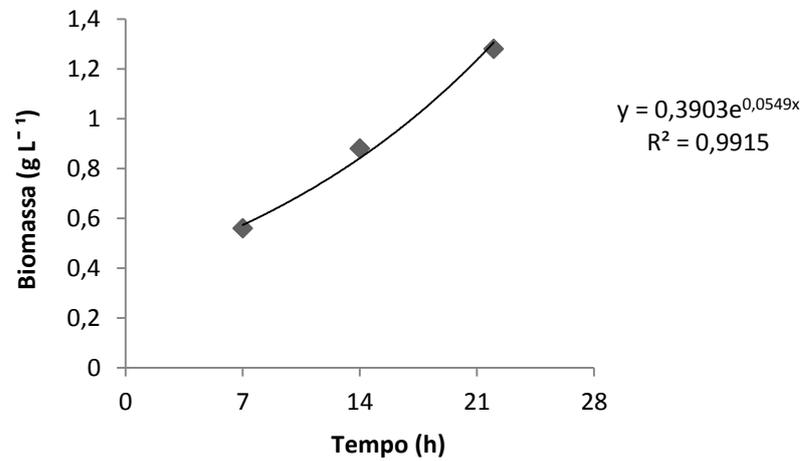


Figura 5.2 Crescimento de *Trichoderma reesei* RUT C-30 durante a fase exponencial em meio de lactose.

A partir de 14 horas, foi possível detectar a presença dos produtos da hidrólise da lactose (D-glicose e D-galactose) no meio, observando-se maior acúmulo na fase de desaceleração do crescimento. Com 46 horas de cultivo, observou-se que o micro-organismo atingiu uma concentração máxima de biomassa de $2,08 \text{ g L}^{-1}$ e que todo o substrato tinha sido consumido, resultando em um coeficiente de rendimento de biomassa em lactose, $Y_{x/s}$, de $0,38 \text{ g g}^{-1}$.

O perfil de produção de enzimas por *Trichoderma reesei* RUT C-30, em meio de lactose, está apresentado na Figura 5.3. Os valores máximos de atividades foram obtidos ao final dos experimentos, com 70 horas de cultivo, atingindo valores de FPase de $1,54 \text{ UI mL}^{-1}$, CMCase de $17,94 \text{ UI mL}^{-1}$, de xilanase de $12,7 \text{ UI mL}^{-1}$ e de β -glicosidase de $0,28 \text{ UI mL}^{-1}$. Esses valores foram obtidos utilizando-se uma concentração de aproximadamente 5 g L^{-1} de lactose.

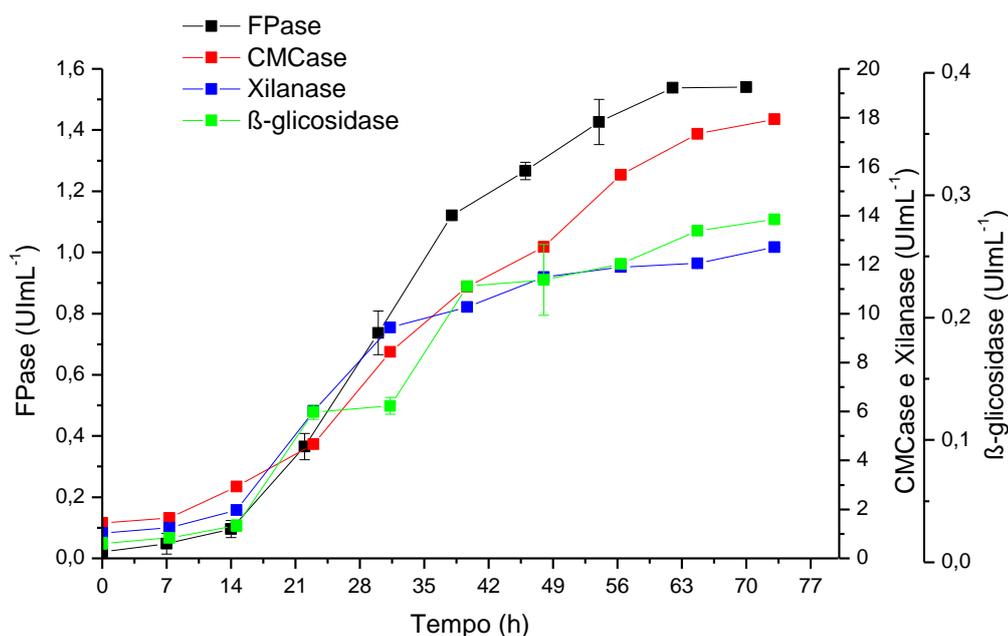


Figura 5.3 Perfil de produção de enzimas durante o cultivo de *T. reesei* RUT C-30 em meio de lactose.

DOMINGUES *et al.* (2001) obtiveram valores iguais de FPase utilizando uma concentração de lactose três vezes maior, 15 g L^{-1} . Estudos prévios de produção de enzimas celulolíticas por *T. reesei* RUT C-30, desenvolvidos por SILVA (2010) no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPE (LPB), apresentaram valor de atividade semelhante ($1,4$

UI mL⁻¹ de FPase), utilizando-se, também, uma concentração de 10 g L⁻¹ de lactose. O maior rendimento de FPase em concentrações mais baixas de lactose, obtido neste trabalho, corrobora, também, os resultados obtidos no LPB por Santos *et al.* (2009) com 30 g L⁻¹ e 10 g L⁻¹.

Estudos realizados por JUN *et al.* (2013) mostraram valores de atividades CMCase e xilanases de 6,58 e 4,91 UI mL⁻¹, respectivamente, bem menores em relação aos resultados obtidos por SILVA (2010) (CMCase de 43,81 UI mL⁻¹ e xilanase de 17,92 UI mL⁻¹), ambos utilizando uma concentração de lactose de 10 gL⁻¹.

A lactose é a fonte de carbono convencional mais usada na indústria, pois não só promove o bom crescimento, como também oferece uma boa indução para produção de enzimas celulolíticas por *T. reesei* (JUN *et al.*, 2013). Estudos realizados por FEKETE *et al.* (2007) mostraram que, provavelmente, um composto intermediário oriundo do metabolismo da lactose seja o responsável pela indução da produção de celulasas e hemicelulasas, chamado galactitol, como discutido no Item 3.6.

O metabolismo da lactose em *T. reesei* é iniciado pela enzima β -galactosidase que catalisa a hidrólise extracelular da lactose, liberando D-glicose, que entra diretamente na via glicolítica, e D-galactose, que pode ser catabolizada através da via de Leloir ou reduzida por D-xilose redutase a galactitol (FEKETE *et al.*, 2007). Como a indução da produção de enzimas celulolíticas é mediada, provavelmente, pelo galactitol, isso sugeriu que a assimilação de lactose por *T. reesei* pode depender menos da via de Leloir, já que o galactitol é formado numa via alternativa do metabolismo da D-galactose (JUN *et al.*, 2013).

5.1.2 Cultivo de *T. reesei* RUT C-30 em melão de cana-de-açúcar

Amido de milho, glicose, sacarose e melãos são utilizados como substratos para o crescimento, produção de enzimas, antibióticos e outros metabolitos secundários. No entanto, a produção é freqüentemente limitada devido a um efeito negativo exercido pela fonte de carbono. Este mecanismo de regulação é denominado repressão catabólica, estando amplamente distribuída entre sistemas microbianos, principalmente para garantir uma forma organizada e seqüencial de utilização de fontes de carbono, quando mais do que uma estiver presente no meio, como discutido no Item 3.5.

O crescimento celular e consumo do substrato de *T. reesei* RUT C-30 também foram avaliados em cultivos conduzidos em biorreator, utilizando-se, desta vez, o melaço como fonte de carbono (Figura 5.4).

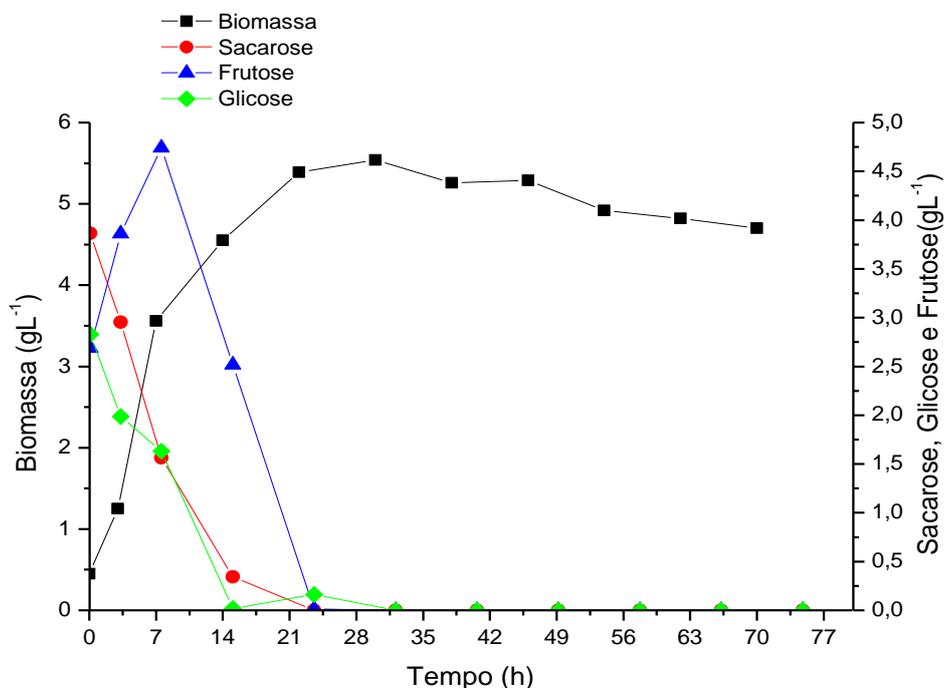


Figura 5.4 Cinética de crescimento e consumo de substrato durante o cultivo de *T. reesei* RUT C-30 em meio de melaço de cana-de-açúcar.

