

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO EM
Penicillium echinulatum

DENISE ZAMPIERI

Caxias do Sul

2011

DENISE ZAMPIERI

EXPRESSÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO EM

Penicillium echinulatum

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de mestrado em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Caxias do Sul

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

Z26e Zampieri, Denise, 1981-
Expressão do complexo celulolítico em *penicillium echinulatum*
/ Denise Zampieri. - 2011.
viii, 99 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.
Orientação: Prof. Dr. Aldo J.P. Dillon, Prof. Dr^a. Marli
Camassola.

1. *Penicillium echinulatum*. 2. Celulases. 3. Xilanases . 4.
Enzimas. I. Título.

CDU: 582.282.123.2

Índice para o catálogo sistemático:

1. <i>Penicillium echinulatum</i>	582.282.123.2
2. Celulases	547.458.8
3. Xilanases	547.455.526
4. Enzimas	577.15

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Cleoni Cristina G. Machado - CRB 10/1355

DENISE ZAMPIERI

EXPRESSÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO EM

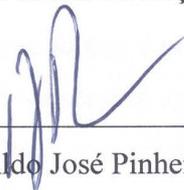
Penicillium echinulatum

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P Dillon

Co-orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

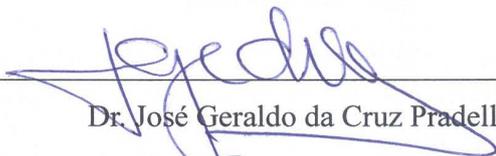
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11 DE MARÇO DE 2011.



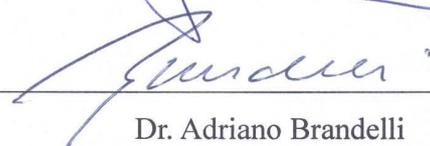
Dr. Aldo José Pinheiro Dillon



Dra. Marli Camassola



Dr. José Geraldo da Cruz Pradella



Dr. Adriano Brandelli



Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna

Aprendendo a viver

Aprendi que se aprende errando.

Que crescer não significa fazer aniversário.

Que o silêncio é a melhor resposta, quando se ouve uma bobagem.

Que trabalhar significa não só ganhar dinheiro.

Que amigos a gente conquista mostrando o que somos.

Que os verdadeiros amigos sempre ficam com você até o fim.

Que a maldade se esconde atrás de uma bela face.

Que não se espera a felicidade chegar, mas se procura por ela.

Que quando penso saber de tudo ainda não aprendi nada.

Que a Natureza é a coisa mais bela na Vida.

Que amar significa se dar por inteiro.

Que um só dia pode ser mais importante que muitos anos.

Que se pode conversar com estrelas.

Que se pode confessar com a Lua.

Que se pode viajar além do infinito.

Que ouvir uma palavra de carinho faz bem à saúde.

Que dar um carinho também faz...

Que sonhar é preciso.

Que se deve ser criança a vida toda.

Que nosso ser é livre.

Que Deus não proíbe nada em nome do amor.

Que o julgamento alheio não é importante.

Que o que realmente importa é a Paz interior.

(Herman Melville)

Dedico este trabalho aos meus pais Celestino e Ione e aos meus irmãos Andressa e Jeison pelo apoio e incentivo em minhas escolhas e pela compreensão e amor dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

Deixo meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desta caminhada junto comigo, que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho:

- a Deus;

- aos meus orientadores Dr. Aldo J. P. Dillon e Dra. Marli Camassola pela atenção dispensada e conhecimento compartilhado;

- aos professores da banca de acompanhamento Dr. Sérgio Echeverrigaray e Dr. Diego Bonatto;

- aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e funcionários do Instituto de Biotecnologia;

- aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas, pela agradável convivência, em especial a estagiária Letícia Guerra que contribuiu diretamente para a realização deste trabalho;

- aos amigos de longa data que estiveram sempre ao meu lado;

- à Dra. Suelen O. Paesi pela oportunidade do estágio docente e amizade sincera;

- aos meus pais Celestino e Ione Zampieri pelo carinho e confiança depositados em mim. E aos meus irmãos Andressa e Jeison por lutar comigo sempre;

- ao apoio estrutural e financeiro da UCS, FINEP e CNPq.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Energias renováveis	4
2.2 Biomassa lignocelulósica	7
2.3 Celulases	10
2.4 Microrganismos produtores de celulases	14
2.5 Xilanases	15
2.6 Microrganismos produzidos de xilanases	16
2.7 <i>Penicillium echinulatum</i>	17
2.8 Meios de cultivo: indução e repressão	17
2.9 Expressão das celulases	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Linhagem	28
3.2 Meios e condições de cultivo	28
3.2.1 Crescimento e manutenção da linhagem	28
3.2.2 Cultivo para crescimento e produção de celulases e xilanases	28
3.3 Determinação do crescimento fúngico	29
3.4 Determinação das proteínas solúveis totais	30
3.5 Dosagens enzimáticas	30
3.5.1 Determinação de FPA	30
3.5.2 Determinação de endoglicanases	32
3.5.3 Determinação de β -glicosidases	32

3.5.4 Determinação de xilanases	33
3.6 SDS-PAGE de soluções enzimáticas	34
3.7 Zimogramas para celulasas	35
3.7.1 Endoglicanases	35
3.7.2 β -glicosidases	36
3.8 Análise estatística	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Determinação da massa micelial de <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivo submerso	38
4.2 Potencial hidrogeniônico (pH) dos caldos enzimáticos	40
4.3 Determinação das proteínas solúveis totais produzidas por <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivo submerso	41
4.4 Atividades enzimáticas de celulasas, β -glicosidases e xilanases por <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivo submerso	42
4.4.1 Atividade sobre papel filtro	42
4.4.2 Atividade de endoglicanases	44
4.4.3 Atividade de β -glicosidases	49
4.4.4 Atividade de xilanases	51
4.5 SDS-PAGE de caldos enzimáticos produzidos por <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivos submersos	57
4.6 Zimograma para atividade de endoglicanases de caldos enzimáticos produzidos por <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivos submersos	60
4.7 Zimograma para atividade de β -glicosidases de caldos enzimáticos produzidos por <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivos submersos	66
5. CONCLUSÕES	76
6. PERSPECTIVAS	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fontes de energia renováveis	5
Figura 2. Produtos energéticos derivados da agroenergia	6
Figura 3. Estrutura lignocelulósica evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose em um tecido vegetal	8
Figura 4. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose	9
Figura 5. Estrutura da celulose indicando a região cristalina e amorfa	10
Figura 6. Sinergismo entre celobiohidrolases, endoglicanases e β -glicosidases para a hidrólise da celulose pelo sistema celulolítico	13
Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de micélio da linhagem 9A02S1 de <i>Penicillium echinulatum</i>	17
Figura 8. Variação do pH (●) dos caldos enzimáticos de <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono em frascos sob agitação recíproca comparando-se com o crescimento micelial (▲). As determinações de crescimento em meio com fonte solúvel foram realizados por gravimetria. Para celulose, o crescimento foi estimado por medida de ácidos nucleicos. As fontes de carbono empregadas estão mencionadas no gráfico.	39
Figura 9. Concentração das proteínas solúveis totais dosadas nos caldos enzimáticos produzidos por <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono como substrato	42
Figura 10. Atividades sobre papel filtro (FPA) determinadas a partir de cultivos submersos de <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos sob agitação recíproca	43
Figura 11. Atividade de endoglicanases de amostras de caldos enzimáticos produzidos por <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos sob agitação recíproca	45

- Figura 12. Atividade de endoglicanases (■) de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos mantidos sob agitação recíproca comparando-se com o crescimento micelial (▲) nos cultivos com diferentes fontes de carbono(1%) 45
- Figura 13. Atividade de endoglicanases (■) de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos mantidos sob agitação recíproca comparando-se com o pH (●) nos cultivos com diferentes fontes de carbono (1%) 48
- Figura 14. Atividade de β -glicosidases determinada pela hidrólise de salicina como substrato em caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca 49
- Figura 15. Atividade de β -glicosidases determinada com pNPG como substrato em caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca 50
- Figura 16. Atividade de xilanases de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca 52
- Figura 17. Perfil de proteínas totais separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir do caldo enzimático de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de fonte de carbono. 59
- Figura 18. Atividade de endoglicanases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **celulose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 61
- Figura 19. Atividade de endoglicanases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de **CMC** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 62
- Figura 20. Atividade de endoglicanases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **celobiose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 63
- Figura 21. Atividade de endoglicanases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **glicerol** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 66
- Figura 22. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático 67

produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **celulose** em frascos mantidos sob agitação recíproca.

Figura 23. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **CMC** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 68

Figura 24. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **celobiose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 69

Figura 25. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **glicose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 70

Figura 26. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **sacarose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 71

Figura 27. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **glicerol** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 72

Figura 28. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **sorbitol** em frascos mantidos sob agitação recíproca. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades das celulases produzidas pelo <i>T. reesei</i>	26
Tabela 2. Picos de atividades enzimáticas de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases	53
Tabela 3. Atividade específica de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases, e rendimento de biomassa	54
Tabela 4. Quantidades em μg de proteínas utilizadas na realização das eletroforeses em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos diferentes meios de cultivo	57
Tabela 5. Quantidades em μg de proteínas utilizadas na realização das eletroforeses em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com glicose, sacarose e sorbitol	64

ABREVIATURAS

BG: β -glicosidase

CBH: celobiohidrolase

CMC carboximetilcelulose

Conab: Companhia Nacional de Abastecimento

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico

EC: Enzyme Comission

EDTA: etilenodiaminotetracetato

EnG: endoglicanase

ExG: exoglicanase

FPA: Filter Paper Activity – atividade celulásica total

GH: glucanohidrolase

IUBMB: International Union Biochemistry and Molecular Biology

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDCI: Mecanismo de Desenvolvimento Limpo no Brasil

MDL: Mecanismo de Desenvolvimento Limpo

MME: Ministério de Minas e Energia

mmr: massa molecular relativa

MS: meio de sais

ONU: Organização das Nações Unidas

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

rpm: rotações por minuto

RT-PCR Transcriptase Reverse - Polymerase Chain Reaction – transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SDS: dodecil sulfato de sódio

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina

WWF: World Wildlife Fund

U/massa: Unidades por massa

UI.mL⁻¹: Unidades Internacionais por mL

Y_{xs}: rendimento da biomassa

ρNPG: p-nitrophenilβ-D-glicopiranosideo

RESUMO

O *Penicillium echinulatum* linhagem 9A02S1 é um fungo filamentososo que apresenta um sistema celulolítico com potencial para aplicação em processos de degradação de materiais lignocelulósicos para produção de etanol. O crescente interesse nesse combustível e a abundância de materiais lignocelulósicos que podem ser usados como matéria-prima fez aumentar o interesse no estudo de celulases. Neste estudo, a linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* foi cultivada em cultivos submersos em frascos mantidos sob agitação recíproca, com variações quanto às fontes de carbono. Além de crescimento, foram avaliadas as produções de celulases, β -glicosidases e xilanases e a expressão das enzimas através de zimogramas em géis de poliacrilamida para determinação da massa molecular. Observou-se que o crescimento micelial provocou a redução do pH do meio de cultivo, e que não está relacionado a produção de enzimas. A celulose apresentou-se como indutora para todas as enzimas analisadas. A carboximetilcelulose mostrou-se uma eficiente fonte de carbono para a produção de atividade sobre papel filtro, endoglicanases e xilanases, apesar do baixo crescimento micelial. Celobiose, glicerol e glicose estimularam a produção de β -glicosidases. Uma banda de atividade endoglicanásica de 74 kDa foi detectada nos zimogramas de todos os caldos enzimáticos obtidos na presença de diferentes fontes de carbono, sugerindo esta seja uma enzima constitutiva. A expressão da β -glicosidase ocorreu ao final do cultivo (5^o e 6^o dias), sendo que em todos os cultivos avaliados houve a expressão de uma banda de 220 kDa, indicando tratar-se de uma enzima constitutiva. A expressão de outras bandas com diferentes massas moleculares sugerem que diferentes genes, formas multiméricas ou modificações pós-traducionais estão envolvidos no perfil destas enzimas em *Penicillium echinulatum*.

PALAVRAS-CHAVE

Penicillium echinulatum, fontes de carbono, celulases, endoglicanases, β -glicosidases, xilanases.

ABSTRACT

The strain of *Penicillium echinulatum* 9A02S1 is a filamentous fungus that presents a cellulolytic system with potential application in processes of degradation of lignocellulosic materials for ethanol production. The growing interest in fuel and the abundance of lignocellulosic materials that can be used as raw material has increased the interest in cellulases. In this study, the strain *P. echinulatum* 9A02S1 was grown in submerged cultivation in agitated flasks in presence of different carbon sources. In addition to growth, it was evaluated the production of cellulases, β -glucosidases and xylanases, and enzyme expression in activity polyacrylamide gels in order to determinate the molecular mass. The mycelial growth decreased pH of the medium and this fact was not related to enzyme production. The cellulose was an inducer for all the enzymes analyzed. The carboximetilcellulose was found to be an efficient carbon source for production of filter paper activity, endoglucanases and xylanases, despite the low mycelial growth. Cellobiose, glycerol and glucose stimulated the production of β -glucosidases. An endoglucanase band of 74 kDa was detected in zymograms of all enzyme broths obtained in the presence of different carbon sources, suggesting it is a constitutive enzyme. The expression of β -glucosidase occurred at the end of cultivation (5 and 6 days), and in all medium that was evaluated was observed a 250 kDa band, indicating that this is a constitutive enzyme. The expression of other bands with different molecular mass suggest that different genes, multimeric forms or post-translational modifications are involved in the expression of these enzymes in *P. echinulatum*.

KEYWORDS

Penicillium echinulatum, carbon sources, cellulases, endoglucanases, β -glucosidases, xylanases.

1. INTRODUÇÃO

É crescente o interesse internacional pelo desenvolvimento da tecnologia de hidrólise enzimática de lignocelulósicos para a produção de etanol a partir da fermentação dos açúcares liberados. O mercado mundial de etanol está se expandindo como consequência da grande demanda por combustíveis líquidos e de políticas ambientais de vários países, nos quais recomenda-se a sua adição à gasolina.

As mudanças climáticas mundiais geradas pelo efeito estufa – efeito causado pela liberação de gases no ar, principalmente pelo dióxido de carbono, em consequência da utilização do petróleo, do gás natural, do carvão e da destruição das florestas tropicais – têm contribuído para que o etanol torne-se uma alternativa aos combustíveis fósseis por se tratar de um combustível produzido a partir de matérias-primas renováveis. Entretanto, a quantidade de etanol disponível atualmente não é suficiente para atender a demanda mundial, o que poderá estimular a substituição de plantios de culturas destinadas à produção de alimentos por culturas energéticas, como cana-de-açúcar, beterraba e milho, que são empregados para a produção de açúcares fermentescíveis.

O uso de resíduos de biomassa lignocelulósica apresenta uma perspectiva bastante promissora para a produção de etanol em larga escala. Entretanto, as tecnologias para produção de etanol a partir destes substratos ainda estão em estudo a fim de tornar o processo economicamente viável. Esses estudos baseiam-se na hidrólise enzimática de lignocelulósicos empregando celulasas e xilanasas para a produção de xaropes de glicose e xilose que, posteriormente possam ser fermentados para a produção de etanol e outros produtos biotecnológicos.

Visto que um grande gargalo para a tecnologia é o custo de produção das enzimas para hidrolisar a biomassa lignocelulósica, no início desta década os Estados Unidos, através do Departamento de Agricultura, investiram quase 30 milhões de dólares na contratação das empresas

Novozymes Latin America Ltda e da Genencor International para o desenvolvimento de complexos enzimáticos mais eficientes e de baixo custo.

Ambas as empresas referem uma diminuição do custo das celulases de US\$ 5.40 por galão de etanol para, aproximadamente, 20 centavos de dólar por galão por meio de duas estratégias principais que consistiram em melhorar a produção de celulases por modificações genéticas nas linhagens e redução do custo do meio de produção.

Os organismos celulolíticos, como bactérias e fungos filamentosos, produzem um conjunto de proteínas que hidrolisam sinergicamente a celulose em pequenos oligossacarídeos e finalmente à glicose. Devido a celulose ser a fonte de carbono orgânico mais abundante da Terra, os organismos celulolíticos são muito importantes para a reciclagem do carbono na natureza.

Neste sentido, o crescente interesse na hidrólise de resíduos lignocelulósicos tem justificado a prospecção e o estudo de novos microrganismos produtores de hidrolases. Entre os microrganismos que apresentam um grande potencial para a produção comercial de celulases para a hidrólise da celulose encontra-se a linhagem mutante 9A02S1 de *Penicillium echinulatum*. Já são conhecidas informações deste microrganismo quanto sua capacidade de hidrolisar papel filtro, carboximetilcelulose e celobiose, tanto com preparados enzimáticos produzidos em cultivos submersos em frascos mantidos sob agitação recíproca, em bioreatores, assim como em cultivos em estado sólido. As enzimas também já foram caracterizadas quanto aos ótimos de temperatura e pH e estabilidade térmica. Entretanto, pouco é conhecido sobre o controle de expressão das celulases.

O objetivo geral do presente trabalho foi conhecer os efeitos de diferentes fontes de carbono na secreção de celulases e xilanases de *P. echinulatum*, linhagem 9A02S1, tendo como objetivos específicos:

* avaliar a diferença do crescimento micelial de *P. echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos formulados com diferentes fontes de carbono, em frascos mantidos sob agitação

recíproca;

- * relacionar os valores de pH com o crescimento micelial de *P. echinulatum* 9A02S1;

- * avaliar proteínas solúveis totais e atividades de FPA (atividade em papel filtro), endoglicanases, β -glicosidases e xilanases em soluções enzimáticas de *P. echinulatum* 9A02S1;

- * relacionar as atividades enzimáticas com o crescimento micelial de *P. echinulatum* 9A02S1 crescidos em cultivos submersos com diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca;

- * avaliar a quantidade de enzimas expressas em SDS-PAGE de soluções enzimáticas de *P. echinulatum* 9A02S1;

- * avaliar perfis de atividade de endoglicanases e β -glicosidases de soluções enzimáticas de *P. echinulatum* 9A02S1, após renaturação de proteínas em gel desnaturante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Energias renováveis

A grande problemática das mudanças climáticas no planeta é o efeito estufa, causado por gases poluentes do ar - principalmente o dióxido de carbono - em consequência da utilização dos derivados do petróleo, gás natural, carvão e a destruição das florestas tropicais. A partir do Protocolo de Kyoto, tratado internacional que prevê a diminuição nos níveis de poluição mundial, vários países se comprometeram a buscar soluções para o problema (Rigon *et al.*, 2007).