O micro-organismo consumiu, preferencialmente, a glicose e depois a frutose, que se acumulou com a hidrólise da sacarose. O valor máximo de biomassa encontrado foi de 5,3 g L⁻¹ com 30 horas de cultivo, correspondendo a um $Y_{x/s}$ de 0,52 g g⁻¹, evidenciando-se que o meio de cultivo contendo melaço oferece uma melhor condição para o crescimento de *T. reesei*. Como descrito na literatura e discutido no Item Item 3.5, *T. reesei* cresce bem em meios com açúcares simples.

Como esperado, observou-se um crescimento de *T. reesei* muito mais rápido, em comparação com o crescimento em lactose, com μ_{\max} de 0,26 h⁻¹ (Figura 5.5).

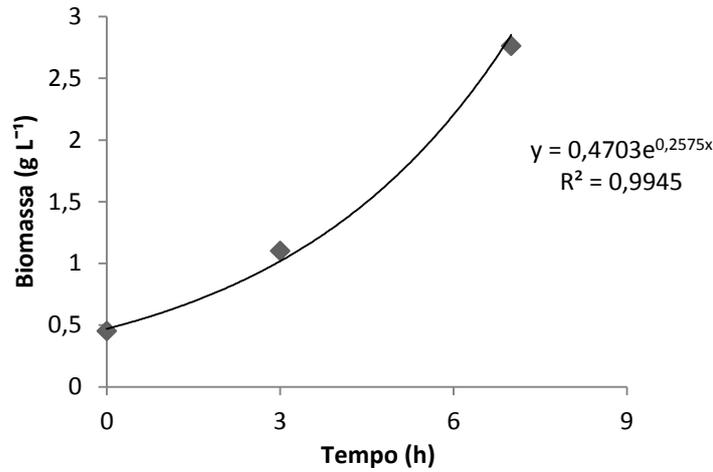


Figura 5.5 Crescimento de *Trichoderma reesei* RUT C-30 durante a fase exponencial em meio de melão de cana-de-açúcar.

O perfil de produção de enzimas por *T. reesei* RUT C-30, utilizando meio com melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono, está apresentado na Figura 5.6. Como era de se esperar, foram obtidos valores muito baixos de atividades enzimáticas, quando comparados aos valores de atividades obtidos no cultivo com lactose como fonte de carbono. Os valores de atividade obtidos foram: FPase de 0,025 UI mL⁻¹; CMCase de 0,22 UI mL⁻¹; xilanase de 0,23 UI mL⁻¹ e β -glicosidase de 0,03 UI mL⁻¹.

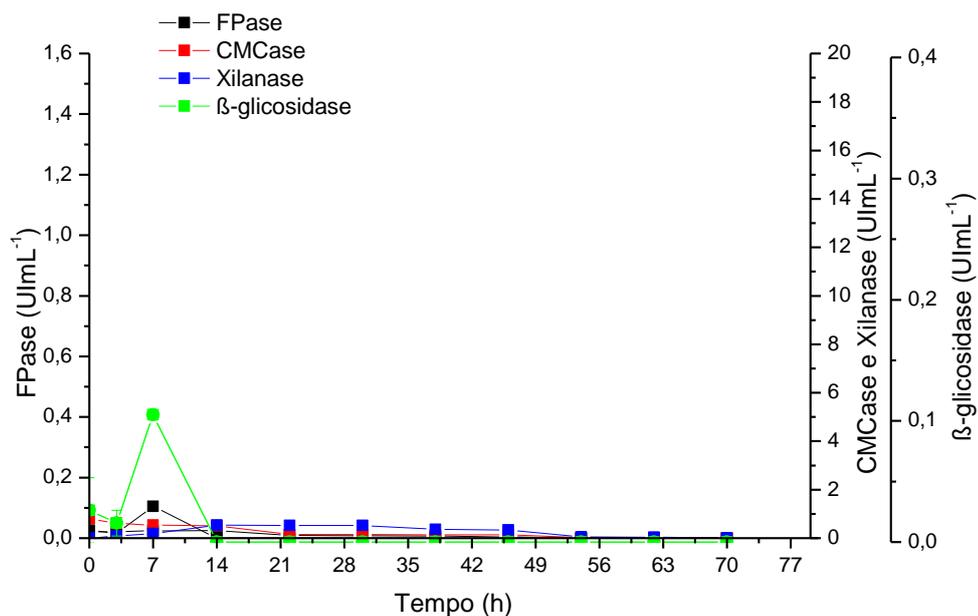


Figura 5.6 Perfil de produção de enzimas durante o cultivo de *T. reesei* RUT C-30 em meio de melão de cana-de-açúcar.

Esses baixos valores de atividades enzimáticas, apresentados no cultivo em meio com melaço, devem-se ao efeito de repressão catabólica causado pela glicose (Item 3.5). Sob esta condição, a célula cataboliza a melhor fonte de carbono (o que fornece mais rapidamente energia para o crescimento) presentes no meio. Simultaneamente, a síntese de enzimas utilizando outros substratos é reprimida até que o substrato primário esteja esgotado. Estudos prévios realizados por SANCHEZ E DEMAIN (2002), com *T. viride*, mostraram que não só glicose, mas também piruvato, succinato, malato, glutamato, glicerol, frutose, gluconato e ATP reprimem a indução das enzimas celulolíticas.

NISIZAWA *et al.* (1972) observaram que a repressão catabólica depende da concentração da fonte de carbono no meio. Como observado na Figura 5.1, a concentração de lactose (indutor) no meio foi bem maior que a concentração de glicose (repressor) resultante da hidrólise da lactose, por isso não se observou a repressão catabólica. Diferentemente, ocorreu no meio com melaço, pois as concentrações de sacarose, glicose e frutose (repressores) são altas, além de não apresentar compostos indutores da produção de celulasas, como é observado na Figura 5.4.

5.1.3 Cultivo de *T. reesei* RUT C-30 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico pode ser obtido por diversos métodos de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, como: a explosão a vapor, o pré-tratamento ácido ou alcalino e o hidrotérmico. O líquido resultante desses tratamentos pode ser utilizado para a produção de enzimas, pois contém açúcares fermentáveis em sua composição. Resultados obtidos com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar obtido por tratamento hidrotérmico, descrito no Item 4.3.1, estão apresentados abaixo.

No cultivo utilizando o hidrolisado hemicelulósico, não se observou praticamente a formação de biomassa, provavelmente, devido à alta sensibilidade de *T. reesei* RUT C-30 aos inibidores presentes no hidrolisado, como ácido acético, ácido fórmico, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural. As concentrações de açúcares e inibidores determinadas no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, obtido pelo tratamento hidrotérmico, estão apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.

Composição	Concentrações (g L ⁻¹)
Celbiose	0,10
Glicose	0,34
Xilose	3,86
Arabinose	0,09
Ác. Fórmico	0,16
Ác. Acético	1,51
HMF	0,22
Furfural	1,68

A Figura 5.7 apresenta a curva de crescimento do *T. reesei* e o consumo do substrato em meio com hidrolisado hemicelulósico. Observa-se que o micro-organismo apresentou valor máximo de biomassa de 0,3 g L⁻¹ e que não houve praticamente consumo do substrato.

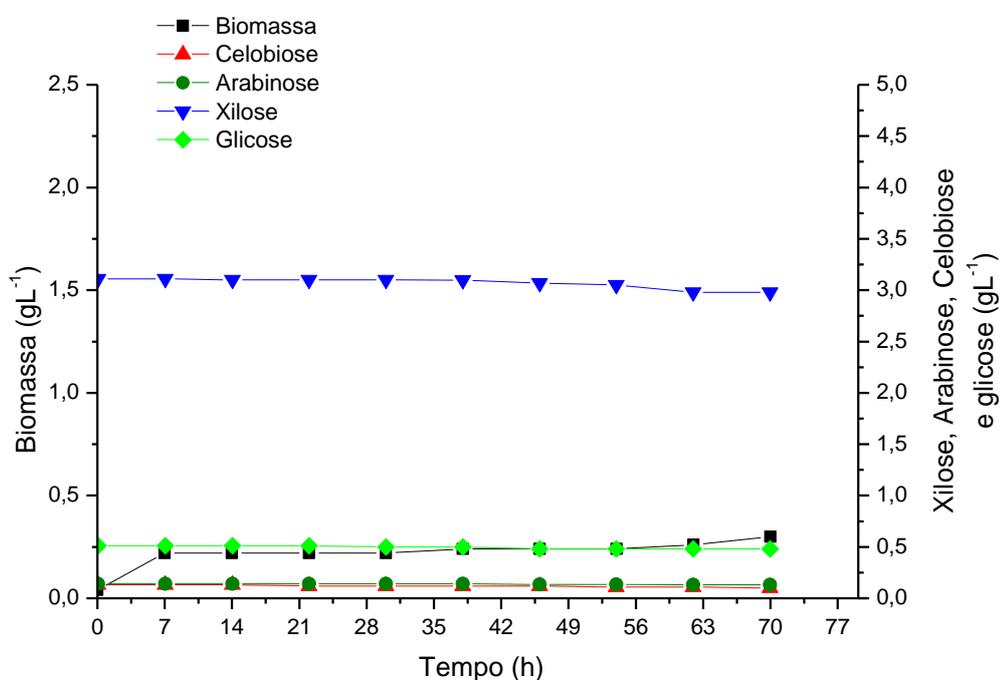


Figura 5.7 Consumo do substrato durante o cultivo de *T. reesei* RUT C-30 em meio à base de hidrolisado hemicelulósico.