Diante dos desafios competitivos de reduzir a pobreza e investir em desenvolvimento, é encorajador que as economias emergentes comprometeram-se a intervir na tendência de aumento das emissões de gases poluentes e que busquem vias de desenvolvimento para tanto. Essas ações devem reforçar a cooperação entre os países desenvolvidos e as economias emergentes que poderiam dar uma nova dinâmica às negociações climáticas da ONU (WWF, 2010).

Com a crescente demanda mundial por energia e a limitação dos recursos petrolíferos há um aumento no interesse em combustíveis alternativos, especialmente os combustíveis líquidos (Wyman, 2007; Lynd *et al.*, 2008). O bioetanol obtido a partir da biomassa lignocelulósica é uma das alternativas a ser considerada importante devido à adaptabilidade dos motores existentes à este combustível e porque este é um combustível mais “limpo”, com maior octanagem que a gasolina (Wheals *et al.*, 1999; Grad, 2006).

Cada vez mais tem-se intensificado a busca por alternativas energética ao petróleo (Figura 1). O Brasil está movendo-se em direção à independência energética através da expansão de fontes de energia alternativas como hidroelectricidade, etanol e biodiesel. A produção de etanol proveniente da cana-de-açúcar é sustentável em termos financeiros e ambientais (Banco Mundial, 2008).

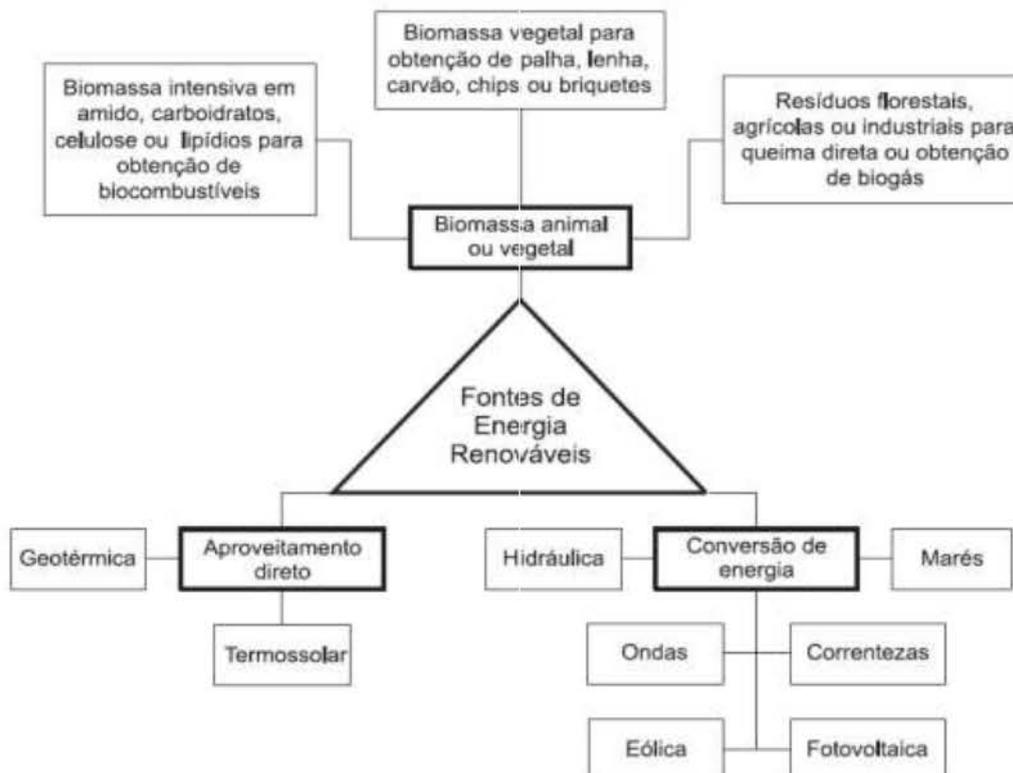


Figura 1. Fontes de energia renováveis (MAPA, 2006 - Elaborado por L. Gazzoni).

A dimensão do mercado brasileiro e as características climáticas permitiram estabelecer uma produção sistemática e competitiva de etanol a partir de cana-de-açúcar e garantem o sucesso das iniciativas ao que se refere à energia oriunda da biomassa. O mercado externo já está em formação. Vários países têm programas internos de produção e uso de biocombustíveis, principalmente em mistura com os combustíveis fósseis. O Brasil reúne vantagens comparativas que lhe permite liderar o mercado internacional de biocombustíveis e promover ações de promoção dos produtos energéticos derivados da agroenergia (Figura 2), pois possui condições climáticas e uma excepcional disponibilidade de terra e água para o desenvolvimento de programas que objetivam a produção de biocombustíveis. Outro fator importante é a experiência na produção em larga escala, distribuição e consumo do etanol obtido da cana-de-açúcar (Escobar *et al.*, 2009). A ampliação das exportações, além de gerar divisas, consolidará o setor e impulsionará o desenvolvimento do país (MAPA, 2006).

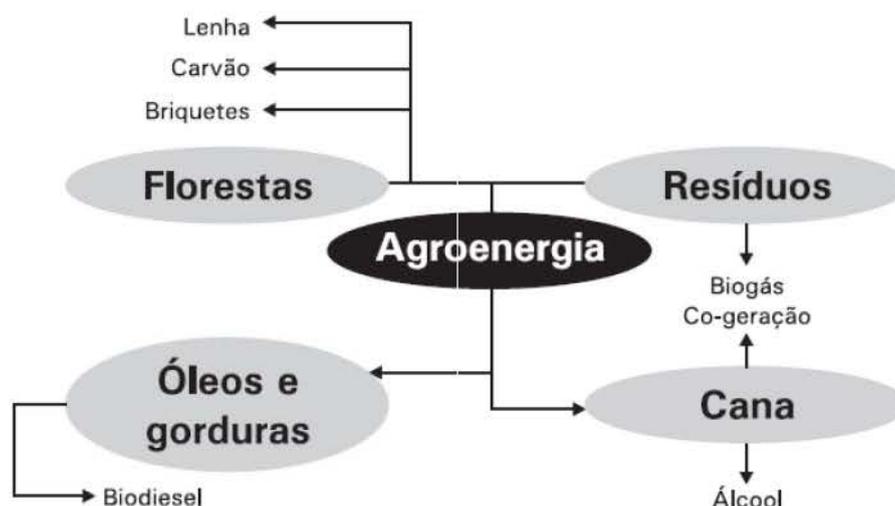


Figura 2. Produtos energéticos derivados da agroenergia (MAPA, 2006).

A matriz energética brasileira é uma das mais “limpas”. Estimativas da *International Energy Agency* (IEA) indicam que 35,9% da energia produzida e fornecida no Brasil é de origem renovável, enquanto, no mundo em geral, esse valor é de 13,5%. Nos Estados Unidos, é de apenas 4,3%, e na Inglaterra, de 1,1% (MAPA, 2006).

O etanol pode ser obtido de diversas fontes de biomassa, sendo a cana-de-açúcar a realidade econômica atual. Altos investimentos estão sendo efetuados para viabilizar a produção de etanol a partir de celulose, sendo estimado que, em 2020, cerca de 30 bilhões de litros de etanol poderiam ser obtidos desta fonte, apenas nos EUA. O benefício ambiental associado ao uso de etanol é elevado, pois cerca de 2,3 toneladas de CO₂ deixam de ser emitidas para cada tonelada de etanol combustível utilizado, sem considerar outras emissões, como o SO₂ (Gazzoni, 2006).

O combustível derivado da biomassa tem sido foco de interesse em pesquisas por suas vantagens sobre os combustíveis fósseis. A biomassa é renovável, “limpa” e está amplamente disponível (Xuan *et al.*, 2009).

Os resíduos lignocelulósicos têm despertado interesse para a produção de bioetanol, pois não interfere na produção de alimentos. Pesquisas recentes revelam que dejetos animais, esgoto

municipal, restos de frutas e papéis podem ser transformados em bioetanol por sacarificação e fermentação (Foyle *et al.*, 2007; Wilkins *et al.*, 2007; Lal, 2008).

Uma tonelada de cana-de-açúcar produz 80 litros de etanol, sendo que um hectare de terra produz cerca de 80 toneladas de cana-de-açúcar, assim, podem ser produzidos cerca de 6000 litros de etanol por hectare (Datagro, 2005). Segundo Carvalho (2005), para cada 80 litros de etanol produzidos, 280 kg de bagaço de cana-de-açúcar são gerados. Assim, se o conteúdo de celulose presente nesta quantidade de bagaço fosse hidrolisado e fermentado seria possível obter um adicional de aproximadamente 56 litros de etanol, evidenciando a importância da hidrólise deste resíduo para a produção de combustíveis.

2.2 Biomassa lignocelulósica

A lignocelulose é o principal componente da biomassa, incluindo cerca de metade do material vegetal produzido pela fotossíntese e que representa o mais abundante recurso orgânico renováveis. É constituída por três tipos de polímeros, celulose, hemicelulose e lignina que estão fortemente interligados (Pérez *et al.*, 2002) (Figura 3). Esses três componentes correspondem a 97-99% da massa seca dos lignocelulósicos (Mosier *et al.*, 2005).

A lignina presente na parede celular constitui uma estrutura de suporte, impermeável e resistente ao ataque microbiano (Pérez *et al.*, 2002). Trata-se de um heteropolímero amorfo de elevada massa molecular, formado pela polimerização de unidades fenólicas e alcoóis. Em função dessas propriedades, esse biopolímero é de difícil degradação comparado a outros polissacarídeos, permanecendo nos solos como componentes recalcitrantes do húmus (Silva & Gomes, 2004). Estudos de degradação da lignina são de extrema importância, pois ela permanece sempre associada à celulose e à hemicelulose nos vegetais, dificultando o aproveitamento destes carboidratos. A lignina é o segundo polímero mais abundante na Terra e apresenta uma estrutura molecular bastante complexa, associando-se covalentemente com a hemicelulose, prevenindo o acesso de agentes

hidrolíticos à celulose (Pérez *et al.*, 2002).

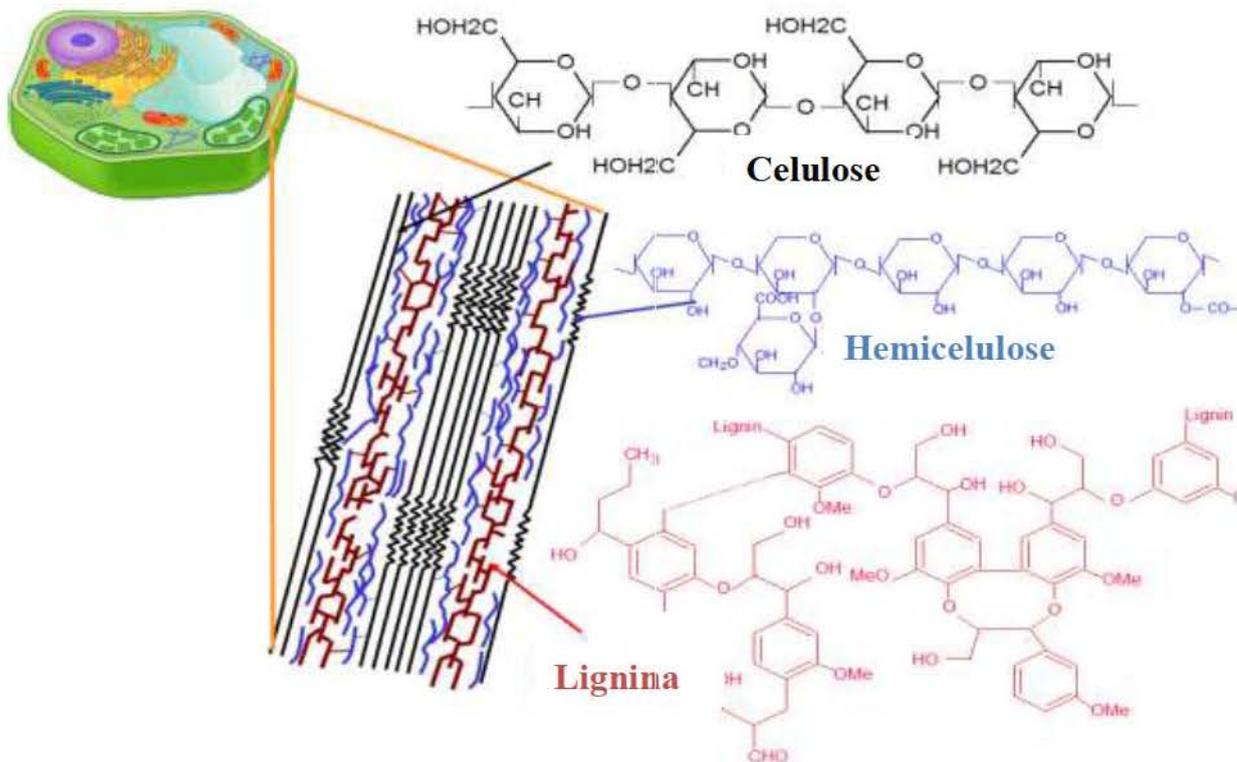


Figura 3. Estrutura lignocelulósica evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose em um tecido vegetal. Figura elaborada por Marli Camassola.

A hemicelulose é um polissacarídeo de baixa massa molecular, compreendendo 30% a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, tendo como função ligar as microfibrilas de celulose (Coughlan & Hazlewood, 1993). É estruturalmente mais parecida com a celulose do que com a lignina e é depositada na parede celular em um estágio anterior à lignificação (Ramos, 2003).

Os componentes hemicelulósicos da parede celular vegetal incluem uma grande variedade de polissacarídeos com estruturas lineares e/ou ramificadas e geralmente são classificados de acordo com o principal açúcar presente na sua composição (Beg *et al.*, 2001). A hemicelulose é um polímero de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) entre outros açúcares. As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes e se constituem em heteropolissacarídeos formados por unidades de β -D-xilopirranose unidas por ligações do tipo β -1,4 e, ocasionalmente por ligações do tipo β -1,3. Além de xilose, a xilana pode conter arabinose, ácido

glucurônico e o seu 4-*o*-metil-éter e acetil (Saha, 2003). Todos os monômeros da hemicelulose são unidos por ligações facilmente hidrolisáveis (Pérez *et al.*, 2002).

A celulose é o principal componente das fibras vegetais e é encontrada ao longo de todo o reino vegetal. Trata-se de um homopolissacarídeo formado por unidades de β -glicopirranose (D-glicose) unidas por ligações do tipo β -1,4. Cada resíduo de glicose tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, formando assim a celobiose, a subunidade repetitiva do polímero (Figura 4). Cada microfibrila é sintetizada independentemente e contém entre 2.000 e 20.000 resíduos de D-glicose. A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glicose cujo carbono anomérico não está livre é chamada extremidade redutora; a outra extremidade é chamada não redutora (Sandgren *et al.*, 2005). As fibrilas são unidas por pontes de hidrogênio tanto intra como inter cadeias de celulose. Cada camada adjacente de celulose é ainda unida por forças de van der Waals que resulta em uma fibra compacta (Lynd *et al.*, 2002). Apesar de a molécula de celulose ser hidrofílica, é difícil que a água penetre no interior da celulose cristalina à temperatura ambiente. As regiões de celulose cristalina - região mais compacta e de difícil degradação enzimática - são separadas por regiões de menor organização, denominadas amorfas (Figura 5). As regiões de celulose amorfa apresentam menor resistência aos ataques químicos e biológicos, sendo, portanto, pontos de degradação (Fan *et al.*, 1980).

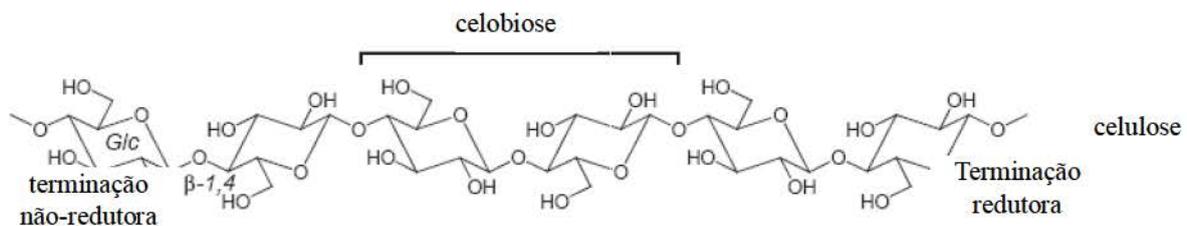


Figura 4. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de Sandgren, 2005).

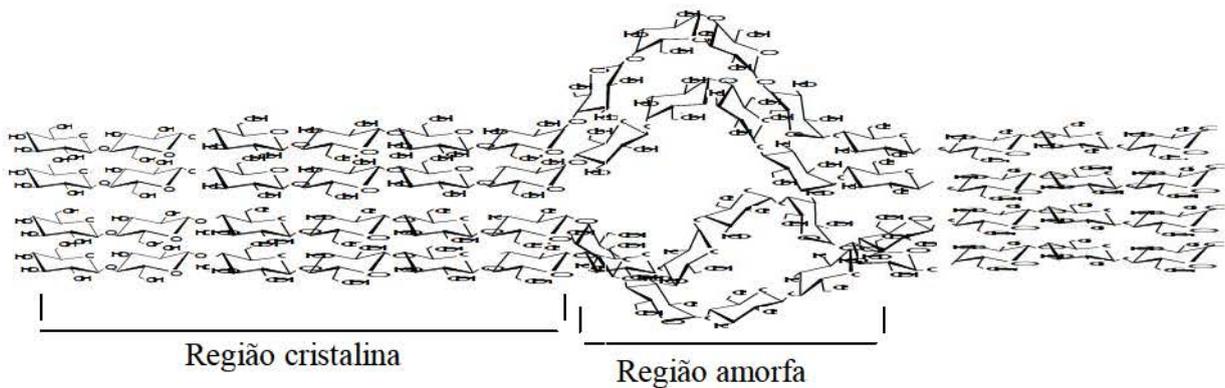


Figura 5. Estrutura da celulose indicando a região cristalina e amorfa (Dillon, 2004a).

2.3 Celulases

A conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares monoméricos por meio da ação de enzimas celulolíticas tem grande importância, uma vez que os açúcares podem servir como matéria-prima em uma série de processos biotecnológicos. Nas últimas décadas, as tecnologias baseadas na atividade de celulases despertaram interesse em todo o mundo. Recentemente, a investigação para encontrar substratos adequados para a produção de enzimas celulolíticas para a obtenção de biocombustíveis, tais como etanol de segunda geração, tem sido de particular interesse. O substrato ideal deve ser de baixo custo, facilmente processado, disponível em grandes quantidades e sua composição deve ser adequada tanto para a produção de enzima celulolítica como para a hidrólise. Produção de celulases em vez da utilização de enzimas comerciais pode melhorar a economia do processo (Lawford & Rousseau, 2003).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (Henrissat, 1991).

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, possibilita a organização de três grandes grupos: (1) endoglicanases que clivam ligações internas da

fibra celulósica; (2) exoglicanases que atuam na região externa da celulose; e (3) β -glicosidases que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (Lynd *et al.*, 2002; Dillon, 2004a).

Endoglicanase, que está classificada como EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase. É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (Lynd *et al.*, 2002). A endoglicanase é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à fragmentação da celulose em oligossacarídeos (Kleman-Leyer *et al.*, 1996).

O grupo das exoglicanases é constituído por celobiohidrolase e glucano-hidrolase. A celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase. Embora a IUBMB defina a celobiohidrolase como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores da fibra celulósica e oligossacarídeos com GP>3 em celobiose, há relatos da ação desta em terminais redutores por essa enzima (Lynd *et al.*, 2002; Miettinen-Oinonen, 2004).

A CBH ainda pode ser dividida em dois tipos: a enzima do tipo I (CBH I) que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores. As exoglicanases geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose). A provável produção celulolítica constitutiva em *Trichoderma sp.*, poderia estar associada a presença de celobiohidrolases I e II na superfície dos conídios do fungo, segundo testes imunológicos realizados por Messner *et al.* (1991). Assim, tais enzimas unidas aos conídios realizariam a degradação inicial da celulose, gerando indutores para a biossíntese de celulasas, o que poderia explicar a detecção da atividade celulolítica no meio contendo glicose 1% (m/v). Essa expressão constitutiva tem sido

igualmente indicada por diversos autores mediante uso de anticorpos e análise de expressão gênica (El-Gogary *et al.*, 1989; Henrique-Silva *et al.*, 1996).

O terceiro grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a β -glicosidase (EC 3.2.1.21). A β -glicosidase tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose. (Lynd, *et al.*, 2002; Lynd & Zhang, 2002). Por não atuar diretamente sobre a celulose, esta enzima não é considerada uma celulase por muitos autores. A baixa atividade de β -glicosidase resultará no acúmulo de celobiose que é um inibidor da atividade de celobiohidrolase (Holtzapple *et al.*, 1990; Tolan & Foody, 1999). A celobiohidrolase, também apresenta a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise, a glicose.

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento superior que a soma dos rendimentos individuais, efeito é conhecido como sinergismo. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases: sinergia EnG-ExG - a endoglicanase, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia ExG-ExG - as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglicanase; sinergias ExG-BG e EnG-BG - como seus produtos de hidrólise, a celobiohidrolase e a endoglicanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β -glicosidase (Bhat & Bhat, 1997, Lynd *et al.*, 2002).

A Figura 6 ilustra a ação sinérgica entre exoglicanase, endoglicanase e β -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.

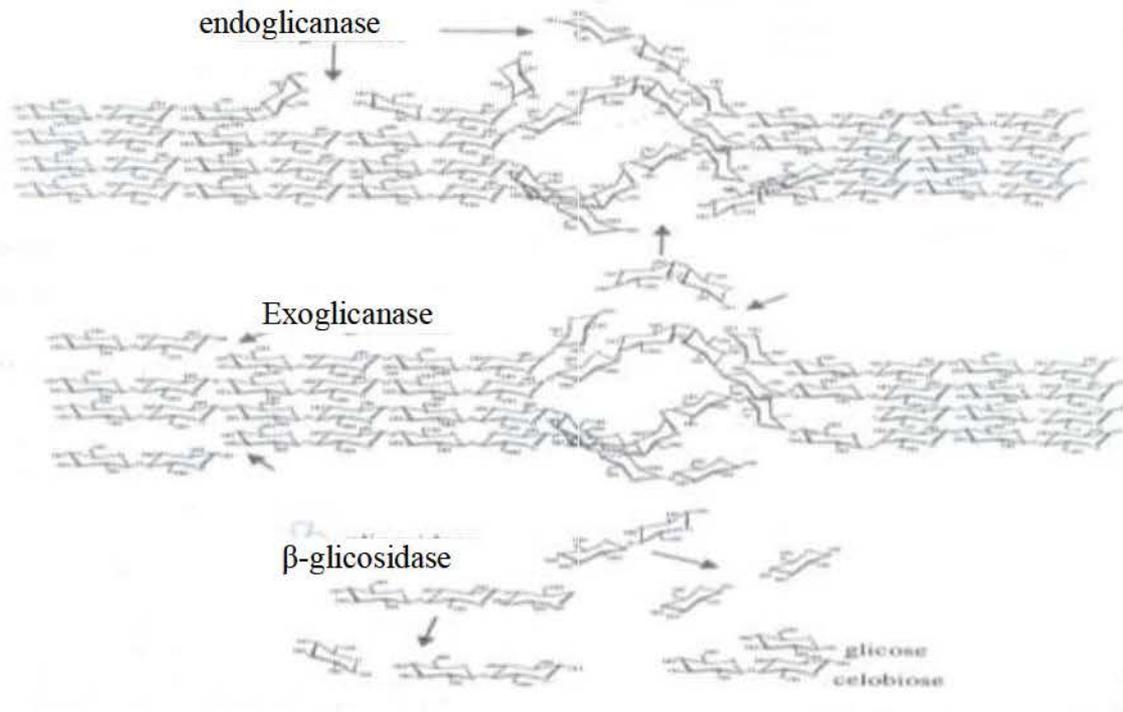


Figura 6. Sinergismo entre celobiohidrolases, endoglicanases e β -glicosidases para a hidrólise da celulose pelo sistema celulolítico (Adaptado de Dillon, 2004a).

O complexo das celulases é atualmente o terceiro maior complexo enzimático industrial em todo o mundo em valor de mercado. Atualmente, celulases comerciais disponíveis são produzidas, em sua maioria a partir de fungos celulolíticos aeróbios, como *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) ou *Humicola insolens* (Schulein, 1998).

Comercialmente estas enzimas são principalmente empregadas na indústria têxtil e de detergentes (Anish et al., 2007; Miettinen-Oinonen & Suominen, 2002). Na área têxtil, as celulases são utilizadas para desenvolver o aspecto de usado e desbotado (bioestonagem) em tecidos de algodão tingidos com índigo e, também, para a retirada das regiões de desorganização de microfibrilas de celulose (“pilling”) e amaciamento dos tecidos. Como componentes de detergentes, as celulases são utilizadas para remover extremidades de microfibrilas que são retiradas do tecido juntamente com a sujeira e, ainda, proporcionam maior brilho aos tecidos. As celulases também vêm sendo utilizadas como aditivos na preparação do malte de cerveja, em processos de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido, na preparação de alimentos infantis, produtos

dermatológicos e no tratamento de lixo orgânico (Kubicek *et al.*, 1993). Na área de alimentação animal, são comercializadas como componentes de indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose (Dillon, 2004a). Porém, o seu maior potencial ainda não foi explorado que é o seu emprego na sacarificação da celulose para a produção de etanol, pois o processo deve requerer altas quantidades destas enzimas (Himmel *et al.*, 1999; Yinbo *et al.*, 2006; Gusakov *et al.*, 2007).

2.4 Microrganismos produtores de celulases

As celulases, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose (Kubicek *et al.*, 1993). Grande parte da produção industrial de celulases é realizada com o emprego de alguns fungos filamentosos, os quais são eficientes produtores de enzimas hidrolíticas. O microrganismo base para os estudos de produção de celulases foram linhagens provenientes do *Trichoderma reesei* QM6a, as quais encontram-se entre as linhagens mais estudadas com relação ao controle da expressão gênica. Atualmente é conhecido que em *T. reesei* o processo de indução inicia-se devido a existência de celulases basais que são secretadas em pequenas quantidades e localizam-se nas paredes de conídios e hifas. A ação destas enzimas na celulose insolúvel permite a liberação de celobiose e pequenos oligossacarídeos que podem entrar na célula e desencadear o processo de indução (Henrique-Silva *et al.*, 1996).

A capacidade dos fungos filamentosos de crescer em substratos bastante simples e de baixo custo, bem como sua capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos comercialmente interessantes tem atraído considerável interesse para explorá-los pela Biotecnologia. Hoje em dia, os fungos filamentosos são utilizados em Biotecnologia como fábricas celulares para uma ampla gama de produtos. Diversos compostos orgânicos que vão desde simples ácidos a complexos metabólitos secundários são produzidos para o uso em vários segmentos de mercado. Devido à sua

excepcional capacidade de expressar e secretar proteínas, os fungos filamentosos tornaram-se indispensáveis para a produção de enzimas. Atualmente, enzimas nativas ou recombinantes são produzidas principalmente por *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *T. reesei* e também outras linhagens estão em desenvolvimento (Punt *et al.*, 2002).

O complexo enzimático produzido pelo *T. reesei* - que possui o sistema celulásico mais estudado da literatura - é conhecido por apresentar baixa atividade de β -glicosidase e uma grande quantidade de exoglicanases, que correspondem a cerca de 80% do total de proteínas secretadas por este fungo (Teeri, 1997). De acordo com Martins *et al.* (2005), o complexo enzimático de *P. echinulatum* apresenta atividade de β -glicosidase superior ao de *T. reesei*. Este fato indica a sua potencialidade em processos onde a sacarificação total da celulose seja desejada, pois a manutenção da celobiose em baixos níveis evita o efeito inibitório destas sobre as celulases.

A co-cultura de *T. reesei* e *A. niger* suplementada com lactose e ácido lactobiónico em bioreator, levou a uma degradação mais eficiente da celulose e produziu celulases em quantidades mais significativas em comparação às monoculturas destes fungos (Ahamed & Vermett, 2008).

2.5 Xilanases

As xilanases são produzidas por diversos organismos, tais como bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes. Fungos filamentosos produtores de xilanases são particularmente interessantes, uma vez que secretam maiores quantidades de enzima em relação a bactérias e leveduras. Ainda, as xilanases fúngicas são produzidas em associação a celulases formando um complexo capaz de hidrolisar de forma mais eficiente substratos lignocelulósicos (Liu *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2001).

As xilanases (1,4- β -D-xilana xilanoidrolase, EC 3.2.1.8) constituem um grupo de enzimas com aplicações industriais, particularmente na indústria de alimentos e rações, mas também são utilizadas nas indústrias de papel (biobranqueamento). As formulações com xilanases para rações

animais são utilizadas, principalmente, para liberar nutrientes que não foram degradados ou liberar nutrientes que permaneceram bloqueados por fibras. Isto resulta em diminuição da viscosidade, possibilitando uma utilização mais eficiente do alimento (Xiong *et al.*, 2005). Também são utilizadas para melhorar a eficiência na produção de silagens (Kulkarni *et al.*, 1999).

Na indústria de papel, as xilanases são empregadas em formulações livres de celulases para hidrolisar a xilana presente na polpa e facilitar a extração da lignina. Ainda, a utilização destas enzimas reduz o consumo de reagentes tóxicos (cloro e peróxido de hidrogênio) requeridos no processo de branqueamento da polpa (Madlala *et al.*, 2001), além de possibilitar a obtenção de um papel com maior resistência (Damaso *et al.*, 2002). No processamento de alimentos, as xilanases são empregadas na clarificação de sucos e vinhos, em processos de maceração de vegetais, na extração de aromas e pigmentos, óleos vegetais e amido (Biely, 1985; McCleary, 1986; Bhat, 2000), além de serem empregadas na indústria de panificação para aumentar a qualidade dos produtos, devido às melhorias mostradas na qualidade da massa de pão, deixando-a mais flexível e permitindo a obtenção de um produto com maior volume (Collins *et al.*, 2006).

2.6 Microrganismos produtores de xilanases

Uma variedade de microorganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, foi relatada por produzir xilanase, sendo os melhores produtores os fungos (Haltrich *et al.*, 1996). Xilanases têm sido purificadas a partir de uma ampla variedade de microorganismos, como *Bacillus* sp. (Sa-Pereira *et al.*, 2004), *Trichoderma* sp. (Xiong *et al.*, 2004) e *Streptomyces* sp. (Wang *et al.*, 2003; Suchita *et al.*, 2007). No entanto, xilanases são produzidos principalmente por *Aspergillus* sp e *Trichoderma* sp. em escala industrial. O *Penicillium echinulatum* também apresenta-se promissor na produção de xilanases (Camassola & Dillon, 2007b; Camassola & Dillon, 2010).

2.7 *Penicillium echinulatum*

O *P. echinulatum* (Figura 7) está também entre os microrganismos com grande potencial para a produção de celulases (Dillon *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 2006). Mutantes selecionados são capazes de secretar celulases com atividade de papel filtro maior do que $2 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ quando crescendo em meio contendo 1% de celulose como fonte de carbono, com valores superiores a $30\text{U}/\text{massa}$ fermentada seca em fermentação no estado sólido, usando bagaço de cana-de-açúcar (Camassola & Dillon, 2007b; Camassola & Dillon, 2010). Adicionalmente, FPA e β -glicosidasas de *P. echinulatum* são importantes para a hidrólise de celulose, pois apresentam estabilidade a 50°C e 55°C , respectivamente (Camassola *et al.*, 2004). A importância do complexo enzimático de *P. echinulatum* deve-se também ao fato deste apresentar uma proporção equilibrada de FPA e β -glicosidase, fato relevante para a hidrólise da celulose (Martins *et al.*, 2008).



Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura de micélio da linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* (Obtida por Marli Camassola).

2.8 Meios de cultivo: indução e repressão

Segundo Suto & Tomita (2001), há três estados na regulação de celulases em fungos: expressão a nível basal, secreção de celulases induzidas por indutores e repressão catabólica. Em nível basal de expressão nem as proteínas ativadoras nem as repressoras catabólicas afetam a

regulação da transcrição das celulases. Acredita-se que a celulase expressa em nível basal pode ajudar os fungos a reconhecer a existência da celulose. Quando um indutor entra na célula ele aciona a transcrição do gene da celulase mediada por proteínas ativadoras e elementos de ativação, e com uma grande quantidade de celulase secretada ocorre a degradação de mais celulose para oligossacarídeos e glicose favorecendo o crescimento. Após a degradação da celulose, uma grande quantidade de glicose é liberada o que causa a repressão catabólica. A proteína repressora catabólica é diretamente responsável pela regulação negativa à nível transcricional. A repressão catabólica vai impedir o fungo de sintetizar uma quantidade excessiva de celulases em circunstâncias em que há abundância de fonte de carbono facilmente assimilável.

Para a produção de uma determinada enzima microbiana é de grande importância a formulação de um meio efetivo que seja de baixo custo e que permita a manutenção e o crescimento do microrganismo e a produção de enzimas (Smits *et al.*, 1996). Assim, para que o crescimento ocorra, é preciso que o microrganismo encontre os elementos básicos e indispensáveis para seu metabolismo. Deste modo, elementos como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e cálcio, além de ferro, cobre, cobalto, zinco, manganês e molibdênio são todos requeridos pelos microrganismos e devem estar presentes no meio (Smits *et al.*, 1996).

Na formulação de um meio de cultivo para a produção de celulases, deve-se tentar evitar a repressão catabólica – que resulta na inibição da síntese de enzimas – o que pode ser realizado pela substituição de fontes facilmente metabolizáveis por carboidratos complexos, como a celulose (Chahal, 1985). Sínteses de celulases podem ser induzidas por diversos oligo e dissacarídeos (Hrmova *et al.*, 1991; Magnelli & Forchiassin, 1999). Celulose e componentes celulósicos presentes nos resíduos lignocelulósicos são essenciais para a formação de RNAm de enzimas do complexo celulolítico. A glicose, por outro lado, reprime a síntese de celulases pelo mecanismo de repressão catabólica em nível de transcrição (Beguin, 1990; Fowler, 1993).

As celulasas são enzimas induzidas e várias fontes de carbono vêm sendo estudadas para identificar os substratos de maior efeito indutor (Mandels & Reese, 1956; Mandels, 1975; Muthuvelayudham *et al.*, 2005). A celulose é reconhecida como o melhor indutor do complexo enzimático das celulasas, sendo a lactose e a sofrose os outros indutores importantes (Mandels, 1975; Mandels *et al.*, 1962; Harikrishna *et al.*, 2000). Ryu & Mandels (1980) constataram que a indução do complexo enzimático pela celulose, celobiose e lactose só é possível quando estes substratos estão em alta concentração no meio de cultivo. *Aspergillus niger* produz elevados índices de atividade de β -glicosidase (Rashid *et al.*, 1997) que causa desglicosilação de substratos e produz gentiobiose, um forte indutor de celulasas em *Penicillium* (Suto & Tomita, 2001).