A utilização de altas temperaturas, nos pré-tratamentos termoquímicos do bagaço de cana-de-açúcar, resulta na formação de inibidores originados da degradação dos açúcares, como o furfural, formado a partir da desidratação das pentoses (xilose e arabinose); 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consequência da desidratação das hexoses (glicose, manose e galactose); ácido fórmico, proveniente da degradação do HMF e ácido acético, formado pela desacetilação da hemicelulose (ALPER E STEPHANOPOULOS, 2009; YANG *et al.*, 2010).

Trabalhos prévios realizados por SÁ (2012), no Laboratório de Processos Biotecnológicos, investigaram os efeitos individuais e interativos dos inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (ácido fórmico, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) sobre linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e linhagens de *Zymomonas mobilis*, obtidas da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA). Nesses estudos, observou-se que todas as linhagens sofreram severa inibição pelo hidrolisado.

ALMEIDA *et al.*, (2009) também observaram que o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em hidrolisado hemicelulósico era prejudicado, visto que esses inibidores podem danificar a parede celular, reduzir a absorção de aminoácidos aromáticos do meio, inibir enzimas (álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase e aldeído desidrogenase), bem como prolongar a fase *lag* de crescimento (MUSSATO *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2010).

O hidrolisado hemicelulósico foi utilizado para promover a indução das hemicelulases, representada pela atividade xilanase, pelos xilo-oligossacarídeos e xilose. Como observado na Figura 5.8, o perfil de produção de enzimas exibiu valores muito baixos de FPase, CMCase e β -glicosidase, porém a xilanase apresentou valor de 1,40 UI mL⁻¹. Esse baixo valor foi obtido porque as poucas células presente no meio conseguiram assimilar um pouco da xilose, observado pela pequena variação da concentração da xilose (Figura 5.7).

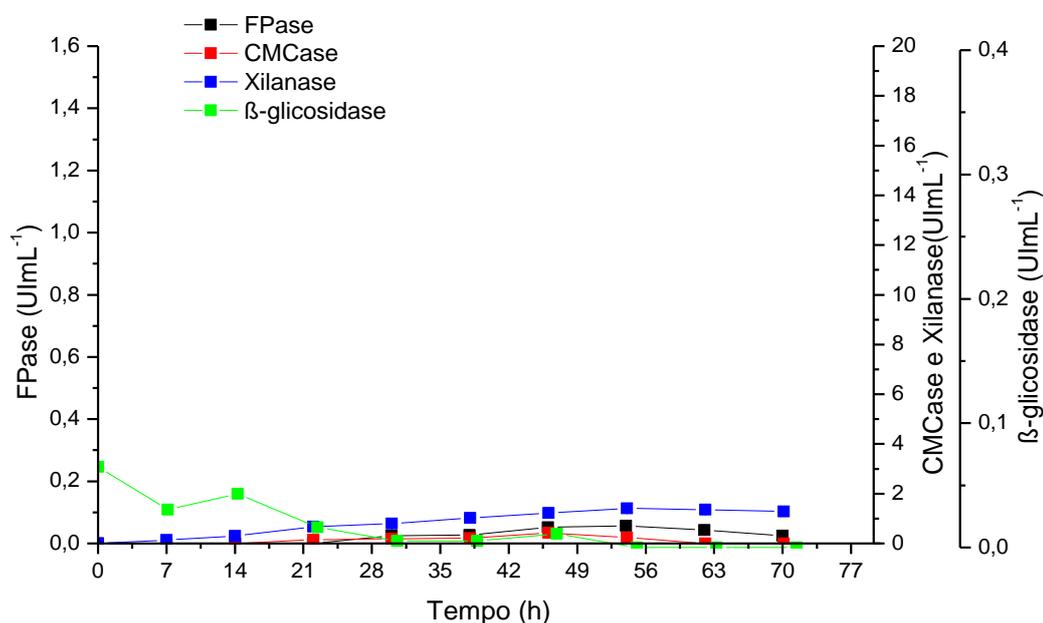


Figura 5.8 Perfil de produção de enzimas em meio à base de hidrolisado hemicelulósico.

Os valores das atividades enzimáticas, com os respectivos desvios padrões, e as concentrações dos substratos e celular nos meios com lactose, melão e hidrolisado, encontram-se apresentados no apêndice A.

5.2 Produção de celulases e hemicelulases por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em polissacarídeos constituintes de biomassas

Experimentos foram realizados com o objetivo de se isolar proteínas extracelulares produzidas em meios com os polissacarídeos celulose, xilana, pectina, e a palma forrageira, para análise comparativa do perfil protéico diferencial no secretoma de *T. reesei* RUT C-30 frente a esses diferentes meios.

5.2.1 Meio a base de celulose microcristalina

A abundância de celulose na natureza levou à evolução de diversos organismos celulolíticos capazes de degradar a celulose (MATHEW *et al.*, 2008). A maioria das bactérias anaeróbias, tais como *Clostridium thermocellum*, utilizam grandes complexos

multienzimáticos chamado celulosomas (WILSON, 2011; KUMAR E MURTHY, 2013). O principal mecanismo de degradação da celulose muito utilizado pelos micro-organismos aeróbios, como o fungo filamentosso *T. reesei*, é a secreção extracelular de celulases livres.

O perfil de produção de enzimas por *T. reesei* RUT C-30 em meio com celulose, obtido neste trabalho, pode ser observado na Figura 5.9. Os baixos valores de FPase ($0,036 \text{ UI mL}^{-1}$), CMCCase ($0,27 \text{ UI mL}^{-1}$) e β -glicosidase ($0,051 \text{ UI mL}^{-1}$) podem ser explicados pelo fato da celulose ser um substrato recalcitrante, o que pode causar problemas repercutindo de forma negativa sobre o crescimento e produção dessas enzimas. Pode ser também devido ao consumo preferencial do fungo pela celulose amorfa, que pode ser facilmente hidrolisada, em vez da celulose cristalina (HENDY *et al.*, 1984; RITTER *et al.*, 2013).

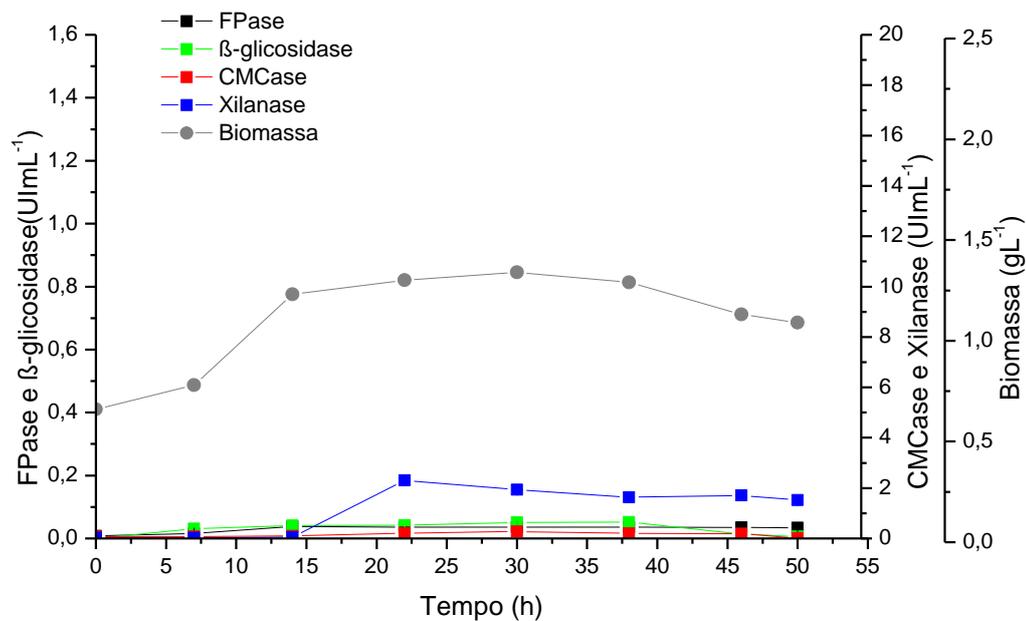


Figura 5.9 Perfil de produção de enzimas e crescimento do *T. reesei* RUT C-30 em meio à base de celulose.

Estudos prévios desenvolvidos por SILVA, (2010), onde se utilizou celulignina, obtida do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar, como fonte carbono em cultivos com *T. reesei* RUT C-30, também apresentaram baixos valores de atividades enzimáticas, que foram: CMCCase de $0,48 \text{ UI mL}^{-1}$, FPase de $0,03 \text{ UI mL}^{-1}$, xilanase de $2,34 \text{ UI mL}^{-1}$ e atividade β -glicosidase nula. Esses baixos valores sugerem que a celulose não seja um substrato em potencial para a produção de enzimas celulolíticas.

Observou-se, também, um valor de $2,31 \text{ UI mL}^{-1}$ de atividade xilanase. Esse valor foi baixo em comparação com dados obtidos com a lactose, porém, este resultado confirma que a celulose pode induzir a produção de xilanase, e que essa indução é atribuída ao fato de que o regulador da transcrição das celulases, ACEII, também afeta a regulação da produção de xilanase (ARO *et al.*, 2001; RITTER *et al.*, 2013).

5.2.2 Meio a base de xilana comercial

A xilana é um heteropolímero composto de resíduos de D-xilose, unidos por ligações β -1,4, formando um suporte central com ramificações de arabinose, ácido glicurônico e manose. A hidrólise completa de xilana a estes monômeros, normalmente, requer a ação de endo- β -1,4- xilanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase (BEG *et al.*, 2001; COLLINS *et al.*, 2005; PRAKASH *et al.*, 2012). Entre essas enzimas, as endo- β -1,4-xilanases são cruciais para a despolimerização da xilana (SUBRAMANIYAN E PREMA, 2000).

O crescimento e produção de celulases e hemicelulases foi avaliado na presença de xilana, apresentados na Figura 5.10. Os valores experimentais encontrados para FPase, CMCCase e β -glicosidase foram de $0,13 \text{ UI mL}^{-1}$, $4,0 \text{ UI mL}^{-1}$ e $0,08 \text{ UI mL}^{-1}$, respectivamente, ao final do cultivo.