A natureza do substrato é muito importante para o crescimento do microrganismo celulolítico, pois este pode constituir-se tanto em fonte de carbono como em fonte de energia. Mandels & Weber (1969) estudaram a indução de celulasas em *T. viride*, cultivando o fungo em vários substratos. Estes autores observaram que fontes insolúveis de celulose, como *Solka Floc*® (polpa de celulose), algodão e papel filtro, são todas indutoras de celulasas, como também os dissacarídeos solúveis, lactose e celobiose.

Joglekar & Karanth (1984) verificaram que fontes naturais de celulose que são mais econômicas, como o algodão e o bagaço de cevada, quando tratados com álcalis, aumentam a capacidade indutora de celulasas.

Fermentações para a produção de celulasas podem alcançar maiores títulos com o aumento na concentração de celulose até a concentração de 6% (m/v), quando o pH da fermentação é controlado (Sternberg & Dorval, 1979; Hendy *et al.*, 1984).

Quando altas concentrações de celulose são requeridas, a viscosidade do meio aumenta, gerando uma situação que dificulta a transferência de oxigênio, e a conseqüente diminuição do crescimento. Para amenizar o problema, fontes solúveis que não desencadeiam repressão catabólica

são importantes. Nesta perspectiva, o meio formulado para *T. reesei* CL-847 com 5% de lactose e apenas 0,5% de *Solka Floc*® apresentou-se menos viscoso e com menores teores de sólidos insolúveis (El-Hawary & Mostafa, 2001), assim como em *T. reesei* MCG80 em culturas contínuas com o soro de leite, que induziu títulos de FPA de 1,29 UI.mL⁻¹ (Allen & Andreotti, 1982). Segundo Selnem *et al.* (2006), quando a lactose foi utilizada como única fonte de carbono, ocorreram os menores títulos enzimáticos, indicando que para *P. echinulatum* a lactose apresenta reduzida capacidade indutora para FPA. Diferente do que ocorre com FPA, o tratamento com 1% de lactose apresentou os maiores títulos enzimáticos de β-glicosidases, a partir das 96 horas de processo, sugerindo que a lactose é indutora desta enzima em *P. echinulatum*.

Com *T. harzianum* obteve-se atividade expressiva de celulasas em cultivo contendo 1% de CMC, a 28°C, pH 5,5 durante 120 horas (Ahmed *et al.*, 2009).

Meios de crescimento de *T. reesei*, com concentrações de glicose acima de 0,1%, inibem a secreção de celulasas por repressão catabólica (Abrahão-Neto, 1995). No entanto, Domingues *et al.* (2001) verificaram que concentração de glicose entre 0,04% e 0,06% presentes no meio de cultivo, são suficientes para inibir as celulasas, enquanto que Stewart & Leatherwood (1976) isolaram um mutante de *Cellulomonas* spp. capaz de produzir celulasas na presença de 1% (m/v) de glicose. Ainda, Alea *et al.* (1991) isolaram o mutante de *Cellulomonas* sp. linhagem Iibc capaz de produzir maiores atividades celulolíticas mesmo na presença de altas concentrações de glicose - 0,5% (m/v).

De acordo com Kulkarni *et al.* (1999), a repressão causada por glicose é um fenômeno normal na biossíntese de xilanases. Kadowaki *et al.* (1997) verificaram que o fungo *Aspergillus tamaritii* apresenta crescimento e produz altos níveis de xilanases em cultivos submersos, usando resíduos lignocelulósicos como substrato; porém, na presença de xilose e de glicose, severa repressão catabólica foi constatada. Botella *et al.* (2007) verificaram que a produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em estado sólido, empregando meio com engaço de videira suplementado com

até 6% (m/v) de glicose, é favorecida, sendo que concentrações superiores causaram repressão da produção desta enzima.

Jørgensen *et al.* (2003), analisando o crescimento e a produção de enzimas em meios com monossacarídeos - glicose, frutose, manose, galactose, xilose e arabinose - em três espécies de *Penicillium* (*P. pinophilum* IBT 4186, *P. persicinum* IBT 13226 e *P. brasilianum* IBT 20888), verificaram que todas foram capazes de utilizar os monossacarídeos, embora a metabolização da arabinose tenha sido lenta. A glicose reprimiu a produção de endoglicanases, endoxilanases e β -xilosidases. Após o consumo da glicose, os fungos começaram a produzir β -glicosidase e endoglicanases. A xilose não causou repressão na produção de enzimas e induziu a produção de endoxilanases e β -xilosidases.

O emprego de sorbitol como fonte de carbono não causa repressão na secreção de FPA e β -glicosidase, e, ainda, possibilita uma velocidade específica de crescimento do fungo *Penicillium echinulatum* maior nas primeiras horas, semelhante do observado para glicose (Dillon, 2004b). Sorbitol e glicerol podem ser considerados fontes de carbono neutras em relação à expressão de celulases em cultivo de *T. reesei* QM9414 (Ilmén *et al.*, 1997).

A repressão catabólica também pode ocorrer na presença de celobiose. Zaldivar *et al.* (2001) e Juhász *et al.* (2005) indicaram claramente que o complexo celulásico de *T. reesei* é deficiente em celobiasas, o que causa acúmulo da celobiose e posterior limitação da síntese e atividade enzimática pela repressão pelo produto. A inibição competitiva pelo produto pode ser minimizada pela adição de β -glicosidase. Essa suplementação pode ser feita com a adição de enzimas comerciais (Shen & Byers, 2007).

Takao *et al.* (1985) observaram que a combinação de celobiose-octaacetato (0,6% (m/v) e Avicel (0,4% (m/v) apresentou efeito sinérgico na indução de celulases em *Penicillium purpurogenum*. Ainda, oligossacarídeos derivados direta ou indiretamente da celulose, como a

celobiose (Fritscher *et al.*, 1990; Ilmén *et al.*, 1997), provocam a expressão dos genes das celulases em *T. reesei*. Além disso, *T. reesei* cresce na presença de alguns dissacarídeos, tais como δ -celobiono-1,5-lactona, gentiobiose, lactose e xilobiose, que também induzem a expressão de genes de celulases (Vaehri *et al.*, 1979a; Durand *et al.*, 1988; Margolles-Clark *et al.*, 1997). O monossacarídeo L-sorbose também já foi relatado como indutor da expressão de celulases em *T. reesei* (Nogawa *et al.*, 2001).

A utilização de glicerol como substrato para a produção de enzimas e o desenvolvimento de novos produtos com valor agregado torna-se estratégico (Klepacova *et al.*, 2003), uma vez que a crescente produção de biodiesel - em todo o mundo e em especial no Brasil - deve levar a uma produção de uma grande quantidade de glicerol no mercado. Para cada tonelada de óleo processada, são produzidos próximo de 100 kg de glicerol (Dasari *et al.*, 2005; Karinen & Krause, 2006). Como consequência desta ampla disponibilidade de glicerol o valor de mercado para este subproduto tende a cair (Behr *et al.*, 2008).

Vários fatores influenciam a produção enzimática microbiana, incluindo-se o microrganismo, o meio de cultivo e controle de parâmetros físico-químicos durante o processo. Diferentes parâmetros físicos influenciam a produção de enzimas sendo o pH um fator importante que afeta a produção de celulases (Pardo & Forchiassin, 1999). O efeito do pH na produção de celulases foi observado em *Aspergillus niger*, onde o pH ótimo para produção de celulases foi de 5,5. Por outro lado o intervalo de pH de 5,5 - 6,5 foi ideal para produção de β -glicosidases em *Penicillium rubrum* (Menon *et al.*, 1994). Eberhart *et al.* (1977) relataram que a produção e liberação de celulases depende do pH do meio. O pH entre 4,6 - 5,0 foi adequado para produção de CMCase, FPA e β -glicosidase com *Aspergillus ornatus* e *Trichoderma reesei* AYCC-26921 (Mukhopadhyey & Nandi, 1999).

A maioria dos fungos filamentosos apresentam um decréscimo do pH no seu meio de cultivo durante o crescimento em substratos contendo carboidratos, e após o esgotamento da fonte de

carbono, um aumento nos valores de pH é observado (Bailey & Tahiharju, 2003). O metabolismo do fungo, ao crescer, altera o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. Durante o cultivo o tamponamento é difícil, pois os próprios tampões podem ser assimilados ou podem ser tóxicos em quantidades que seriam necessárias para efetivo tamponamento. Apenas em fermentadores, o pH pode ser mantido constante, automaticamente, durante o crescimento do fungo. A concentração do íon hidrogênio em um meio pode afetar o crescimento indiretamente pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou diretamente pela sua ação nas superfícies celulares (Carlile & Watkinson, 1997).

A temperatura também apresenta influência na produção e atuação das enzimas. A temperatura para ensaio de atividades de celulasas é em geral entre 50-65°C para uma grande variedade de microrganismos como, por exemplo, *Thielavia terrestris*-255, *Myceliophora fergussi*-246C, *Aspergillus wentii*, *Penicillium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ornatus* e *Neurospora crassa* (Steiner *et al.*, 1993; Menon *et al.*, 1994; Rajendran *et al.*, 1994), enquanto a temperatura de crescimento destes microrganismos encontra-se em 25 – 30°C (Macris *et al.*, 1989). Da mesma forma, linhagens de *Penicillium purpurogenum*, *Pleurotus florida* e *Pleurotus cornucopiae* apresentam maior crescimento a 28°C e atividade celulásica a 50°C (Steiner *et al.*, 1993).

Reese & Maguire (1969) sugeriram que o acréscimo do surfactante *Tween 80*® no meio, possibilita a obtenção de maiores títulos de celulasas em linhagens de *Trichoderma*. Estes maiores títulos enzimáticos podem estar relacionados ao aumento da permeabilidade da membrana celular, permitindo rápida secreção de enzimas e conseqüente maior síntese da enzima. Sternberg *et al.* (1979) e Tangnu *et al.* (1981) também verificaram que o *Tween 80*® pode estar relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana celular.

Em estudos realizados com *T. viride* por Liu *et al.* (2006), empregando *Tween 80*® e o biosurfactante *Ramnilipid*, foram verificados aumentos de 20 a 50% nas atividades de celulasas em

relação ao controle realizado sem adição de surfactantes, durante a fase de pico de produção.

Romio & Dillon (2006), ao avaliar a produção de celulasas em *P. echinulatum* sob efeito de 0,1% (v/v) *Tween* 80® e 0,05% (v/v) polipropilenoglicol, verificaram que tratamentos com *Tween* 80® mostraram-se benéficos para FPA, com maiores atividades nos tratamentos com 0,15% (v/v) do surfactante.

2.9 Expressão das celulasas

Para o aumento da produção enzimática, é necessário o uso de microrganismos com modificações nos controles de secreção de celulasas, obtidos por melhoramento genético, e processos de cultivo eficientes (Dillon, 2004a).

Os estudos de controle gênico em *T. reesei* foram inicialmente desencadeados com o emprego da técnica de *Northern blot* ou de *Slot blot* em condições de indução ou de repressão (Ilmén *et al.*, 1997). A expressão de genes para celulasas também tem sido estudada por RT-PCR por tratar-se de uma técnica com maior sensibilidade (Sun *et al.*, 2008).

Bem estudada encontra-se a região *upstream* do promotor para o gene *cbh 1* de *Trichoderma* (Torigoi *et al.*, 1996), Esta região pode sofrer a ação do produto do gene *cre1* - que codifica para um repressor catabólico CreI - quando o microrganismo cresce na presença de glicose ou de outra fonte de carbono que desencadeie rápido metabolismo (Ilmén *et al.*, 1996). Também foram identificados sítios de reconhecimento para os produtos dos genes *ace1* (Saloheimo *et al.*, 2000; Aro *et al.*, 2001) e do gene *ace2* (Aro *et al.*, 2001) exercem atividades de indução de celulasas. Estes autores isolaram os genes e identificaram estes dois ativadores de transcrição que codificam para proteínas que se ligam ao DNA. Genes homólogos ao *ace1* já foram identificados em sequências expressas em *Aspergillus* e *Neurospora*, indicando que esse gene também ocorre em outros fungos filamentosos (Todd *et al.*, 1998).

Recentemente, Sun *et al.* (2008) desenvolveram um estudo em *Penicillium decumbens*

mostrando que os principais genes para celulase *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* e *bgl1* apresentam síntese basal. Interessante que a comparação de duas endoglicanases mostrou que uma de 34 kDa tem síntese basal, mas outra de 45 kDa foi apenas induzida e que estas duas enzimas são codificadas por diferentes genes.

Independente da natureza do indutor de celulases é consenso que a formação de celulases é regulada no nível transcricional e acontece de forma coordenada. Na presença do indutor celulose, o gene de celobiohidrolase I (*cbh1*) tem maior expressão, seguido por *cbh2*, *egl5* e *egl1* (Schmoll & Kubicek, 2003).

O *T. reesei* secreta pelo menos seis tipos de endoglicanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV e EGVI) que diferem em massa molecular e ponto isoelétrico (Tabela 1). A EGI é a endoglicanase produzida em maior quantidade por este fungo, chegando a cerca de 5% do total de proteínas liberadas no meio de cultura, enquanto a EGII chega a 0,5% e as endoglicanases restantes apresentam-se como componentes minoritários (Saloheimo *et al.*, 2002). No entanto, de acordo com Martinez *et al.* (2008) foram identificadas duas celobiohidrolases e oito endoglicanases em *T. reesei*, já outros microrganismos, porém apresentam uma variedade maior de celulases como é o caso do *Magnaporthe grisea* com cinco celobiohidrolases e vinte e cinco endoglicanases, *Phanerochaete chrysosporium* com 8 celobiohidrolases e 19 endoglicanases, *Aspergillus nidulans* com 4 celobiohidrolases e 14 endoglicanases entre outros.

Tabela 1. Propriedades das celulasas produzidas pelo *T. reesei* (adaptado de Miettinen-Oinonen, 2004).

Enzima	Aminoácidos	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico
EGI	437	50 - 55	4,6
EGII	397	48	5,5
EGIII	218	25	7,4
EGIV	326	37	ND
EGV	225	23	2,8 – 3
EGVI	838	75 - 105	4,1 – 4,3
CBHI	497	59 - 68	3,5 – 4,2
CBHII	447	50 - 58	5,1 – 6,3
BGLI	744	75	ND
BGLII	466	52	ND

ND – não determinado

Dois tipos de celobiohidrolases (CBHI e CBHII) já foram identificados no complexo celulolítico secretado por *T. reesei* (Teeri, 1997). Estas exoglicanases são produzidas em maior quantidade do que as outras enzimas celulolíticas do complexo. A CBHI responde por cerca de 60% do total de proteínas liberadas no meio de cultura, enquanto que a CBHII chega a 20% (Miettinen-Oinonen, 2004). Neste mesmo fungo foram descritas duas β -glicosidases BGLI e BGLII, sendo que essa última além de hidrolisar celobiose, também possui ação de transglicosilação (Saloheimo *et al.*, 2002).

Rubini *et al.* (2009), desenvolveram estudo de clonagem, isolamento e caracterização de cDNA de *P. echinulatum* 9A02S1 que codifica uma endoglicanase putativa. A análise da sequência identificou 387 resíduos de aminoácidos sugerindo que a proteína poderia ser classificada como

uma endoglicanase pertencente à família 5A glicosil hidrolase. As análises de similaridade revelaram que ao nível de aminoácidos EGL1 de *P. echinulatum* 9A02S1 apresenta de 48 a 60% de identidade quando comparado com outras endoglicanases fúngicas. A enzima secretada por EGL1 de *P. echinulatum* apresentou alta atividade sobre ampla escala de pH (5 – 9) e temperatura ótima de 60°C. Além disso, esta enzima mostrou maior termoestabilidade a 70°C, onde cerca de 84% de sua atividade de CMCase inicial foi mantida após 1 hora de pré-incubação. Foi demonstrado que EGL1 hidrolisa CMC e MUC, sugerindo que esta enzima apresenta atividade de endoglicanase e exoglicanase.

Diante deste contexto, a realização desse trabalho se justifica pela contribuição ao conhecimento sobre a produção de celulasas e xilanases por *P. echinulatum* em cultivos submersos, empregando diferentes fontes de carbono para sua caracterização como indutores ou não destas enzimas. Além disso, a utilização destas enzimas na hidrólise de resíduos lignocelulósicos constitui-se em um importante acesso biotecnológico que contribui para tornar economicamente viável a produção de etanol de segunda geração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem

Para a produção de celulasas foi utilizada a linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* (depositada no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942) pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, RS. Esta linhagem corresponde a um mutante parcialmente desreprimido a glicose, obtido por mutagênese (Dillon *et al.*, 2006), a partir da 2HH, isolada do trato intestinal do coleóptero *Anobium punctatum* (Carrau *et al.*, 1981).

3.2 Meios e condições de cultivo

3.2.1 Crescimento e manutenção da linhagem

A linhagem foi crescida e mantida em agar-celulose (C-agar), elaborado com 40% de celulose intumescida, 10% de meio de sais (MS 10x) 0,2% proteose peptona (Oxoid L85), 1,8% agar e 50% de água destilada. A linhagem foi crescida em tubos inclinados por sete dias a 28°C até a formação de conídios e então estocada a 4°C, conforme Dillon *et al.* (2006).

A celulose intumescida foi elaborada com Celufloc E®, sendo a suspensão mantida sob agitação recíproca a 180 rpm por 48 horas a 28°C e após armazenada a 4°C por até um mês. O meio de sais foi elaborado baseado na formulação de Mandels & Reese (1956), composta em gramas por litro: KH_2PO_4 , 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; CaCl_2 , 3; dissolvidos em água destilada acrescido de 1 mL de solução de micronutrientes (2,5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,78 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,74 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g de CoCl_2 dissolvidos em 50 mL de água destilada).

3.2.2 Cultivo para crescimento e produção de celulasas e xilanases

O crescimento e a produção de celulasas e xilanases foram realizados em cultivos

submersos, com duas repetições, onde variou-se as fontes de carbono: carboximetilcelulose, celobiose, celulose, glicerol, glicose, sacarose e sorbitol. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio líquido (1 g de fonte de carbono; 0,1 g de Prodex®; 0,2 g de proteose peptona; 0,1 mL de Tween 80; 10 mL de MS 10x e 90 mL de água destilada). Os meios foram autoclavados a 121°C, adicionados de 10 µL de solução de ampicilina 1,8 mg.mL⁻¹ e tetraciclina 0,5 mg.mL⁻¹ e inoculados com 1 mL de suspensão de conídios (1x10⁷ conídios.mL⁻¹), sendo os frascos mantidos a 28°C e sob agitação recíproca a 180 rpm até o sexto dia. Foram realizadas coletas a cada 12 horas para as análises, sendo o caldo enzimático obtido da filtração da suspensão em papel filtro, armazenado sob refrigeração para testes posteriores após a determinação do pH.

3.3 Determinação do crescimento fúngico

A determinação do crescimento micelial em meios contendo celulose foi realizada por meio da dosagem de ácidos nucléicos com curva de calibração de micélio crescido em glicose como fonte de carbono. Para tanto, 3 mL da amostra e 3 mL de ácido perclórico 1 M foram misturados em um tubo. Após homogeneização, o tubo foi aquecido em banho a 100°C durante 20 minutos. Depois do resfriamento, a amostra foi centrifugada a 9800 x *g* por 10 minutos (Lin *et al.*, 2000). Em seguida, 1 mL do extrato obtido foi acrescido a 2 mL do reativo de difenilamina juntamente com 2 gotas de HCl concentrado, esta mistura foi aquecida em banho a 100°C por 10 minutos. Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. As desoxirriboses livres de bases púricas geram grupamentos aldeídicos livres que por sua vez, sofrem desidratação, originando como produto aldeídos δ -hidroxilevulínicos. Estes aldeídos formados reagem com a difenilamina, gerando um produto de coloração azul. Assim, a reação da difenilamina caracteriza, indiretamente, a presença de DNA (Petkowicz *et al.*, 2007).

Para os meios com fontes solúveis de carbono, a determinação do crescimento micelial foi realizada por gravimetria. O volume total do cultivo (100 mL) foi filtrado em papel filtro. Após secagem em estufa a 80°C até peso constante.

3.4 Determinação das proteínas solúveis totais

Para a determinação quantitativa das proteínas solúveis, foi utilizado o método de Bradford (1976) com modificações – cuja solução para reação foi constituída de 0,01% (m/v) de *Coomassie Brilliant Blue G250*, 4,7% (v/v) de etanol e 8,5% (v/v) de ácido fosfórico, sendo o volume completado com água destilada e mantido ao abrigo da luz. Foi construída uma curva de calibração, utilizando-se soluções padrão de albumina bovina com concentrações entre 2 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a determinação das proteínas das amostras, a reação foi realizada pela mistura de 10 μL da amostra diluída em 90 μL de água destilada com 200 μL do reagente de Bradford. Transcorridos 10 minutos, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

3.5 Dosagens enzimáticas

Foram realizadas dosagens para FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases.

3.5.1 Determinação de FPA

Para a dosagem de celulases totais foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), conforme Mandels *et al.* (1976) adaptada.

O papel filtro é um substrato tradicionalmente utilizado em pesquisas de celulases. As fibras de celulose que constituem o papel têm uma estrutura complexa e para sua hidrólise substancial é necessário um sistema celulásico constituído por celobiohidrolases e endoglicanases. O papel filtro é recomendado pela Comissão de Biotecnologia da IUPAC para se avaliar a atividade celulásica total de um sistema celulósico (Ghose, 1987; Medve *et al.*, 1997).

Utilizaram-se placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL). Em cada poço da placa, foi adicionado 50 μ L de solução enzimática e 100 μ L de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8. A placa foi colocada em banho a 50°C, durante 10 minutos, com a finalidade de elevar a temperatura do meio contendo a enzima e o tampão citrato de sódio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima.

Em seguida foram adicionados a cada poço 5 mg de papel filtro (Whatman nº1) em tiras de 1 cm x 0,6 cm, mantendo-os por 60 minutos em banho a 50°C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 300 μ L da solução do reagente DNS - descrita por Miller (1959), sendo composta por: ácido 3,5-dinitrosalicílico (2,12 g), hidróxido de sódio (3,92 g), tartarato de sódio e potássio (61,20 g), fenol (1,52 g), metabissulfito de sódio (1,66 g) e água destilada (283,3 mL) - e a placa foi colocada em banho a 100°C, por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 μ L de amostra em placa de poliestireno cristal de 96 poços (com volume individual de 0,4 mL) e adicionado 200 μ L de água destilada sendo a absorbância medida em espectrofotômetro para leitura de microplacas SpectraMax 190 Molecular Devices a 545 nm.

As atividades sobre papel filtro presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose em tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 com concentrações de 0, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

As unidades de FPA foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ M de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

3.5.2 Determinação de endoglicanases

A determinação da atividade de endoglicanases, segundo Ghose (1987) com modificações, foi realizada empregando-se 2 μL da solução enzimática e 48 μL de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi colocada em banho a 50°C, por 10 minutos, a fim de elevar a temperatura do meio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima. Em seguida, foram adicionados a cada poço 50 μL de solução de carboximetilcelulose 2% - preparada em tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 acrescida de 0,1 mL de solução de azida sódica 0,5% - previamente aquecida a 50°C, mantendo as placas por 30 minutos em banho a 50°C. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μL da solução do reagente DNS e a placa foi colocada em banho a 100°C, por 5 minutos.

A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação da atividade de endoglicanases procederam-se tal como para FPA.

As unidades de endoglicanases foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μM de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

3.5.3 Determinação de β -glicosidases

Para a determinação da atividade de β -glicosidases foram utilizados dois substratos: salicina e *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρNPG). Para o primeiro, empregou-se a metodologia descrita por Chahal (1985) com adaptações. De acordo com essa técnica, foram adicionados em poços de placa de 96 poços, 10 μL de solução enzimática e 40 μL de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 sendo a placa colocada em banho a 50°C, por 10 minutos, a fim de elevar a temperatura do meio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima. Em seguida, foram adicionados a cada poço 50 μL da solução de salicina 1% - preparada em tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 acrescido de 0,1 mL de solução de azida sódica 0,5% - previamente aquecida a 50°C, mantendo as placas em banho a 50°C, por 30 minutos. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μL da solução do

reagente DNS e a placa foi colocada em banho a 100°C, por 5 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 545 nm. A determinação da atividade foi realizada tal como para FPA. As unidades de β -glicosidases foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ M de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

A determinação da atividade de β -glicosidases também foi realizada empregando-se a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma mistura reacional (100 μ L) contendo 5 μ L de água destilada, 5 μ L de solução enzimática e 90 μ L de ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPG 4 mM em tampão citrato de sódio 0,05M pH4,8) foi incubada a 50°C por 30 minutos, sendo interrompida com a adição de 200 μ L de uma solução 10% de Na₂CO₃. A leitura das amostras foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância de ρ -nitrofenol a 405 nm.

Uma unidade de atividade de β -glicosidase utilizando-se como substrato o ρ NPG foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 μ M de ρ -nitrofenol por minuto.

3.5.4 Determinação de Xilanases

A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992). Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 10 μ L de caldo enzimático e 40 μ L de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 juntamente com 50 μ L de uma solução de xilana oat spelts 1% - prepara em tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 acrescido de 0,1 mL de solução de azida sódica 0,5% previamente aquecida a 50°C. A placa foi mantida em banho a 50°C por 5 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 300 μ L de DNS e a placa foi mantida em banho a 100°C por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente foram adicionados 100 μ L de amostra em placa de 96 poços e adicionado 200 μ L de água destilada e a absorbância foi medida em

espectrofotômetro a 545 nm.

As concentrações de xilanases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de xilose 0,01M em tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 com concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μM de xilose por minuto.

3.6 SDS-PAGE de soluções enzimáticas

Para a determinação da massa molecular das celulases, foi realizada eletroforese não redutora em gel de poliacrilamida (8,5 cm x 7,5 cm x 0,1 cm) contendo 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com 1,5 cm de gel de concentração 12% e 6,0 cm de gel para separação das proteínas 4%, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi realizada a 200 V por aproximadamente 1 hora.

O tampão da amostra para proteína nativa possuía a seguinte composição: 2,5 mL de glicerol; 2,0 mL de solução SDS 10%; 0,2 mL de solução azul de bromofenol 0,5%, 1,25 mL de tampão Tris-HCl pH 6,8 e 3,55 mL de água destilada, e foi acrescentado à amostra até o volume final de 25 μL , e após, aplicado na canaleta do gel. Não adicionado 2-mercaptoetanol.

Em microtubo de 2 mL, foi feita a precipitação das amostras com acetona gelada 1:2, mantidos a -20°C por 15 min. Para o cultivo formulado com celulose utilizou-se 100 μL de caldo enzimático, para os cultivos formulados com CMC, glicerol, sacarose e sorbitol o volume de amostra utilizada foi de 400 μL , já para o meio contendo celobiose como fonte de carbono até a coleta de 72 horas de cultivo utilizou-se 400 μL e após 300 μL , enquanto que para o meio formulado com glicose foram utilizados 400 μL até a coleta de 96 horas e após 300 μL . Após, as

amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 9800 x g e o sobrenadante descartado (Blum *et al.*, 1987). O *pellet* foi solubilizado em 25 µL de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel.

Como marcador de massa molecular foi utilizado o marcador Precision Plus Protein™ Standars All Blue (Bio Rad). Para a corrida eletroforética, foi utilizada uma solução tampão Tris-glicina pH 8,3, composto de 30,3 g de Tris base; 144 g de glicina e 10 g de SDS, sendo o volume completado para 1 L com água destilada (Laemmli, 1970).

A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical Bio Rad Mini-Protean® Tetra System.

A revelação das bandas do gel foi realizada com a incubação do gel durante 30 minutos em uma solução de 0,2% de *Coomassie Brilliant Blue G 250*, 50% de etanol e 10% de ácido acético. Após o gel foi lavado com água destilada e imerso em uma solução de 50% de etanol e 10% de ácido acético por 30 minutos. Este processo foi realizado sob agitação de 60 rpm e repetido até que bandas fossem visualizadas.

3.7 Zimogramas para celulases

3.7.1 Endoglicanases

A metodologia para a detecção de atividade de endoglicanases em gel de poliacrilamida foi baseada em Sun *et al.* (2008). O gel de separação 12% foi preparado com a adição de solução de carboximetilcelulose 2% a fim de obter a concentração final de 0,2% no gel.

Em microtubo de 2 mL, foi realizada a preparação das amostras. Dos meios formulados com celulose e CMC utilizou-se 5 µL de amostra nas coletas de zero a 48 horas de cultivo, 3 µL de amostras para as coletas de 60 a 96 horas e 1 µL para as demais amostras, sendo o volume final completado para 25 µL com tampão de amostra. Para os meios formulados com glicose, sacarose, glicerol e sorbitol foram necessárias precipitações das amostras com acetona gelada 1:2, a partir de um volume de 100 µL, enquanto que para o cultivo formulado com celobiose o volume de amostra

precipitada foi de 30 μL , estas amostras foram mantidas a -20°C por 15 min. Após, foram centrifugadas por 10 min a $9800 \times g$ e o sobrenadante descartado (Blum *et al.*, 1987). O *pellet* foi solubilizado em 25 μL de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel. Procedeu-se a corrida eletroforética tal como para proteínas totais.

Para a remoção do SDS e renaturação das proteínas, o gel foi lavado durante 30 minutos em solução 25% (v/v) de isopropanol em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 e, após, lavado por mais 10 minutos no mesmo tampão, sendo ambos os processos realizados sob agitação de 60 rpm e temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi incubado por 10 minutos a 40°C em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8. O gel foi corado com solução de 0,1% de vermelho congo durante 30 minutos e revelado com solução de NaCl 1 M. As bandas claras no fundo vermelho indicaram a degradação da carboximetilcelulose.

3.7.2 β -glicosidases

Para a detecção de atividade de β -glicosidases em gel de poliacrilamida a metodologia foi baseada em Schwarz *et al.* (1987). Os géis de separação e de concentração foram preparados assim como para proteínas totais.

Em microtubo de 2 mL, foi feita a precipitação das amostras com acetona gelada 1:2, mantidos a -20°C por 15 min. Para os cultivos formulados com celulose e celobiose utilizaram-se 100 μL de amostra, para os meios formulados com glicose, sacarose, glicerol e sorbitol foram utilizados volumes de 200 μL , enquanto que para o cultivo formulado com CMC o volume de amostra precipitada foi de 500 μL . Após, as amostras foram centrifugadas por 10 min a $9800 \times g$ e o sobrenadante descartado (Blum *et al.*, 1987). O *pellet* foi solubilizado em 25 μL de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel. Procedeu-se a corrida eletroforética tal como para proteínas totais.

Para a remoção do SDS e renaturação das proteínas, o gel foi lavado durante 30 minutos em solução 25% (v/v) de isopropanol em tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 e, após, lavado por mais 10 minutos no mesmo tampão, o gel foi imerso em uma solução de esculina 0,2% em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8, por 30 minutos, sendo os processos realizados sob agitação de 60 rpm e temperatura ambiente. Em seguida, removeu-se o gel da solução. Para a revelação foi utilizada uma solução 1% de FeCl₃. Bandas escuras em um fundo claro são indicativas da atividade de β -glicosidase, sendo que os géis foram ser fotografados nos primeiros 15 minutos de reação.

3.8 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Graph Pad Prism. Os resultados foram analisados pela variância e pós-teste de Tukey para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados das produções de celulases, β -glicosidases e xilanases, em cultivos submersos (CS) realizados com a linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum*, empregando diferentes fontes de carbono. Divididos em itens específicos, são apresentados os dados de crescimento micelial, determinação das proteínas solúveis totais, atividades enzimáticas e variação do pH. Estes resultados foram analisados conjuntamente com os dados de SDS-PAGE e zimogramas para a determinação da massa molecular das enzimas presentes nos extratos.

4.1 Determinação da massa micelial de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivo submerso

Devido a celulose ser insolúvel, a determinação indireta do crescimento micelial foi realizada a partir da dosagem de ácidos nucléicos, com curva de calibração com micélio crescido em glicose ($R = 0,986$). Para os demais meios, suplementados com fontes de carbono solúveis, determinou-se a massa micelial por meio de gravimetria. Entre as fontes de carbono utilizadas, a celulose resultou em maior massa micelial, atingindo valores de até $14,54 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto a celobiose apresentou $6,13 \text{ g.L}^{-1}$. A fonte que proporcionou o menor crescimento micelial foi a CMC com apenas $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 8).

O rendimento da biomassa (Y_{xs}) foi de 0,15; 0,61; 0,47; 0,56; 0,55; 0,44; 1,45 g.g^{-1} (massa seca por fonte de carbono) para CMC, celobiose, glicose, glicerol, sacarose, sorbitol e celulose, respectivamente. Jørgensen *et al.* (2004) relatou um rendimento de biomassa (Y_{xs}) de 0,5 g.g^{-1} para *P. persicinum* IBT 13226 e *P. brasilianum* IBT 20888 em glicose e xilose, estando de acordo com os dados obtidos neste trabalho com glicose.

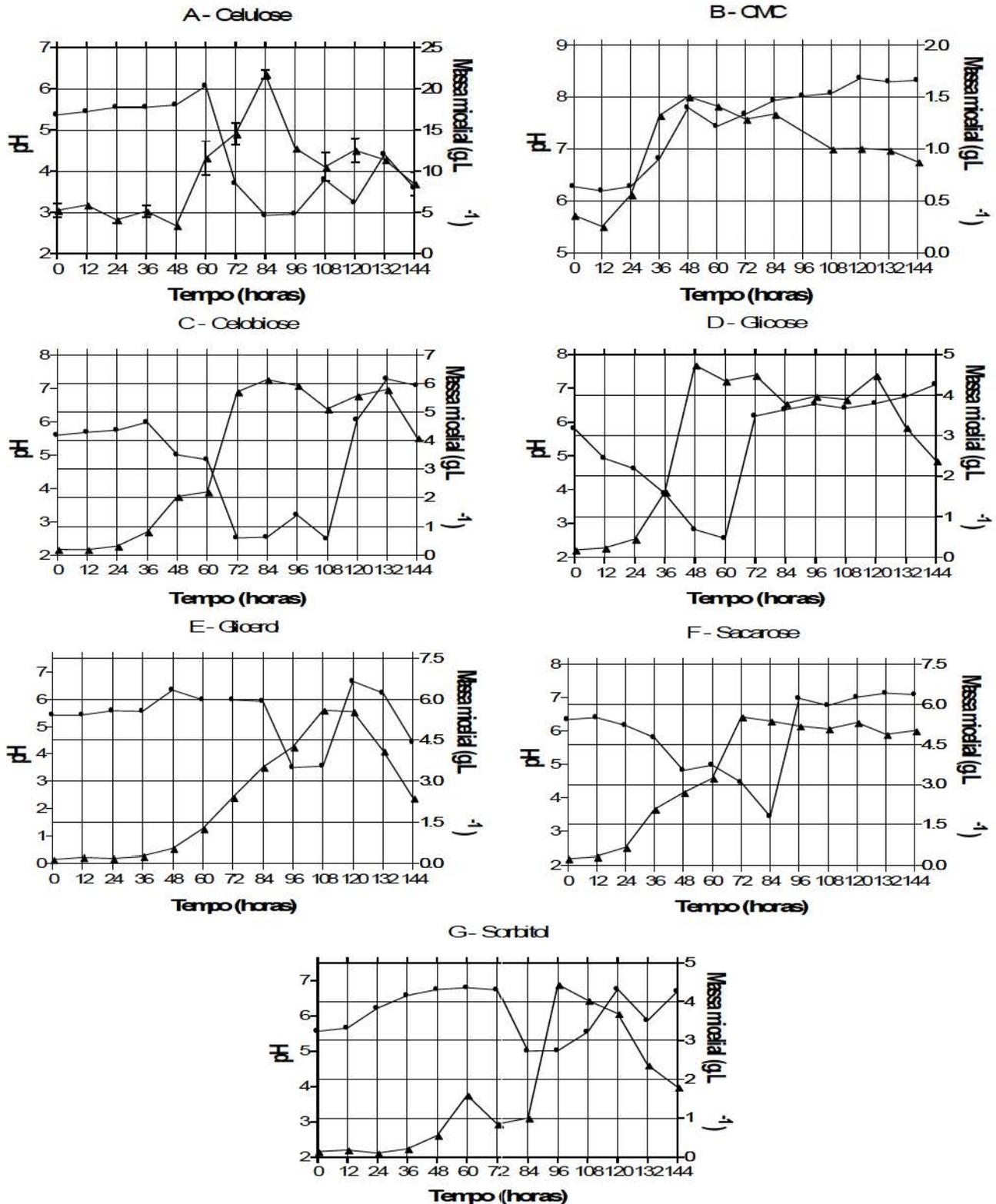


Figura 8. Variação do pH (●) dos caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono em frascos sob agitação recíproca, comparando-se com o crescimento micelial (▲). As determinações de crescimento em meios com fontes solúveis foram realizadas por gravimetria. Para celulose, o crescimento micelial foi estimado por medida de ácidos nucleicos. As fontes de carbono empregadas estão mencionadas no gráfico.