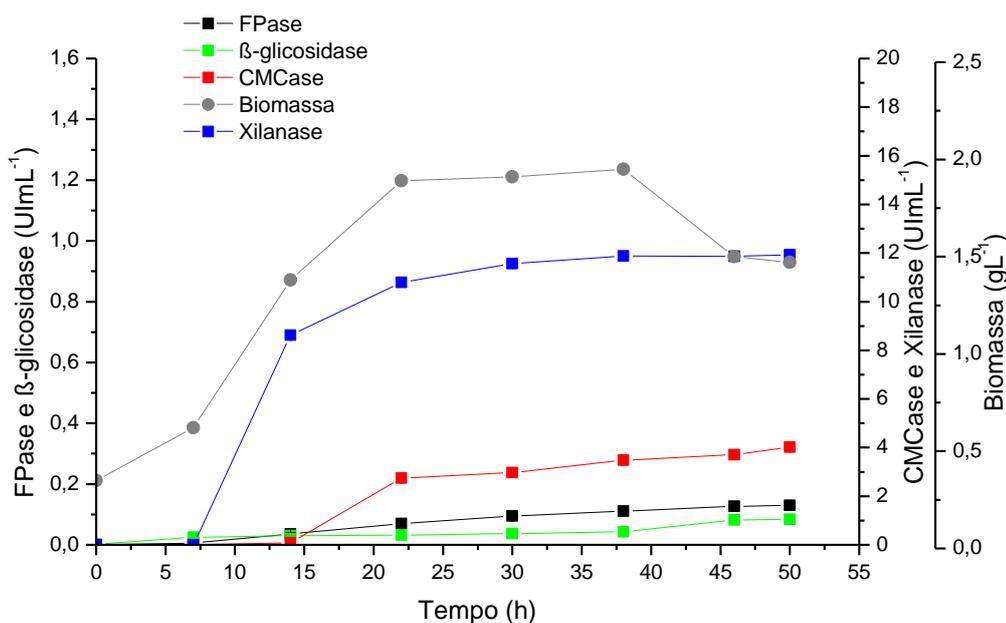


Figura 5.10 Perfil de produção de enzimas e crescimento do *T. reesei* RUT C-30 em meio à base de xilana.

A xilanase foi a enzima mais evidente, como era de se esperar, e atingiu valor máximo de $11,83 \text{ UI mL}^{-1}$, em 50 horas de cultivo. O resultado obtido foi condizente com o esperado, caracterizando a indução das xilanases pela D-xilose, monômero este que resulta da hidrólise da xilana, como descrito no Item 3.5. *T. reesei* produz essas enzimas em nível basal e elas iniciam a hidrólise da xilana, liberando os resíduos de D-xilose para o meio, ativando o processo de indução.

5.2.3 Meio a base de pectina comercial

As fontes de biomassa são compostas por 40 a 50% de celulose, 25 a 35% de hemicelulose, e 15 a 20% de lignina, de massa seca (GRAY *et al.*, 2006). Em alguns tipos de biomassa, como, por exemplo, a polpa de beterraba sacarina e casca de frutas cítricas, a pectina pode também incluir uma significativa parte da estrutura da parede celular (GROHMANN E BALDWIN, 1992; GROHMANN *et al.*, 1994; MICARD *et al.*, 1996; DORAN-PETERSON *et al.*, 2008; EDWARDS *et al.*, 2011).

Neste trabalho, a pectina foi utilizada para verificar sua capacidade de indução de celulases e hemicelulases. A Figura 5.11 apresenta o crescimento do *T. reesei* e o perfil de produção de enzimas.

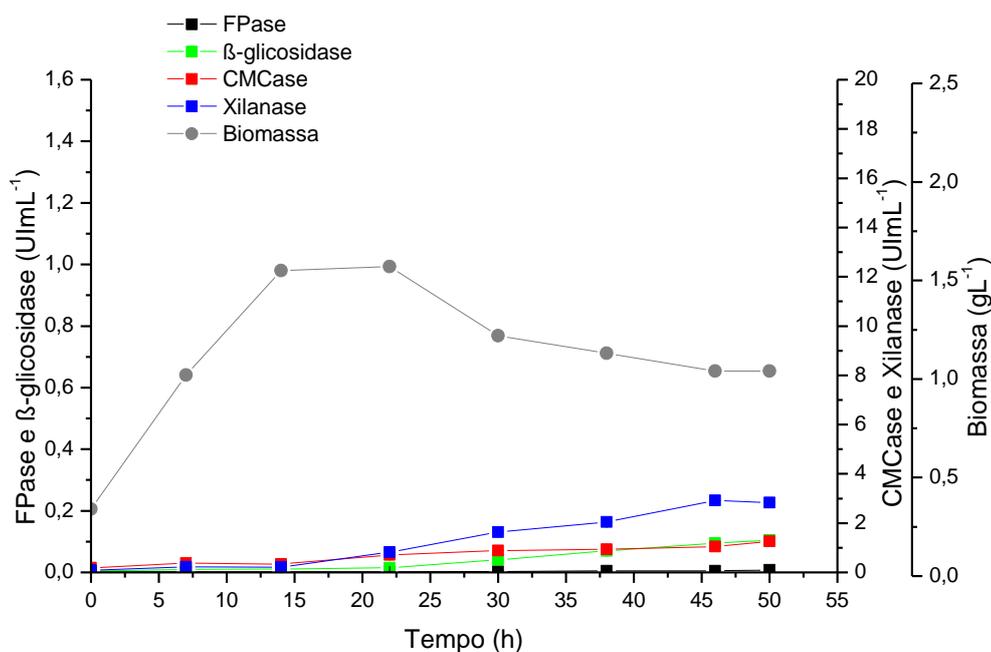


Figura 5.11 Perfil de produção de enzimas e crescimento do *T. reesei* RUT C-30 em meio à base de pectina.

Como podemos observar, os valores das atividades de FPase, CMCCase, xilanase e β -glicosidase foram de $0,01 \text{ UI mL}^{-1}$, $1,25 \text{ UI mL}^{-1}$, $2,83 \text{ UI mL}^{-1}$ e $0,10 \text{ UI mL}^{-1}$, respectivamente, com 50 horas de cultivo, e o valor máximo de biomassa ($1,57 \text{ g L}^{-1}$) foi atingido com aproximadamente 15 horas.

5.2.4 Meio a base de palma forrageira

A palma forrageira é uma cactácea de origem mexicana, rústica, resistente e adaptada a regiões secas. No semiárido brasileiro, essa forrageira é aplicada nos diversos sistemas de produção pecuário, no entanto, é uma planta de enorme potencial produtivo. Devido a sua composição, essa biomassa vegetal apresenta potencial biotecnológico para a produção de compostos de interesse industrial como enzimas (SANTOS *et al.*, 2012).

Pelo fato de conter em sua composição os três polissacarídeos estudados acima, a palma forrageira também foi estudada, neste trabalho, para verificar sua capacidade de indução de enzimas. Os resultados de crescimento e produção de enzimas estão apresentados na Figura 5.12, onde podemos observar valores de FPase de $0,29 \text{ UI mL}^{-1}$, CMCCase $3,30 \text{ UI mL}^{-1}$, xilanase de $6,21 \text{ UI mL}^{-1}$ e β -glicosidase de $0,087 \text{ UI mL}^{-1}$.

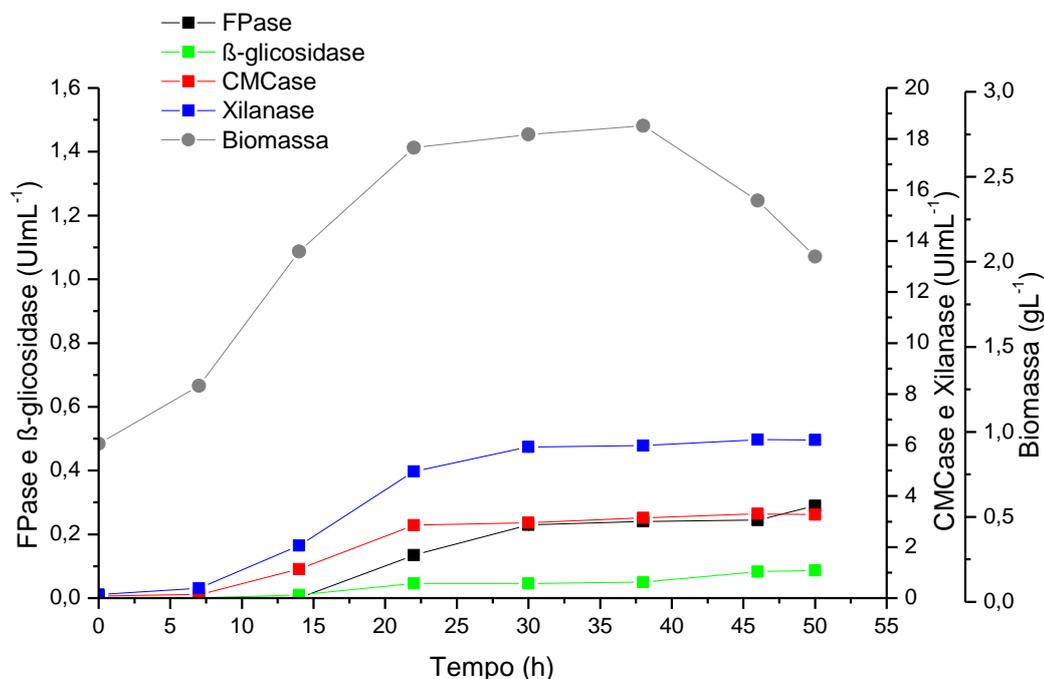


Figura 5.12 Perfil de produção de enzimas e crescimento do *T. reesei* RUT C-30 em meio à base de biomassa de palma forrageira.