As diferenças observadas no Y_{xs} entre as diversas fontes de carbono utilizadas no meio de cultivo podem ser devido as características metabólicas particulares do *P. echinulatum*. Para a celulose, a hidrólise das ligações glicosídicas resulta em maiores quantidade de substrato. Além disso, algumas espécies de *Penicillium* podem produzir diferentes metabólitos que podem interferir no Y_{xs} . Um exemplo foi relatado por Petruccioli *et al.* (1995). Esses autores relataram que algumas espécies de *Penicillium* produzem glicose oxidase, que converte a glicose em ácido glucônico, e o Y_{xs} abaixo de 0.1 g.g^{-1} .

O elevado Y_{xs} observado no meio formulado com celulose devido aos altos valores de biomassa podem estar relacionado com as maiores quantidades de RNA presentes nos micélios provenientes dos cultivos formulados com celulose. Como a determinação de massa micelial para o cultivo formulado com celulose foi determinada indiretamente por meio da dosagem de ácido nucléicos é possível que a quantidade de RNA presente no micélio possa ter interferido, visto que a curva padrão foi construída com quantidades conhecidas de micélio crescido em meio formulado com glicose (fonte solúvel de carbono). Sugere-se que nos cultivos formulados com celulose, devido a presença do substrato indutor, maiores quantidades de RNAm foram produzidas e possivelmente maior número de ribossomos esteja presente no micélio para realizar a síntese das enzimas. Existindo maior número de ribossomos, conseqüentemente, maior será a concentração de RNAr. Estes fatores podem ter interferido na determinação do crescimento, mas de qualquer forma, os dados apresentados indicam claramente que houve crescimento na presença do carboidrato.

4.2 Potencial hidrogeniônico (pH) dos caldos enzimáticos

O pH inicial dos meios variou de 5,43 (glicerol) e 6,35 (sacarose) (Figura 8E e F). O pH dos diferentes meios utilizados apresentaram variação semelhante a partir do terceiro dia de cultivo. O meio formulado com glicose apresentou queda no pH já no primeiro dia de cultivo, voltando a elevar no terceiro dia. Diferente dos demais cultivos, o meio com CMC apresentou pequena queda e

elevação no valor do pH, chegando ao pH 8,37. O menor valor de pH foi para os meios com glicose e celobiose, com valores próximos de 2,5.

Os perfis de pH apresentaram relação aos de crescimento (Figura 8), exceto para o meio com CMC, desde que o pico de crescimento é inverso ao do pH, o que permite sugerir que o aumento do metabolismo celular com a produção de biomassa proporciona a queda do pH, como já relatado por Sternberg & Dorval (1979), para *Trichoderma reesei*. A queda no pH pode ter sido devido à produção de ácidos orgânicos, como sugerido por Blandino *et al.* (2002) e Botella *et al.* (2007), durante a produção de enzimas pelo fungo *Aspergillus awamori*. Segundo esses autores, quando a concentração de açúcares redutores diminui, o pH aumenta, provavelmente devido a assimilação de ácidos orgânicos. Já o meio formulado com CMC, resultou em um crescimento pouco expressivo, e com a elevação do pH do meio.

4.3 Determinação das proteínas solúveis totais secretadas por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivo submerso

Como esperado, a determinação das proteínas solúveis totais nos caldos enzimáticos produzidos pelo fungo apresentou uma maior concentração de proteínas no meio formulado com celulose com picos de $45,95 \pm 1,44 \text{ mg.L}^{-1}$ em 132 horas (Figura 9). Os valores elevados nas coletas iniciais podem ser explicados pelo fato da celulose comercial utilizada não ser pura e conter proteínas que são degradadas e utilizadas pelo fungo. Para o meio formulado com CMC foram verificadas concentrações de proteínas totais em 84 horas, atingindo valores de $15,87 \pm 0,91 \text{ mg.L}^{-1}$. Enquanto o cultivo com celobiose apresentou dosagens de proteínas totais em torno de 5 mg.L^{-1} em 72, 96 e 108 horas. Os demais cultivos apresentaram concentrações protéicas menores que 5 mg.L^{-1} durante todo o experimento.

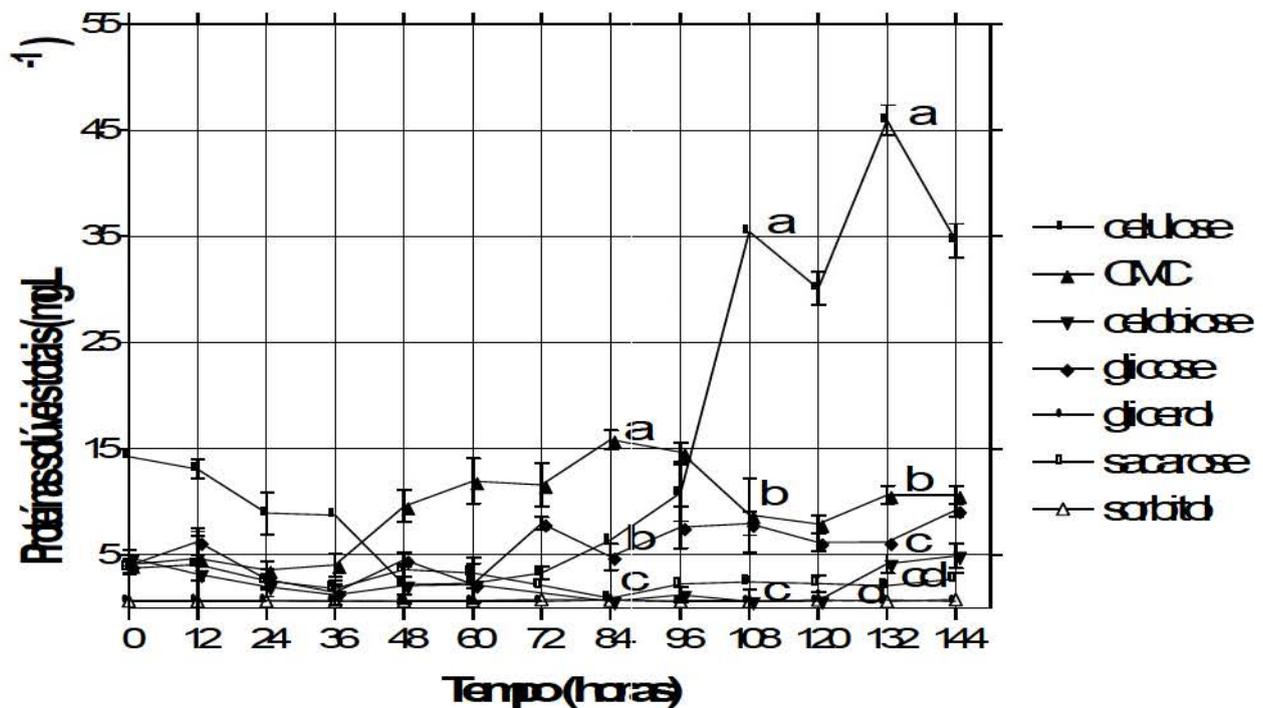


Figura 9. Concentração das proteínas solúveis totais dosadas nos caldos enzimáticos produzidos por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono como substrato. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo dia não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4 Atividades enzimáticas de celulasas, β -glicosidases e xilanases por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivo submerso

As atividades enzimáticas obtidas neste trabalho foram inferiores as detectadas para esta mesma linhagem (Dillon et al. 2006; Camassola & Dillon, 2007a; Camassola & Dillon, 2009), além de ter apresentado picos de atividades tardios. Estes resultados são explicados devido a composição do meio de cultivo, o qual não recebeu suplementação de farelo de trigo.

4.4.1 Atividade sobre papel filtro

Em relação a FPA (Figura 10) verificou-se que o cultivo formulado com celulose apresentou as maiores atividades, atingindo títulos enzimáticos de $0,49 \pm 0,02 \text{ UI.mL}^{-1}$ em 132 horas. Valores superiores de FPA já foram observados por Cheng *et al.* (2009). Estes autores obtiveram atividades máximas de FPA de 6,66; 6,14 e 6,48 IU.mL^{-1} em 90 horas para três fusionantes de *P. decumbens*

JU-A10. No entanto estes valores não podem ser comparados devido a condições dos meios, pois neste houve suplementação de farelo de trigo, enquanto neste trabalho não houve tal suplementação.

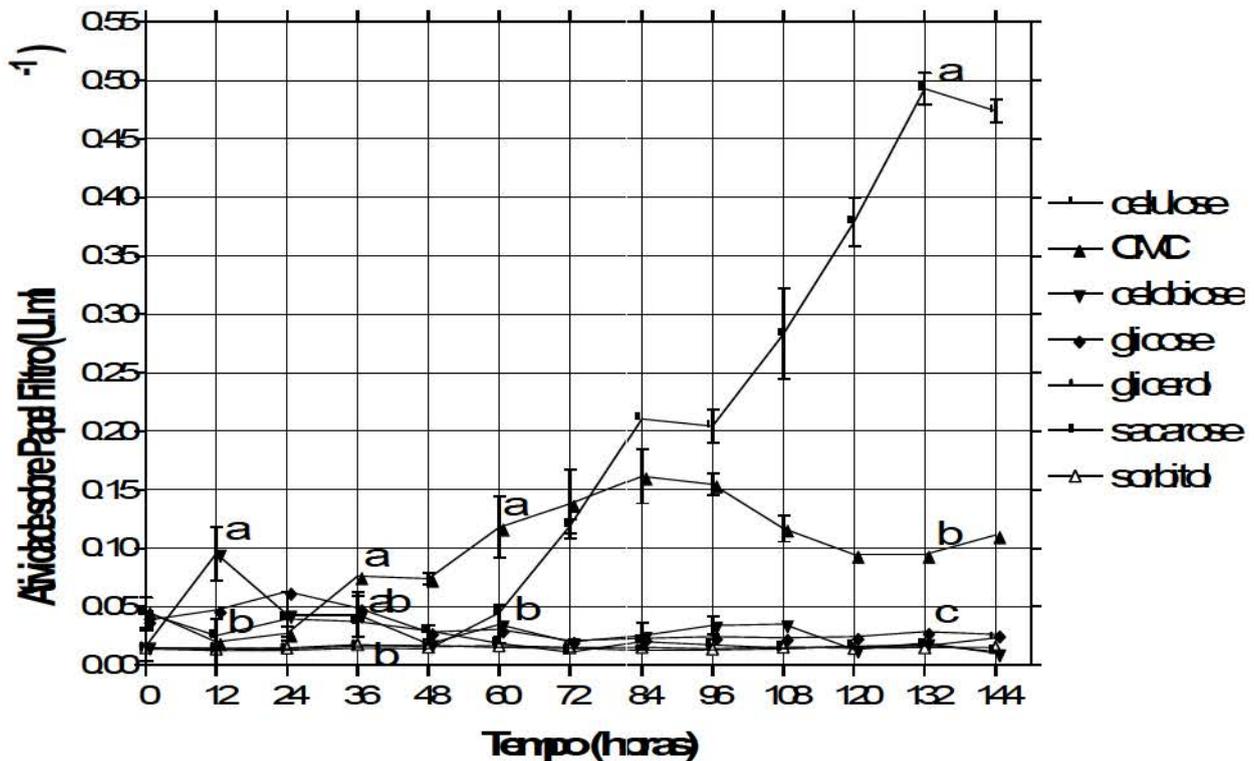


Figura 10. Atividades sobre papel filtro (FPA) determinadas a partir de cultivos submersos de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo dia não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Embora a CMC tenha apresentado efeito indutor para a expressão da atividade de FPA, essas atividades foram menores em relação às obtidas em meio formulado com celulose, sendo que as maiores dosagens enzimáticas foram $0,16 \pm 0,04$ UI.mL⁻¹ em 84 horas. O cultivo com celobiose apresentou atividade de $0,095 \pm 0,03$ UI.mL⁻¹ em 12 horas. Já os demais cultivos realizados empregando glicose, glicerol, sacarose e sorbitol apresentaram atividades enzimáticas muito reduzidas, menores que $0,05$ UI.mL⁻¹ sugerindo que estas fontes de carbono não apresentam efeito indutor para a produção de FPA.

Ilmén *et al.* (1997) em estudo realizado com glicose, frutose e glicerol como fonte de carbono, obtiveram níveis de produção de celulasas insignificantes. Soforose induz a expressão de

celulases quando associada a glicerol e sorbitol 5%. Ambos, podem ser considerados, para *T. reesei*, fontes de carbono neutras em relação a expressão de celulases. A glicose age como repressor da síntese de celulases no nível de transcrição em *T. reesei* QM9414. Após 45 horas, período de defasagem da glicose, níveis de RNAm foram detectados por análise de *Northern*. Os meios formulados com celobiose apresentaram níveis moderados de expressão de celulases.

O uso de celobiose como fonte de carbono para a expressão de celulases é controverso. Celobiose tem sido considerado um fraco indutor em *Trichoderma* (Nisizawa *et al.*, 1971; Gong *et al.*, 1979; Gritzali & Brown, 1979; Fritscher *et al.*, 1990; Royer & Nakas, 1990), mas também pode exercer uma significativa indução como a celulose se o crescimento for mantido lento e o nível de celobiose for mantido baixo por alimentação no meio (Vaheiri *et al.*, 1979b).

A incapacidade de provocar a expressão da celulase poderia ser explicada tanto pela falta de um indutor que é consumido rapidamente, como pela presença de peptona ou acúmulo de glicose (Kubicek, 1993).

Estudo realizado por Mandels & Reese (1956) mostrou a produção de celulases por *T. viride* em glicose, celobiose, lactose e celulose. Celobiose trata-se de um importante produto da quebra da celulose, porém é um fraco indutor. A lactose é um excelente indutor semelhante a celulose, o que pode ser explicado pelo fato de sua estrutura ser semelhante a da celobiose. A lactose é das fontes solúveis a mais econômica na produção de celulases por *T. reesei* (Morikawa *et al.*, 1995).

4.4.2 Atividade de endoglicanases

Quanto a atividade de endoglicanases (Figura 11) verificou-se que o meio formulado com celulose também apresentou as maiores atividades, atingindo títulos enzimáticos de $3,99 \pm 0,23$ UI.mL⁻¹ em 108 horas. Tal como referido para FPA não é possível uma comparação de CMCases com os dados da literatura, visto que as condições e objetivos dos estudos são diferentes, tal como

visto para Cheng *et al.* (2009), onde três fusionantes de *P. decumbens* JU-A10 apresentaram atividades de 16,1; 15; 16,1, que foram muito maiores dos apresentados neste trabalho, mas foram produzidos em meios com farelo de trigo e celulose.

O cultivo com CMC também apresentou atividade para endoglicanase com atividade de $2,16 \pm 0,05 \text{ UI.mL}^{-1}$ em 84 horas. Até 72 horas o cultivo formulado com CMC apresentou as maiores atividades, inclusive superior a celulose. Tal como para FPA, os demais meios apresentaram atividades reduzidas de endoglicanase, sugerindo que as fontes de carbono utilizadas não apresentam efeito indutor.

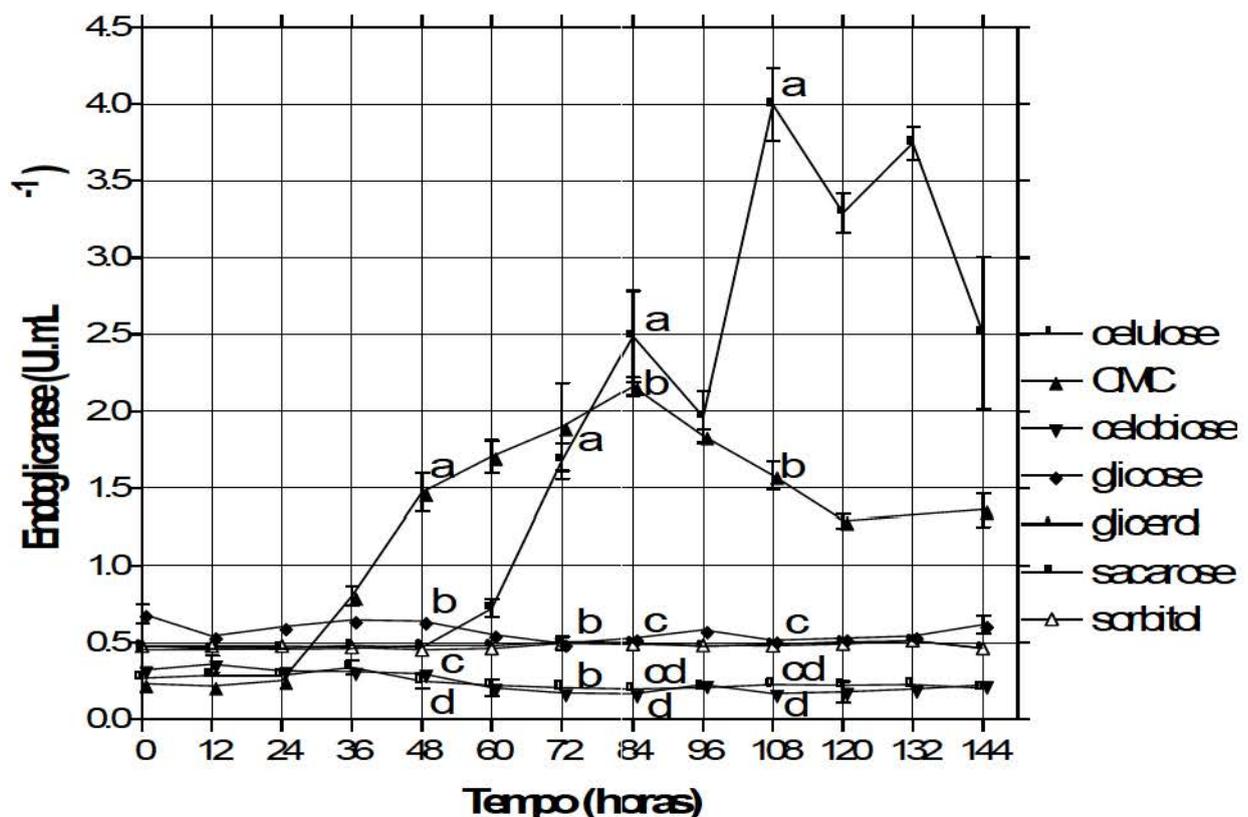


Figura 11. Atividade de endoglicanases de amostras de caldos enzimáticos produzidos por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo dia não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para propósito de análise comparativa mais detalhada entre a relação da atividade enzimática e do crescimento, a Figura 12 apresenta a atividade de endoglicanases e o crescimento

micelial nos diferentes meios de cultivo, utilizados para *P. echinulatum* 9A02S1. Nos cultivos com celulose (Figura 12A) e com CMC (Figura 12) o perfil de atividade enzimática apresenta certa semelhança ao de crescimento micelial. Estes dados contrastam com os de outros autores relatando a inexistência de relação entre crescimento fúngico e a expressão de celulases para *T. reesei* como verificado anteriormente por Messner & Kubicek (1991) e Ilmén *et al.* (1997).

No meio formulado com celobiose a atividade da enzima apresentou decréscimo a medida que ocorreu o crescimento fúngico, assim como quando foi utilizada sacarose no meio. A produção de endoglicanases nos meios formulados com glicose, glicerol e sorbitol apresentou oscilações, não estando relacionado ao crescimento micelial. Estes dados estão de acordo com os dados obtidos por Kalra *et al.* (1984) e Mandels & Reese (1960), onde sugerem que a expressão de celulases não ocorre em fontes de carbono que promovem um rápido crescimento como a glicose e o glicerol, mas seria provocada em fontes mais complexas ou por dissacarídeos como a celulose, celobiose e lactose.

A Figura 13 apresenta os gráficos das atividades endoglicanásicas e de perfil de pH dos caldos enzimáticos dos diferentes meios de cultivo. Verifica-se que nos cultivos formulados com celulose, glicose e sorbitol quando ocorreu queda do pH ocorreu um incremento na produção enzimática. No entanto, quando o pH voltou a elevar-se não existiu relação com a atividade enzimática, que manteve-se constante até o final do cultivo. Já nos cultivos formulados com CMC e celobiose o aumento na produção enzimática acompanhou a elevação do pH. Nos demais cultivos não verificou-se relação entre as alterações do pH e a produção endoglicanásica.

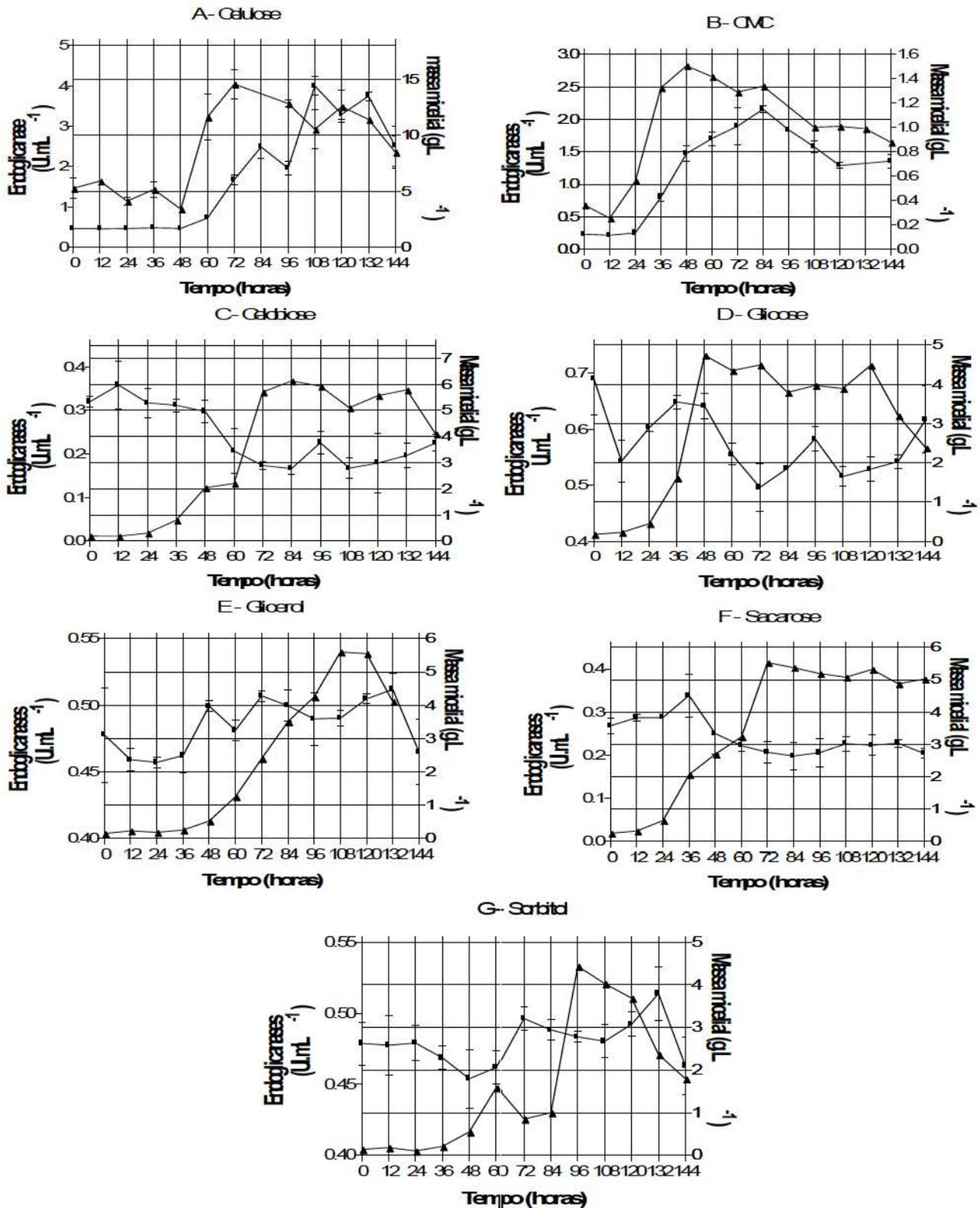


Figura 12. Atividade de endoglucanases (■) de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos mantidos sob agitação recíproca comparando-se com o crescimento micelial (▲) nos cultivos com diferentes fontes de carbono (1%). As fontes de carbono empregadas estão mencionadas no gráfico.

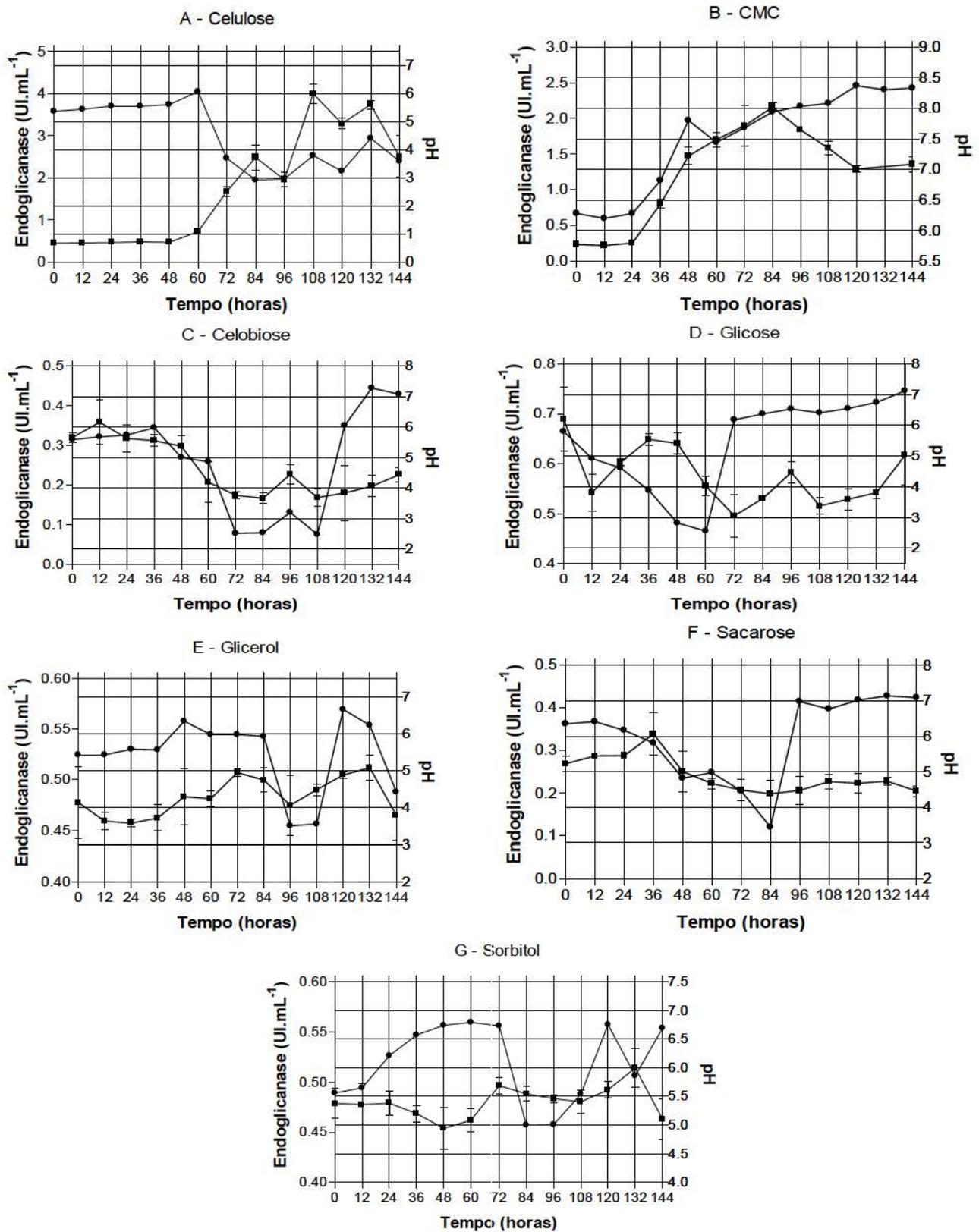


Figura 13. Atividade de endoglicanases (■) de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos mantidos sob agitação recíproca comparando-se com o pH (●) nos cultivos com diferentes fontes de carbono (1%). As fontes de carbono empregadas estão mencionadas no gráfico.

4.4.3 Atividade de β -glicosidases

Em relação às atividades de β -glicosidase (Figura 14) avaliada com salicina 1%, como substrato, a maior produção aconteceu a partir de 108 horas de cultivo, onde o meio formulado com celulose apresentou sua maior atividade de β -glicosidase com $0,202 \pm 0,06 \text{ UI.mL}^{-1}$. Os meios que apresentaram as maiores atividades para esta enzima foram os compostos por celobiose e glicose, em 132 horas de cultivo, com $0,228 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $0,223 \pm 0,02 \text{ UI.mL}^{-1}$, respectivamente.

Tal como referido para FPA e endoglicanases é difícil uma comparação com dados da literatura, visto que condições e propósitos foram distintos. Estudo realizado por Martins *et al.* (2008), comparando a produção enzimática de *P. echinulatum* com uma celulase comercial produzida por *T. reesei*, revelou que o *P. echinulatum* apresenta 65,8% a mais de β -glicosidases do que o *T. reesei*.

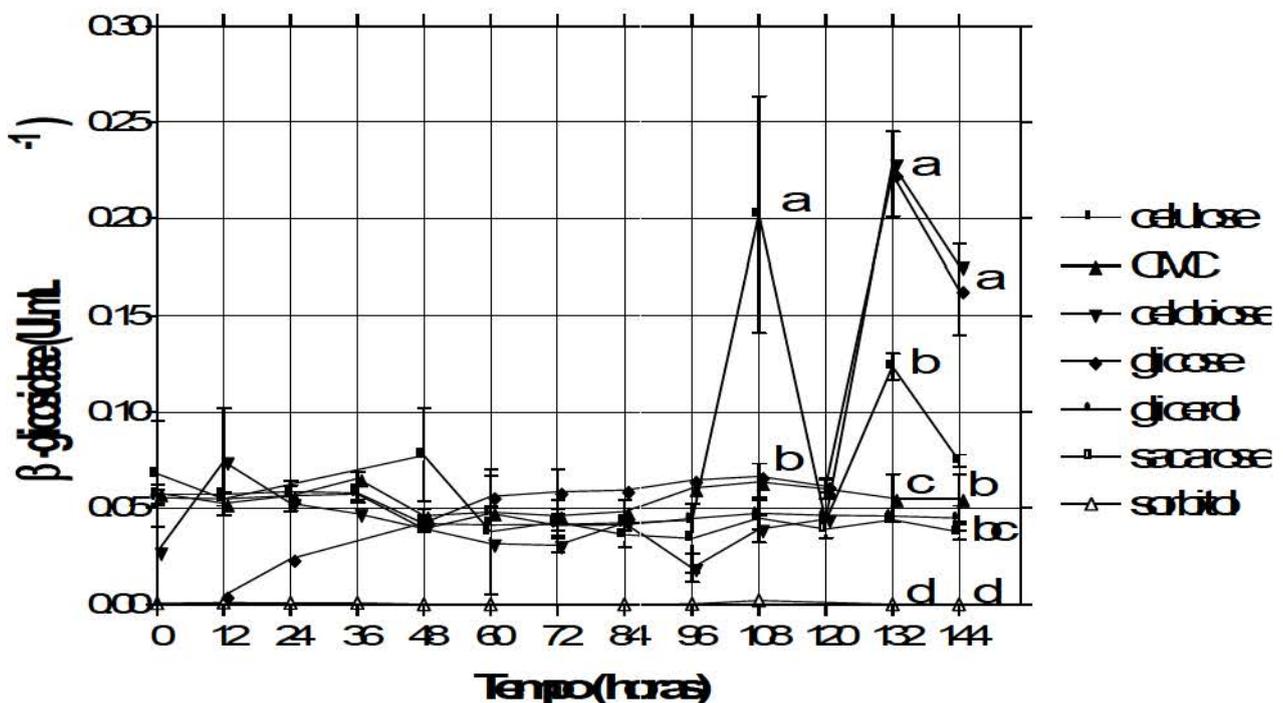


Figura 14. Atividade de β -glicosidases determinada empregando salicina como substrato, em caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo dia não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quando o teste de β -glicosidase foi realizado utilizando como substrato o pNPG, os resultados foram semelhantes ao teste realizado com salicina (Figura 15), apresentando um pico de atividade enzimática em 108 horas no meio formulado com celulose de $351,92 \pm 6,22 \text{ UI.mL}^{-1}$. Importante o fato de que no mesmo tempo de cultivo, sorbitol mostrou uma atividade enzimática de $171,90 \pm 4,30 \text{ UI.mL}^{-1}$, sendo que não foi possível detectar atividade desta enzima empregando salicina, possivelmente sugerindo a existência de duas isoformas desta enzima, e sendo o substrato pNPG mais sensível a ação enzimática. O pico de atividade enzimática de celobiose foi observado em 132 horas de cultivo com valor de atividade de $270,77 \pm 13,65 \text{ UI.mL}^{-1}$. O meio formulado com glicose começou a apresentar valores mais elevados para β -glicosidase desde 72 horas de cultivo com um pico em 132 horas de $221,22 \pm 2,29 \text{ UI.mL}^{-1}$. A redução das atividades observadas em 120 horas de cultivo podem ser explicadas pela adsorção da enzima ao substrato como relataram Beldman *et al.* (1987) em estudos com *T. viride* onde observaram que EG e CBH teriam sido inativadas pela sua adsorção ao substrato.