Os valores das atividades enzimáticas, com os respectivos desvios padrões, e a concentração celular nos meios com celulose, xilana, pectina e palma, encontram-se no apêndice B.

Estudos com a utilização da palma para a produção de enzimas ainda são mínimos, visto que o enfoque maior das pesquisas com essa biomassa é na área da pecuária, voltada para suplementação alimentar do gado, porém, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a palma pode ser um potencial substrato para produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

5.3 Isolamento de proteínas extracelulares

A análise do perfil protéico no secretoma de *T. reesei* é indispensável para identificar o pool de enzimas hidrolíticas extracelulares, que participam na degradação de material lignocelulósico e outros biopolímeros, em resposta a diferentes fontes de carbono.

O isolamento das proteínas extracelulares foi realizado para posterior análise comparativa do perfil protéico diferencial no secretoma de *T. reesei* RUT C-30 quando cultivado em meios com lactose, celulose, pectina, xilana e palma forrageira.

A concentração das proteínas foi determinada ao final dos cultivos com a utilização do Kit BCA, descrito no item 4.4.4.1. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 Concentração das proteínas extracelulares ao final dos cultivos.

	Substratos				
	Lactose	Pectina	Celulose	Xilana	Palma
Leitura 1	0,499	0,437	0,740	0,392	0,853
Leitura 2	0,509	0,473	0,727	0,514	0,965
Leitura 3	0,537	0,464	0,729	0,433	0,918
Média das leituras	0,515	0,458	0,732	0,446	0,912
Média-Branco*	0,334	0,277	0,551	0,265	0,731
Quantificação**	308,4	251,4	525,4	239,7	705,4
Diluição	50	50	1	50	50
Concentração de proteína em µg/mL	15420	12570	525,4	11986,7	35270
Volume em µL para 100µg de proteína	6,49	7,96	190,33	8,34	2,84

*Branco= 0,181

** Equação da reta referente à curva de calibração $y=0,001x+0,025$.

6 CONCLUSÕES

Dentre as fontes de carbono investigadas, a lactose é o substrato com maior capacidade de promover a indução da produção por *T. reesei* RUT C-30 de todas as atividades enzimáticas investigadas neste trabalho (FPase, carboximetilcelulase, β -glicosidase e xilanase).

O melaço de cana-de-açúcar é um excelente substrato para o crescimento de *T. reesei* RUT C-30, porém, devido à repressão catabólica e ausência de indutor, não é um meio adequado para a produção de enzimas celulolíticas ou xilanolíticas.

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar é um potencial meio para produção de enzimas, em particular xilanases. No entanto, para a sua utilização, será necessária a sua detoxificação, já que *T. reesei* RUT C-30 apresenta alta sensibilidade aos inibidores normalmente formados durante tratamentos termoquímicos de biomassas lignocelulósicas. A obtenção de linhagens mais resistentes, por engenharia metabólica ou evolutiva, é outra alternativa para utilização de hidrolisados hemicelulósicos na produção de enzimas.

Meio a base de palma forrageira é capaz de induzir a produção das atividades investigadas, sendo, também, um meio com potencial para utilização na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

O isolamento das proteínas extracelulares realizado neste trabalho servirá para uma análise futura mais detalhada sobre as enzimas produzidas por *T. reesei* RUT C-30 durante o cultivo nos diferentes substratos.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar o isolamento das proteínas extracelulares por eletroforese 2D, o corte dos *spots* de interesse do gel e a digestão com solução de tripsina.
- Analisar os peptídeos, resultantes da digestão, no espectrômetro de massas obtendo-se seus respectivos espectros, para posterior comparação em bancos de dados.
- Caracterizar as proteínas isoladas por seqüenciamento de aminoácidos e identificar proteínas específicas expressas frente às diferentes fontes de carbono.
- Realizar análise comparativa do perfil protéico diferencial no secretoma de *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios indutores.

8 REFERÊNCIAS

- ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; CHEOW, E. S. H.; SZE, S.K. Quantitative proteomic analysis of secretome of microbial consortium during saw dust utilization. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 5590-5603, 2012.
- AHAMED A.; VERMETTE P. Culture-based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399–407, 2008.
- AKEL, E.; METZ, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C.P. Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Eukaryotic Cell**, v. 8, p. 1837-1844, 2009.
- ALMEIDA, J. R. M.; KARHUMAA, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains with respect to anaerobic growth in non-detoxified lignocellulose hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3674-3677, 2009.
- ALPER, H. AND STEPHANOPOULOS, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 715-723, 2009.
- AMORE, A. AND FARACO, V. Potential of fungi as category I consolidated bioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3286-3301, 2012.
- ARANTES, V. & SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n 3, 2011.
- ARO, N.; ILMÉN, M.; SALOHEIMO, A.; PENTTILÄ, M. ACE I of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 56-65, 2003.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.
- ARO, N.; SALOHEIMO, A.; ILMÉN, M.; PENTTILÄ, M. ACE II, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. **Journal Biological Chemistry**, v. 276, p. 24309-24314, 2001.
- AVGUSTIN, G.; WALLACE, R.J.; FLINT, H.J. Phenotypic diversity among rumen isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal for redefinition of *Prevotella ruminicola* and the creation of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov. and *Prevotella albensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n° 2, p. 284-288, 1997.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications- a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BHAT, P.J. AND MURTHY, T.V. Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction. **Molecular Microbiology**, v. 40, p. 1059-1066, 2001.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.** 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. S., Corvo, M. L., Vermelho, A. B., Paiva, C. L. A., Ferrara, M. A., & Coelho, R. R. R. (eds.). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.

BRIENZO, M.; MONTE, J.R.; MILAGRES, A.M.F. Induction of cellulase and hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* by xylan hydrolyzed products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 113-119, 2012.

BUKHTOJAROV, F.E.; USTINOV, B.B.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; GUSAKOV, A.V.; OKUNEV, O.N.; SINITSYN, A.P. Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: Isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases. **Biochemistry**, v. 69, p. 542-551, 2004.

CARLE-URIESTE, J.C; ESCOBAR-VERA, J.; EL-GOGARY, S; HENRIQUE- SILVA, F.; TORIGOI, E.; CRIVELLARO, O.; HERRERA-ESTRELLA, A.; EL- DORRY, H. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, p. 10169-10174, 1997.

CARTER, G.L.; ALLISON, D.; REY, M.W.; DUNN-COLEMAN, N.S. Chromosomal and genetic analysis of the electrophoretic karyotype of *Trichoderma reesei*: mapping of the cellulase and xylanase genes. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 2167-2174, 1992.

CARVALHO, T.; FILHO, G.A.; PACHECO, C.S.V.; FERREIRA, A.N.; ROCHA, T.J.O.;FRANCO, M. Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido da palma doce (*Nopalea coccinellifera*) utilizando modelos estatísticos significativos. **Revista de Estudos Ambientais (online)**, v. 14, n. 3, p. 48-57, 2012.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p.181-188, 2010.

CHAO, L.T; ADAV, S. S; SZE, S.K. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. **Molecular & Cellular Proteomics**. v.11, p. 1–15, 2012.

CHERRY, J.R. & FIDANTSEF, A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 438-443, 2003.

CHOY, V.; PATEL, N.; THIBAUT, J. Application of image analysis in the fungal fermentation of *Trichoderma reesei* RUT-C30. **Biotechnology Progress**, v. 27, nº 6, p. 1544-1553, 2011.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.3-23, 2005.

DEMAIN, A.L.; NEWCOMB, M.; WU, J.H. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n° 1, p. 124-154, 2005.

DESWAUX, M. Unraveling carbon metabolism in anaerobic cellulolytic bacteria. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 1229-1238, 2006.

DEVILLARD, E.; BERA-MAILLET, C.; FLINT, H.J.; SCOTT, K.P.; NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; JOUANY, J.P.; FORANO, E. Characterization of Xyn10B, a modular xylanase from the ruminal protozoan *Polyplastron multivesiculatum*, bearing a family 22 carbohydrate-binding module that binds to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 373, p. 495-503, 2003.

DORAN-PETERSON, J., COOK, D.M. AND BRANDON, S.K. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. **The Plant Journal**, v. 54, p. 582-592, 2008.

DOWZER, C.E. AND KELLY, J.M. Analysis of the creA gene; a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, p. 5701-5709, 1991.

EDWARDS, M.C.; HENRIKSEN, E.D.; YOMANO, L.P.; GARDNER, B.C.; SHARMA, L.N.; INGRAM, L.O. AND PETERSON, J.D. Addition of genes for cellobiase and pectinolytic activity in *Escherichia coli* for fuel ethanol production from pectin-rich lignocellulosic biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5184-5191, 2011.

EKINCI, M.S.; MARTIN, J.; FLINT, H.J. Expression of a CelA gene from the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* in *Streptococcus bovis* by means of promoter fusions. **Biotechnology Letters**, v. 24, n° 9, p. 735-741, 2002.

EL-GOGARY, S.; LEITE, A.; CRIVELLARO, O.; EVELEIGH, D.E.; EL-DORRY, H. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 6138-6141, 1989.

FEKETE, E.; KARAFFA, L.; KUBICEK, C.P.; SZENTIRMAI, A.; SEIBOTH, B. Induction of extracellular β -galactosidase (Bgal) formation by D-galactose in *Hypocrea jecorina* mediated by galactitol. **Microbiology**, v. 153, p. 507-512, 2007.

FEKETE, E.; KARAFFA, L.; SANDOR, E.; BANYAI, I.; SEIBOTH, B.; GYEMANT, G.; SEPSI, A.; SZENTIRMAI, A.; KUBICEK, C.P. The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. **Archives of Microbiology**, v. 181, p. 35-44, 2004.

FEKETE, E.; KARAFFA, L.; SANDOR, E.; SEIBOTH, B.; BIRO, S.; SZENTIRMAI, A.; KUBICEK, C.P. Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. **Archives of Microbiology**, v. 179, p. 7-14, 2002.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: current status challenges and future direction. **Energy Fuel**, p. 1727-1737, 2006.

FLINT, H.J. Polysaccharide breakdown by anaerobic micro-organisms inhabiting the mammalian gut. **Advances in Applied Microbiology**, v. 56, p. 89-120, 2004.

FLINT, H.J.; BAYER, E.A.; RINCON, M.T.; LAMED, R.; WHITE, B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Publishing Group Reviews**, v. 6, p. 121-131, 2008.

FOREMAN, P.K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N.S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T.D.; ENGLAND, G.J.; KELLEY, A. S; MEERMAN, H.J.; MITCHELL, T.; MITCHINSON, C.; OLIVARES, H.A.; TEUNISSEN, P.J.; YAO, J.; WARD, M. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, p. 31988-31997, 2003.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GHOSH, A.; GHOSH, B.K.; TRIMINO-VAZQUEZ, H.; EVELEIGH, D.E.; MONTENECOURT, B.S. Cellulase secretion from a hypercellulolytic mutant of *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Archives Microbiology**, v. 140, p. 126-133, 1984.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GLENN, M.; GHOSH, A.; GHOSH, B.K. Subcellular fractionation of a hypercellulolytic mutant, *Trichoderma reesei* Rut-C30: localization of endoglucanase in microsomal fraction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1137-1143, 1985.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; PRATS, E.; JORRÍN-NOVO, J.V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-36, 2010.

GRASSICK, A.; MURRAY, P.G.; THOMPSON, R.; COLLINS, C.M.; BYRNES, L.; BIRrane, G.; HIGGINS, T.M.; TUOHY, M.G. Three-dimensional structure of a thermostable native cellobiohydrolase, CBHIB, and molecular characterization of the Cel7 gene from the filamentous fungus, *Talaromyces emersonii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 4495-4506, 2004.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GROHMANN, K. AND BALDWIN, E.A. 1992. Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 1169-1174, 1992.

GROHMANN, K.; BALDWIN, E.A.; BUSLIG, B.S. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45-46, p. 315-327, 1994.

GYALAI-KORPOS, M.; MANGEL, R.; ALVIRA, P.; DIENES, D.; BALLESTEROS, M.; RÉCZEY, K. Cellulase production using different streams of wheat grain- and wheat straw-

based ethanol processes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n° 7, p. 791-802, 2011.

HENDY, N.A; WILKE, C.R.; BLANCH, H.W. Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, n. 2, p. 73-77, 1984.

HERPOËL-GIMBERT, I.; MARGEOT, A.; DOLLA, A.; JAN, G.; MOLLÉ, D.; LIGNON, S.; MATHIS, H.; SIGOILLOT, J.C.; MONOT, F.; ASTHER, M. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1:18, 1-12, 2008.

HOLDEN, H.M; RAYMENT, I.; THODEN, J.B. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 43885-43888, 2003.

HRMOVÁ, M.; PETRAKOVÁ, E.; BIELY, P. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homoand heterodisaccharides composed of glucose and xylose. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 541-547, 1991.

ILMÉN, M.; SALOHEIMO, A.; ONNELA, M.L.; PENTTILÄ, M.E. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1298-1306, 1997.

ILMÉN, M.; THRANE, C.; PENTTILA, M. The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. **Molecular and General Genetics**, v. 251, p. 451-460, 1996.

IRWIN, D.C.; CHENG, M.; XIANG, B.; ROSE, J.K.C.; WILSON, D.B. Cloning, expression and characterization of a family-74 xyloglucanase from *Thermobifida fusca*. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n° 14, p. 3083-3091, 2003.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M. & VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519–3525, 2005.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; SZIJÁRTÓ, N.; RÉCZEY, K. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 201–211, 2004.

JUN, H.; GUANGYE, H.; DAIWEN, C. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of Proteomics**, v. 89, p.191–201, 2013.

KAR, S.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P.K; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* saf3. Department of Microbiology, Vidyasagar University, Midnapore, India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 462-464, 2006.

KARAFFA, L.; FEKETE, E.; GAMAUF, C.; SZENTIRMAI, A.; KUBICEK, C.P.; SEIBOTH, B. D-Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. **Microbiology**, v. 152, p. 1507-1514, 2006.

KUBICEK, C.P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulose production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, v.2, n. 19, p. 1-14, 2009.

KUMAR, D.E. AND MURTHY, G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 63, p. 1-20, 2013.

LARA-MÁRQUEZ, A.; ZAVALA-PÁRAMO, M.G.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CAMACHO, H.C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 859-868, 2011.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735-764, 2012.

LIMÓN, M. C.; PAKULA, T., SALOHEIMO, M.; PENTTILÄ, M. The effects of disruption of phosphoglucose isomerase gene on carbon utilisation and cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Microbial Cell Factories**, v. 10:40, p. 1-21, 2011.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

LYKIDIS, A.; MAVROMATIS, K.; IAVANOVA, N.; ANDERSON, I.; LAND, M.; DIBARTOLO, G.; MARTINEZ, M.; LAPIDUS, A.; LUCAS, S.; COPELAND, A.; RICHARDSON, P.; WILSON, D.B; KYRPIDES, N. Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. **Journal of bacteriology**, v. 189, p. 2477-2486, 2007.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H. AND PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MACH-AIGNER, A.R.; PUCHER, M.E.; STEIGER, M.G.; BAUER, G.E.; PREIS, S.J.; MACH, R.L. Transcriptional regulation of *xyl1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6554-6562, 2008.

MANDELS, M.; PARRISH, F.W.; REESE, E.T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma reesei*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, p. 400-408, 1962.

MÄNTYLÄ, A.L.; ROSSI, K.H.; VANHANEN, S.A.; PENTTILÄ, M.E.; SUOMINEN, P.L.; NEVALAINEN, K.M.H. Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant *Trichoderma longibrachiatum* (*reesei*) strains. **Current Genetics**, v. 21, p. 471-477, 1992.

MARKOV, A.V.; GUSAKOV, A.V.; KONDRATYEVA, E.G.; OKUNEV, O.N.; BEKKAREVICH, A.O.; SINITSYN, A.P. New effective method for analysis of the

component composition of enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, v. 70, p. 657-663, 2005.

MARTINEZ, D.; BERKA, R.M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S.E.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, P.M. Genome sequencing and analysis of the biomass degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 553-560, 2008.

MARTOS, M.A.; ZUBRESKI, E.R.; GARRO, O.A.; HOURS, R.A. Production of pectinolytic enzymes by the yeast *Wickerhamomyces anomalus* isolated from citrus fruits peels. **Biotechnology Research International**, p. 1-7, 2013.

MATHEW, G.M.; SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, p. 898-907, 2008.

McGRATH, C.E. & WILSON, D.B. Characterization of a *Thermobifida fusca* beta-1,3-glucanase (Lam81A) with a potential role in plant biomass degradation. **Biochemistry**, v. 45, n° 47, p. 14094-14100, 2006.

MELZER, G.; ESFANDABADI, M.E.; FRANCO-LARA, E.; WITTMANN, C. Flux design: In silico design of cell factories based on correlation of pathway fluxes to desired properties. **BMC Systems Biology**, v. 3:120, p. 1-16, 2009.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 38, p. 522-550, 2012.

MICARD, V.; RENARD, C.M.G.C.; THIBAUT, J.F. Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 162-170, 1996.

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

MITSUMORI, M.; XU, L.; KAJIKAWA, H.; KURIHARA, M. Properties of cellulose-binding modules in endoglucanase F from *Fibrobacter succinogenes* S85 by means of surface plasmon resonance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 2154, p. 277-281, 2002.

MIYAZAKI, K.; MARTIN, J.C.; MARINSEK-LOGAR, R.; FLINT, H.J. Degradation and utilization of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis* B₁₄). **Anaerobe**, v. 3, n° 6, p. 373-381, 1997.

MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p. 777-782, 1977.

MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. In: **Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis, Advances in Chemistry Series**, 181, p.

289-301. Edited by R. Brown & L. Jurasek. Washington, DC: American Chemical Society.1979.

MUSSATTO, S.I.; SANTOS, J.C.; ROBERTO, I.C. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 79, n. 6, p. 590-596, 2004.

NAGENDRAN, S.; HALLEN-ADAMS, H.E.; PAPER, J.M.; ASLAM, N.; WALTON, J.D. Reduced genomic potential for secreted plant cell-wall-degrading enzymes in the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera*, based on the secretome of *Trichoderma reesei*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n° 5, p. 427-435, 2009.

NAIK, S. N.; GOUD, V.V.; ROUT, P. K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 578-597, 2010.

NISIZAWA, T.; SUZUKI, H.; NISIZAWA, K. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. **The Journal of Biochemistry**, v. 71, p. 999-1007, 1972.

NOGAWA, M.; GOTO, M.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. **Current Genetics**, v. 38, p. 329-334, 2001.

NOGUCHI, Y.; SANO, M.; KANAMARU, K.; KO, T.; TAKEUCHI, M.; KATO, M.; KOBAYASHI, T. Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biothechnology**, v. 85, p. 141-154, 2009.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**. v. 91, p. 659–664, 2009.

OHKUMA, M. Termite symbiotic systems: Efficient bio-recycling of lignocelluloses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 1-9, 2003.

OHTSUKI, T.; YAZAKI, S.; UI, S.; MIMURA, A.; SUYANTO. Production of large multienzyme complex by aerobic thermophilic fungus *Chaetomium sp.* Nov. MS-017 grow on palm oil mill fibre. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n° 2, p. 111-116, 2005.

OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T.M.I.E.; HANSEN, K.P.; PALMQVIST, E.A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 612-619, 2003.

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

PETTERSSON, H. AND PETTERSSON, G. Kinetics of the coupled reaction catalysed by a fusion protein of b-galactosidase and galactose dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1549, p. 155-160, 2001.

POPPER, Z.A. AND FRY, S.C. Xyloglucan-pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. **Planta**, v. 227, p. 781-794, 2008.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S.K.; PRAKASH, B.; RUBUL, M.; SREERAMULU, K. Production of alkaliphilic, halotolerant, thermostable cellulose free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 183-192, 2012.

PTASHNE, M. How eukaryotic transcriptional activators work. **Nature**, v.335, p. 683-689, 1998.

QI, M.; NELSON, K.E.; DAUGHERTY, S.C.; NELSON, W.C.; HANCE, I.R., MORRISON, M.; FORSBERG, C.W. Novel molecular features of the fibrolytic intestinal bacterium *Fibrobacter intestinalis* not shared with *Fibrobacter succinogenes* as determined by suppressive subtractive hybridization. **Journal of Bacteriology**, v. 187, nº 11, p. 3739-3751, 2005.

RITTER, C.E.T.; CAMASSOLA, M.; ZAMPIERI, D.; SILVEIRA, M.M. AND DILLON, A.J.P. Cellulase and xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged media containing cellulose amended with sorbitol. **Enzyme Research**, p. 1-9, 2013.

ROBERTS, C.F. Enzyme lesions in galactose non-utilizing mutants of *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 201, p. 267-283, 1970.

ROBERTS, C.F. The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 31, p. 45-58, 1963.

ROCHA, G. J. M. **Deslignificação de Bagaço de Cana de Açúcar Assistida por Oxigênio**, Tese de Doutorado. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2000.

RUBIO-TEXEIRA, M. A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 1115-1128, 2005.

RUIJTER, G.J. AND VISSER, J. Carbon repression in *Aspergilli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.151, p. 103-114, 1997.

SÁ, C. B. C. **Caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para aplicação na produção de bioetanol**, Dissertação de Mestrado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SALOHEIMO, M.; NAKARI-SETALA, T.; TENKANEN, M.; PENTTILA, M. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **European Journal Biochemistry**, v. 249, p. 584-595, 1997.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANCHEZ, S. & DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.

SANDERS, J. P. M.; CLARCK, J. H.; HARMSSEN, G. J.; HEERES, H. J.; HEIJNEN, J. J.; KERSTEN, S. R. A.; VAN SWAAIJ, W. P. M.; MOULIJN, J. A. Process intensification in the future production of base chemicals from biomass. **Chemical Engineering and Processing**, v. 51, p. 117-136, 2012.

SANDERS, J.; SCOTT, E.; WEUSTHUIS, R.; MOOIBOEK, H. Bio-refinery as the bio-inspired process to bulk chemicals. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, p. 105-117, 2007.

SANTOS, S. F. M.; SILVA JÚNIOR, B.F.; SANTOS, B.F.; SOUTO-MAIOR, A. M. Produção de celulase por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em processos de batelada e batelada alimentada. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Natal-RN, 2009.

SANTOS, T.C.; FILHO, G.A.; ROCHA, T.J.H.; FONSECA, S.F.; FRAN, M. Palma forrageira como matéria-prima para a produção de enzimas celulolíticas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p. 270-276, 2012.

SEIBOTH, B.; HARTL, L.; PAIL, M.; FEKETE, E.; KARAFFA, L.; KUBICEK, C.P. The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulose induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 1015-1025, 2004.

SEIBOTH, B.; HARTL, L.; SALOVUORI, N.; LANTHALER, K.; ROBSON, G.D.; VEHEMAANPERÄ, J.; PENTTILÄ, M.E.; KUBICEK, C.P. Role of the bga1-encoded extracellular b-galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 851-857, 2005.

SEIBOTH, B.; PAKDAMAN, B.S.; HARTL, L.; KUBICEK, C.P. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 42-48, 2007.

SEIDL, V.; GAMAUF, C.; DRUZHININA, I.S.; SEIBOTH, B.; HARTL, L.; KUBICEK, C.P. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. **BMC Genomics**, v. 9:327, p. 1-15, 2008.

SEYIS, I & AKSOZ, N. Xylanase Production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with Alternative Carbon and Nitrogen Sources. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, p. 37-40, 2005.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN J. V.; MANN, M. In-gel digestion form mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1, n. 6, p. 2856-2860, 2007.

SILVA, M. J. **Produção de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* RUT C30 para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar e produção de etanol.** Monografia. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

SINGH, S.; PILLAY, B.; PRIOR, B.A. Thermal stability of β xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 26, p. 502-508, 2003.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, p. 60-70, 2007.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARANA, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEYA, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 46, p. 541-549, 2010.

SIPOS, B.; BENKÖ, Z.; DIENES, D.; RÉCZEY, K.; VIKARI, L.; SIIKA-AHO, M. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 161, p. 347-364, 2010.

SLEPAK, T.; TANG, M.; ADDO, F.; LAI, K. Intracellular galactose- 1-phosphate accumulation leads to environmental stress response in yeast model. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, p. 360-371, 2005.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p.4820-4825, 2010.

SORENSEN, H. R.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 908-918, 2007.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Principles of fermentation technology. **Butterworth Heinemann**, 2a ed., 1995.

STEENBAKKERS, P.J.M.; LI, X.; XIMENES, E.A.; ARTS, J.G.; CHEN, H.Z.; LJUNGDAHL, L.G.; OP DEN CAMP, H.J.M. Noncatalytic docking domains of cellulosomes of anaerobic fungi. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n° 18, p. 5325-5333, 2001.

STRICKER, A.R.; GROSSTESSNER-HAIN, K.; WÜRLEITNER, E.; MACH, R.L. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p. 2128-2137, 2005.

STRICKER, A.R.; MACH, R.L.; DE GRAFF, L.H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, p. 211-220, 2008a.

STRICKER, A.R.; STEIGER, M.G.; MACH, R.L. Xyr1 receives the lactose induction signal and regulates lactose metabolism in *Hypocrea jecorina*. **FEBS Letters**, v. 581, p. 3915-3920, 2007.

STRICKER, A.R.; TREFFLINGER, P.; ARO, N.; PENTTILÄ, M.; MACH R.L. Role of Ace2 (activator of cellulases 2) within the xyn2 transcriptosome of *Hypocrea jecorina*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 436-445, 2008b.

SUBRAMANIYAN, S. E PREMA, P. Cellulase free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p.1-7, 2001.

TAKADA, G.; KAWASAKI, M.; KITAWAKI, M.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI, J.; IZUMORI, K.; ARAI, M. Cloning and transcription analysis of the *Aspergillus aculeatus* No. F-50 endoglucanase 2 (cmc2) gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n°5, p. 482-485, 2002.

TANSEY, W. P. Transcriptional activation: risky business. **Genes & Development**, v. 15, p. 1045-1050, 2001.

TAYLOR II, L.E.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; EKBORG, N.A.; HUTCHESON, A.W.; WEINER, R.M. Complete cellulase system in the marine bacterium *Saccharophagus degradans* strain 2-40^T. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n° 11, p. 3849-3861, 2006.

TIJMENSEN, M.J.A.; FAAIJ, A.P.C.; HAMELINCK, C.N. AND VAN HARDEVELD, M.R.M. Exploration of the possibilities for production of Fischer Tropsch liquids and power via biomass gasification. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 129-152, 2002.

TOYODA, A.; TAKANO, K.; MINATO, H. A possible role of cellulose-binding protein A (CBPA) in the adhesion of *Eubacterium cellulosolvens* 5 to cellulose. **Journal of general and Applied Microbiology**, v. 49, n° 4, p. 245-250, 2003.

WILLATS, W.G.; KNOX, J.P.; MIKKELSEN, J.D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.

WILSON, D.B. Aerobic microbial cellulase systems. In: **Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy**. p. 374-392 (Chapter 11). Oxford, UK: Blackwell Publishing. Edited by Himmel M.E., 2008.

WILSON, D.B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 295-299, 2009.

WILSON, D.B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 259-263, 2011.

WILSON, D.B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1125, p. 289-297, 2008.

XIONG, H.; TURUNEN, O.; PASTINEN, O.; LEISOLA, M.; VON WEYMARN, N. Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 353-358, 2004.

XU, Q.; MORRISON, M.; NELSON, K.E.; BAYER, E.A.; ATAMANA, N.; LAMED, R. A novel family of carbohydrate-binding modules identified with *Ruminococcus albus* proteins. **FEBS Letters**, v. 566, n° 1-3, p. 11-16, 2004.

YANG, S.; LAND, M.L.; KLINGEMAN, D.M.; PELLETIER, D.A.; LU, T.Y.; MARTIN, S.L.; GUO, H.B.; SMITH, J.C.; BROWN, S.D. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 23, p. 395-400, 2010.

YUAN, S.; WU, Y.; COSGROVE, D.J. A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. **Plant Physiology**, v. 127, p. 324-333, 2001.

ZEILINGER, S.; SCHMOLL, M.; PAIL, M.; MACH, R.L.; KUBICEK, C P. Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter cbh2 associated with cellulase induction. **Molecular and Genetics Genomics**, v.270, p. 46-55, 2003.

ZOU, G.; SHAOHUA, S.; JIANG, Y.; VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R.P.; CHEN, L.; ZHANG, J.; MA, L.; WANG, C.; ZHOU, Z. Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 21, p. 1-12, 2012.

APÊNDICE A- Produção de Celulases e Hemicelulases por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios industriais.

Tabela A.1 Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões referentes à produção em meio de lactose.

Tempo (h)	Atividades Enzimáticas (UI/mL)			
	FPase	β -glicosidase	CMCase	Xilanase
0	0,022 \pm 0,03	0,016 \pm 0,00	1,448 \pm 0,09	1,037 \pm 0,10
7	0,048 \pm 0,03	0,020 \pm 0,00	1,647 \pm 0,05	1,250 \pm 0,00
14	0,096 \pm 0,03	0,030 \pm 0,00	2,932 \pm 0,01	1,977 \pm 0,02
22	0,365 \pm 0,04	0,122 \pm 0,00	4,670 \pm 0,06	6,017 \pm 0,10
30	0,737 \pm 0,07	0,127 \pm 0,01	8,430 \pm 0,02	9,435 \pm 0,02
38	1,120 \pm 0,01	0,225 \pm 0,00	11,090 \pm 0,01	10,266 \pm 0,01
46	1,266 \pm 0,03	0,231 \pm 0,03	12,731 \pm 0,05	11,487 \pm 0,04
54	1,426 \pm 0,07	0,244 \pm 0,00	15,673 \pm 0,07	11,908 \pm 0,01
62	1,538 \pm 0,01	0,271 \pm 0,00	17,347 \pm 0,02	12,058 \pm 0,01
70	1,540 \pm 0,00	0,286 \pm 0,00	17,945 \pm 0,02	12,712 \pm 0,02

Tabela A.2 Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões referentes à produção em meio de melão de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	Atividades Enzimáticas (UI/mL)			
	FPase	β -glicosidase	CMCase	Xilanase
0	0,020 \pm 0,00	0,026 \pm 0,03	0,792 \pm 0,01	0,00 \pm 0,03
3	0,020 \pm 0,01	0,014 \pm 0,01	0,682 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
7	0,021 \pm 0,00	0,016 \pm 0,01	0,613 \pm 0,01	0,086 \pm 0,02
14	0,023 \pm 0,00	0,010 \pm 0,00	0,531 \pm 0,03	0,190 \pm 0,02
22	0,025 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	0,511 \pm 0,02	0,531 \pm 0,02
30	0,008 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,151 \pm 0,02	0,530 \pm 0,04
38	0,007 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,147 \pm 0,03	0,525 \pm 0,01
46	0,004 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,141 \pm 0,01	0,363 \pm 0,03
54	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,141 \pm 0,00	0,342 \pm 0,02
62	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,030 \pm 0,00	0,053 \pm 0,00
70	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,013 \pm 0,00	0,043 \pm 0,00

Tabela A.3 Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões referentes à produção em meio de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Tempo (h)	Atividades Enzimáticas (UI/mL)			
	FPase	β -glicosidase	CMCase	Xilanase
0	0,00 \pm 0,00	0,065 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
7	0,00 \pm 0,00	0,030 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,136 \pm 0,00
14	0,00 \pm 0,00	0,043 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,294 \pm 0,02
22	0,00 \pm 0,00	0,016 \pm 0,00	0,150 \pm 0,02	0,679 \pm 0,02
30	0,025 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00	0,192 \pm 0,00	0,793 \pm 0,00
38	0,027 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00	0,207 \pm 0,00	1,019 \pm 0,01
46	0,052 \pm 0,00	0,011 \pm 0,00	0,421 \pm 0,01	1,223 \pm 0,00
54	0,057 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,242 \pm 0,00	1,404 \pm 0,02
62	0,043 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,359 \pm 0,00
70	0,025 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,291 \pm 0,00

Tabela A.4 Concentrações de substrato e de células, determinadas durante o processo de produção de enzimas celulolíticas em meio com lactose.

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Biomassa	Lactose	Galactose	Glicose
0	0,46	4,32	0	0
7	0,56	3,58	0	0
14	0,88	3,43	0,08	0,06
22	1,28	1,95	0,09	0,08
30	1,84	1,35	0,27	0,21
38	2,02	0,49	0,22	0,17
46	2,08	0	0	0
54	1,98	0	0	0
62	1,82	0	0	0
70	1,84	0	0	0

Tabela A.5 Concentrações de substrato e de células, determinadas durante o processo de produção de enzimas celulolíticas em meio com melaço de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Biomassa	Sacarose	Frutose	Glicose
0	0,45	3,77	2,69	2,83
3	1,27	3,06	4,09	2,00
7	3,56	1,69	4,74	1,63
14	4,55	0,48	2,52	0,02
22	5,39	0	0,01	0,16
30	5,54	0	0	0
38	5,26	0	0	0
46	5,29	0	0	0
54	4,92	0	0	0
62	4,82	0	0	0
70	4,70	0	0	0

Tabela A.6 Concentrações de substrato e de células, determinadas durante o processo de produção de enzimas celulolíticas em meio com hidrolisado hemicelulósico.

Tempo (h)	Concentração (g/L)				
	Biomassa	Celobiose	Xilose	Arabinose	Glicose
0	0,04	0,13	3,11	0,14	0,51
7	0,22	0,13	3,11	0,14	0,51
14	0,22	0,13	3,10	0,14	0,51
22	0,22	0,12	3,10	0,14	0,51
30	0,22	0,12	3,10	0,14	0,50
38	0,24	0,12	3,09	0,14	0,50
46	0,24	0,12	3,07	0,13	0,48
54	0,24	0,11	3,05	0,13	0,48
62	0,26	0,11	2,98	0,13	0,48
70	0,30	0,10	2,98	0,13	0,48

APÊNDICE B- Produção de Celulases e Hemicelulases por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em polissacarídeos constituintes de biomassas

Tabela B.1 Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões referentes à produção em meio com celulose microcristalina.

Tempo (h)	Atividades Enzimáticas (UI/mL)				
	FPase	β -glicosidase	CMCase	Xilanase	Biomassa(g/L)
0	0,008 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	0,078 \pm 0,02	0,021 \pm 0,02	0,66
7	0,016 \pm 0,00	0,031 \pm 0,00	0,076 \pm 0,00	0,029 \pm 0,06	0,76
14	0,037 \pm 0,01	0,041 \pm 0,00	0,102 \pm 0,04	0,054 \pm 0,01	1,25
22	0,036 \pm 0,00	0,042 \pm 0,00	0,209 \pm 0,00	2,301 \pm 0,00	1,27
30	0,036 \pm 0,00	0,051 \pm 0,01	0,275 \pm 0,00	1,928 \pm 0,02	1,28
38	0,036 \pm 0,00	0,052 \pm 0,00	0,205 \pm 0,00	1,634 \pm 0,01	1,27
46	0,035 \pm 0,00	0,013 \pm 0,00	0,191 \pm 0,01	1,707 \pm 0,00	1,11
50	0,034 \pm 0,00	0,006 \pm 0,00	0,013 \pm 0,00	1,516 \pm 0,01	1,09

Tabela B.2 Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões referentes à produção em meio com xilana comercial.

Tempo (h)	Atividades Enzimáticas (UI/mL)				
	FPase	β -glicosidase	CMCase	Xilanase	Biomassa(g/L)
0	0,00 \pm 0,00	0,002 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,27
7	0,005 \pm 0,01	0,025 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,65
14	0,036 \pm 0,00	0,030 \pm 0,00	0,086 \pm 0,00	8,615 \pm 0,01	1,28
22	0,070 \pm 0,01	0,031 \pm 0,00	2,749 \pm 0,00	10,789 \pm 0,00	1,85
30	0,095 \pm 0,00	0,037 \pm 0,01	2,967 \pm 0,00	11,561 \pm 0,05	1,85
38	0,111 \pm 0,02	0,042 \pm 0,02	3,479 \pm 0,00	11,880 \pm 0,01	1,95
46	0,127 \pm 0,01	0,082 \pm 0,00	3,705 \pm 0,01	11,865 \pm 0,03	1,50
50	0,129 \pm 0,00	0,083 \pm 0,00	4,015 \pm 0,03	11,929 \pm 0,01	1,48

Tabela B.3 Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões referentes à produção em meio com pectina comercial.

Tempo (h)	Atividades Enzimáticas (UI/mL)				
	FPase	β -glicosidase	CMCase	Xilanase	Biomassa(g/L)
0	0,00 \pm 0,00	0,004 \pm 0,00	0,182 \pm 0,03	0,083 \pm 0,00	0,42
7	0,002 \pm 0,00	0,009 \pm 0,00	0,368 \pm 0,00	0,221 \pm 0,02	1,13
14	0,002 \pm 0,01	0,011 \pm 0,02	0,338 \pm 0,02	0,221 \pm 0,01	1,56
22	0,002 \pm 0,00	0,015 \pm 0,00	0,712 \pm 0,00	0,821 \pm 0,00	1,57
30	0,003 \pm 0,00	0,041 \pm 0,01	0,890 \pm 0,00	1,633 \pm 0,02	1,19
38	0,005 \pm 0,01	0,069 \pm 0,00	0,940 \pm 0,00	2,051 \pm 0,01	1,17
46	0,005 \pm 0,00	0,095 \pm 0,00	1,054 \pm 0,01	2,920 \pm 0,01	1,13
50	0,007 \pm 0,00	0,105 \pm 0,01	1,254 \pm 0,04	2,831 \pm 0,01	1,11

Tabela B.4 Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões referentes à produção em meio com palma forrageira.

Tempo (h)	Atividades Enzimáticas (UI/mL)				
	FPase	β -glicosidase	CMCase	Xilanase	Biomassa(g/L)
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,092 \pm 0,00	0,132 \pm 0,02	0,96
7	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,139 \pm 0,00	0,385 \pm 0,03	1,28
14	0,00 \pm 0,00	0,010 \pm 0,00	1,132 \pm 0,04	2,063 \pm 0,01	2,06
22	0,135 \pm 0,00	0,046 \pm 0,02	2,856 \pm 0,00	4,961 \pm 0,00	2,68
30	0,229 \pm 0,01	0,046 \pm 0,01	2,957 \pm 0,03	5,921 \pm 0,00	2,75
38	0,241 \pm 0,00	0,050 \pm 0,00	3,150 \pm 0,00	5,978 \pm 0,00	2,78
46	0,245 \pm 0,03	0,083 \pm 0,03	3,306 \pm 0,01	6,216 \pm 0,00	2,36
50	0,290 \pm 0,00	0,087 \pm 0,00	3,270 \pm 0,00	6,207 \pm 0,01	2,00