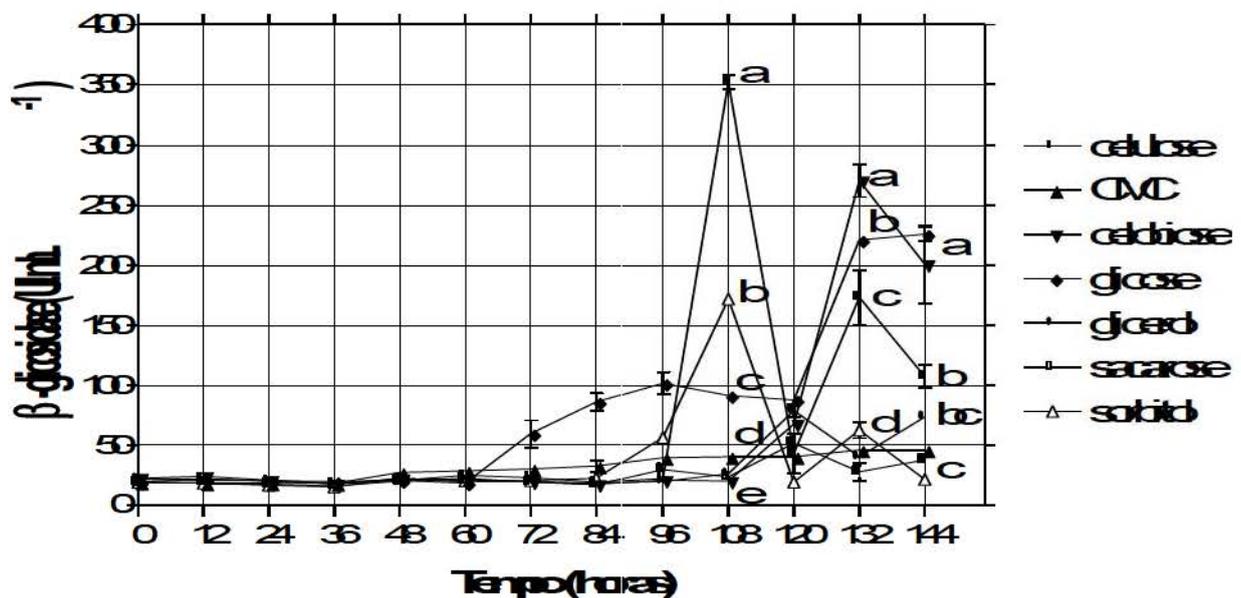


Figura 15. Atividade de β -glicosidases determinada com pNPG como substrato em caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo dia não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4.4 Atividade de xilanases

Em relação à atividade de xilanase (Figura 16) verificou-se que o cultivo formulado com celulose apresentou atividade crescente a partir 48 horas de cultivo, atingindo títulos enzimáticos de $0,0126 \text{ UI.mL}^{-1}$ em 132 horas. Embora a CMC tenha apresentado efeito indutor para a expressão da atividade de xilanase a partir de 24 horas de cultivo, essas atividades foram menores em relação às obtidas em meio formulado com celulose, sendo que as maiores dosagens enzimáticas foram $0,0064 \text{ UI.mL}^{-1}$ em 60 horas. O meio formulado com glicose também apresentou atividade constante a partir de 24 horas de cultivo com pico de $0,0042 \text{ UI.mL}^{-1}$. Já os demais cultivos realizados empregando celobiose, glicerol, sacarose e sorbitol apresentaram atividades enzimáticas muito reduzidas, sugerindo que estas fontes de carbono não apresentam efeito indutor para a produção de xilanases. Tal como para as outras atividades enzimáticas apresentadas anteriormente também não é possível uma comparação com dados da literatura, visto que as condições e objetivos são distintos. Entretanto, valores equivalentes de xilanases foram verificados para *P. janczewskii* em cultivos com glicose, sacarose e CMC, ficando em 0,03; 0,05 e $0,31 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente (Terrasan *et al.*, 2010).

As atividades reduzidas de xilanases observadas nos diferentes cultivos podem ter sido devido a ausência do substrato indutor (xilana). Embora a presença de xilana não seja necessária para a ocorrência de xilanase, visto que o cultivo com celulose também apresentou atividade. Os valores encontrados para o meio formulado com celulose podem ter influência da presença de xilana da celulose comercial utilizada.

Para *T. reesei*, Olsson *et al.* (2003) verificaram que este microrganismo apresentou elevadas atividades de celulasas e endoxilanases, sendo este efeito atribuído ao fato de que o regulador de celulasas AceII também afeta a regulação da produção de xilanases. Assim, a presença de celulose pode não somente induzir a produção de celulasas, mas também, a de xilanases (Aro *et al.*, 2001).

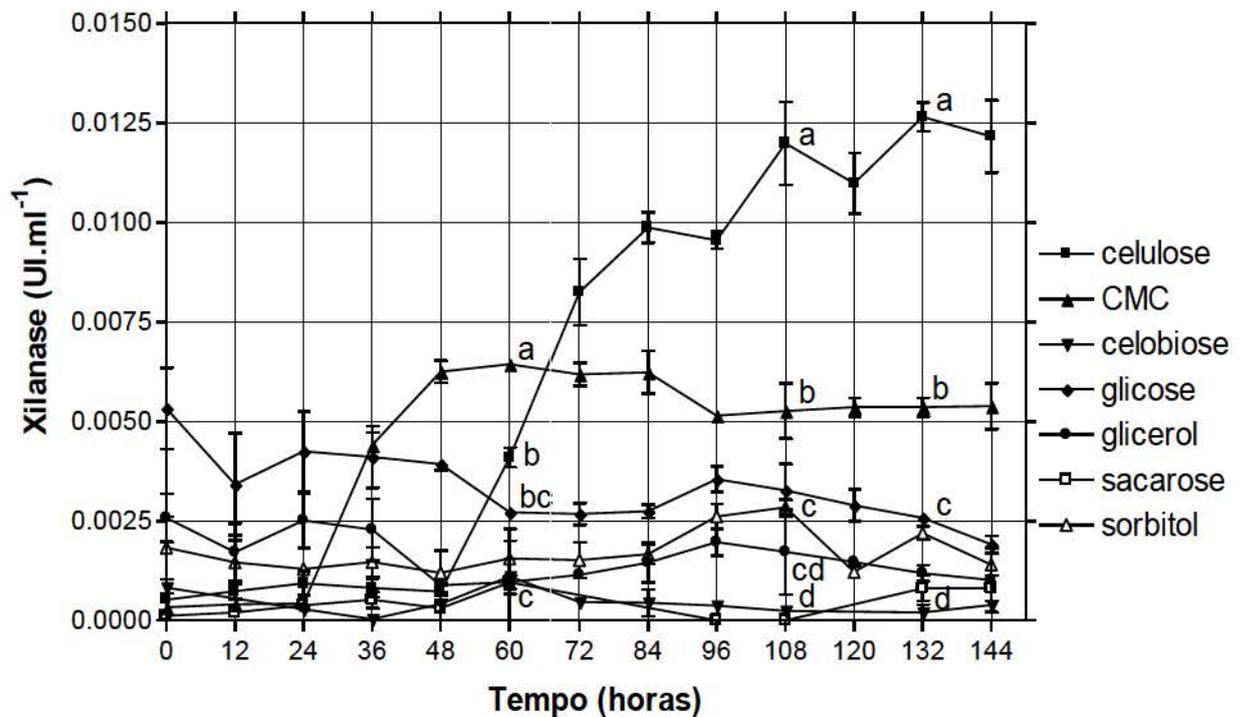


Figura 16. Atividade de xilanases de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos utilizando 1% de fonte de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo dia não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No presente trabalho, atividades celulolíticas e xilanolíticas foram detectadas mesmo no meio formulado com glicose como fonte de carbono, resultado semelhante ao indicado por Seyis & Aksoz (2005), no fungo *T. viride*, indicando uma possível produção constitutiva da xilanase. Outros estudos associados a atividades xilanolíticas constitutivas em *Trichoderma sp.* (Mach *et al.*, 1996; Mach & Zeilinger, 2003), comprovaram que níveis basais de atividade xilanolítica corresponderiam a atividade da xilanase *xyn 2*, cuja transcrição não estaria afetada pela presença de glicose no meio de cultura, mas que teria seus níveis de expressão aumentados na presença de xilana, xilobiose e sofrorose.

Os valores referentes aos picos de atividade enzimática em cada meio, com respectivo tempo de cultivo, estão apresentados na Tabela 2. Os picos de FPA nos diferentes meios de cultivo apresentaram-se variáveis, sendo em celulose, CMC e sacarose a partir de 84 horas, e nos demais meio até 36 horas. Semelhante à produção de FPA, atividade endoglicanásica apresentou seus picos

em diferentes tempos de coleta nos distintos meios de cultivo, tendo uma maior prevalência a partir de 84 horas, como visto nos cultivos contendo celulose, CMC, glicerol e sorbitol como fonte de carbono. Já os cultivos formulados com celobiose, glicose e sacarose apresentaram picos de atividade endoglicanásica em até 36 horas. Os picos de atividade de β -glicosidases, utilizando como substrato o pNPG, nos diferentes meios de cultivo foram obtidos a partir de 108 horas de cultivo, enquanto que utilizando salicina como substrato os picos de atividade oscilaram, porém mantendo-se próximo ao final do cultivo, como nos meios contendo celulose, CMC, celobiose, glicose e sorbitol. Mesmo sendo pouco expressiva frente aos substratos utilizados, a atividade de xilanases apresentou seus picos entre o primeiro e segundo dia de cultivo na maioria dos meios utilizados, com exceção de celulose e sorbitol que apresentaram picos a partir de 108 horas.

Tabela 2: Picos de atividade enzimática de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases

Fonte de carbono	Atividades enzimáticas (UI.mL ⁻¹)				
	FPA	Endoglicanases	β -glicosidases (ρ NPG)*	β -glicosidases (salicina)*	Xilanases
Celulose	0,493 \pm 0,023 (132h)	3,99 \pm 0,23 (108h)	351,92 \pm 6,224 (108h)	0,202 \pm 0,06 (108h)	0,01264 \pm 0,00036 (132h)
CMC	0,162 \pm 0,04 (84h)	2,16 \pm 0,057 (84h)	40,364 \pm 1,484 (120h)	0,069 \pm 0,0139 (96h)	0,00644 \pm 0,00002 (60h)
Celobiose	0,095 \pm 0,032 (12h)	0,359 \pm 0,056 (12h)	270,775 \pm 13,635 (132h)	0,228 \pm 0,0009 (132h)	0,0011 \pm 4,42 e-004 (60h)
Glicose	0,063 \pm 0,006 (24h)	0,649 \pm 0,012 (36h)	226,182 \pm 5,737 (144h)	0,223 \pm 0,022 (132h)	0,0042 \pm 0,0010 (24h)
Glicerol	0,023 \pm 0,0023 (144h)	0,512 \pm 0,012 (132h)	78,827 \pm 5,219 (120h)	0,057 \pm 0,043 (36h)	0,0025 \pm 0,00070 (24h)
Sacarose	0,040 \pm 0,006 (24h)	0,339 \pm 0,049 (36h)	51,447 \pm 0,747 (120h)	0,078 \pm 0,024 (48h)	0,00191 \pm 0 (60h)
Sorbitol	0,018 \pm 0,0021 (36h)	0,514 \pm 0,019 (132h)	171,909 \pm 4,03 (108h)	0,00213 \pm 0,00033 (108h)	0,0028 \pm 0,0019 (108h)

* Substratos utilizados para a determinação das atividades enzimática.

Estudo realizado por Ahmed *et al.* (2009) com *Trichoderma harzianum*, nas mesmas condições de cultivo deste trabalho, comparou a produção de celulases em meios formulados com 1% de glicose, 1% de CMC e resíduos vegetais. Foram verificadas atividades enzimáticas relativamente mais elevadas no meio formulado com CMC e muito reduzidas em glicose. Neste sentido, os autores sugerem que as endoglicanases são enzimas reprimidas por glicose e induzidas por CMC.

Estudo realizado com *Penicillium decumbens* 144-2 crescido em meio suplementado com 2% glicose apresentou baixos níveis de atividade de FPA, celobiohidrolase, CMCase e β -glicosidase. O mutante JU-A10 da cepa 144-2 produziu níveis significativamente maiores de celulases com glicose e com farelo de trigo no meio. Ambas as linhagens produziram mais β -glicosidase em meio com glicose ou farelo de trigo o que, de acordo com Sun *et al.* (2008) mostrou que a síntese de β -glicosidase foi constitutiva, diferente do observado para endoglicanase e celobiohidrolase.

Camassola & Dillon (2007a), em estudo sobre o efeito de metilxantinas na produção de celulases por *P. echinulatum*, verificaram que diferentes concentrações de cafeína e teofilina podem aumentar a produção de FPA e β -glicosidases tanto no parental 2HH como no mutante 9A02S1.

A Tabela 3 apresenta os valores das atividades específicas de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases, bem como os valores dos rendimentos em biomassa dos diferentes cultivos realizados. O meio de cultivo formulado com sorbitol apresentou as maiores atividades específicas para as enzimas endoglicanases, β -glicosidases e xilanases, enquanto que para FPA, glicerol apresentou a maior atividade específica.

Tabela 3: Atividade específica de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases, e rendimento de biomassa.

Fonte de carbono	Atividade específica					Rendimento de biomassa (g.g ⁻¹)
	FPA (UI.mg ⁻¹)	Endoglicanases (UI.mg ⁻¹)	β -glicosidases (ρ NPG)* (UI.g ⁻¹)	β -glicosidases (salicina)* (UI.mg ⁻¹)	Xilanases (UI.mg ⁻¹)	
Celulose	10,74 (132h)	112,48 (108h)	9,92 (108h)	5,69 (108h)	0,27 (132h)	1,45 (72h)
CMC	10,21 (84h)	136,19 (84h)	5,09 (120h)	4,64 (96h)	0,53 (60h)	0,15 (48h)
Celobiose	29,68 (12h)	111,49 (12h)	64,62 (132h)	54,41 (132h)	0,49 (60h)	0,61 (84h)
Glicose	23,90 (24h)	435,57 (36h)	24,50 (144h)	35,73 (132h)	1,52 (24h)	0,47 (48h)
Glicerol	35,93 (144h)	64 (132h)	115,92 (120h)	85,07 (36h)	3,52 (24h)	0,56 (108h)
Sacarose	15,62 (24h)	184,23 (36h)	22,36 (120h)	21,54 (48h)	0,57 (60h)	0,55 (72h)
Sorbitol	28,12 (36h)	778,87 (132h)	260,46 (108h)	3,22 (108h)	4,24 (108h)	0,44 (96h)

* Substratos utilizados para a determinação das atividades enzimáticas.

4.5 SDS-PAGE de caldos enzimáticos produzidos por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivo submerso

A estimativa da massa molecular das celulasas e de outras enzimas obtidas nos diferentes cultivos foi realizada através de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS, e, posteriormente coloração das proteínas com *Coomassie Brilliant Blue*. As figuras foram apresentadas em escala de cinza.

Foram adicionadas quantidades diferentes de volumes de caldo enzimático para a melhor visualização das bandas de hidrólise nos géis de poliacrilamida. As quantidades de proteínas utilizadas para a realização de SDS-PAGE encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidades em μg de proteínas utilizada na realização das eletroforeses em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos diferentes meios de cultivo.

Quantidade de proteína correspondente ao volume utilizado em SDS-PAGE (μg)							
Horas de coleta	Celulose	CMC	Celobiose	Glicose	Sacarose	Glicerol	Sorbitol
0	1,427	1,646	1,906	1,605	1,507	0,281	0,276
12	1,311	1,880	1,291	2,505	1,648	0,282	0,275
24	0,896	1,445	0,812	1,100	1,027	0,285	0,272
36	0,877	1,629	0,510	0,598	0,739	0,270	0,259
48	0,224	3,842	0,848	1,823	1,449	0,263	0,273
60	0,235	4,790	0,891	0,900	1,324	0,268	0,292
72	0,331	4,653	0,492	3,196	0,867	0,266	0,328
84	0,642	6,347	0,199	1,938	0,384	0,308	0,305
96	1,087	5,875	0,377	3,051	0,914	0,254	0,268
108	3,548	3,517	0,199	2,389	0,996	0,248	0,267
120	3,011	3,169	0,215	1,865	0,923	0,276	0,308
132	4,595	4,266	1,259	1,872	0,847	0,320	0,264
144	3,462	4,266	1,476	2,771	1,115	0,258	0,326

A análise dos géis apresentou a presença de múltiplas bandas nas amostras dos caldos

enzimáticos produzidos a partir das diferentes fontes de carbono utilizadas nos meios de cultivo, indicando a presença de diversas proteínas.

A análise do gel de proteínas totais obtido a partir do caldo enzimático do *P. echinulatum* crescido em meio com celulose (Figura 17A), evidenciou a presença de inúmeras bandas. Verificou-se que as bandas indicativas de proteínas de 212,31; 80,40; 60,79; 47,83 e 36,16 kDa estavam mais acentuadas. A maioria destas bandas foram mais evidentes a partir de 72 horas do cultivo, dados que corroboram com a dosagem de proteínas (Figura 9). O gel de proteínas totais obtido a partir do caldo enzimático precipitado proveniente do cultivo formulado com CMC, apresentou maior produção enzimática de 48 a 84 horas de cultivo, com inúmeras bandas indicativas desta atividade, evidenciando as bandas de 231,03; 64,41; 56,59; 43,67 e 29,61 kDa (Figura 17B). Já o gel realizado com as proteínas totais extraídas do cultivo formulado com celobiose (Figura 17C), permitiu a visualização de quatro bandas a partir de 72 horas de cultivo de 216,18; 81,82; 60,28 e 40,70 kDa. Em meio formulado com glicose verifica-se quatro bandas já em 60 horas de cultivo. Estas bandas indicaram a presença de enzimas de 215,91; 77,57; 62,61 e 42,57 kDa (Figura 17D). Nas proteínas produzidas em meio formulado com sacarose, foram verificadas bandas 210,41; 97,33 e 27,33 kDa (Figura 17E).

Comparando com as figuras de SDS-PAGE descritas anteriormente no meio formulado com glicerol, verificou-se que neste meio o maior número de proteínas distintas foram produzidas, sendo possível evidenciar bandas de 212,49; 80,58; 56,54; 45,31; 17,10 e 13,71 kDa e outras de baixa massa molecular (Figura 17F). Na Figura 17G, referente ao cultivo contendo sorbitol como fonte de carbono, verificou-se inúmeras bandas de proteínas sendo que as mais evidentes apresentam 117,92; 63,04 e 25,10 kDa.

Comparando os perfis de bandas obtidos nas eletroforeses em géis de poliacrilamida é possível verificar a constante presença de proteínas com bandas em torno de 215, 80 e 62 kDa,

independente da fonte de carbono utilizada como substrato. As amostras provenientes dos cultivos produzidos com glicerol apresentaram a maior variação no perfil de bandas de proteínas quando comparadas com os demais cultivos. Também neste meio, as bandas apresentaram-se mais definidas que nos demais, sugerindo que na presença de glicerol as proteínas secretadas são menos glicosiladas que nos meio formulados com as outras fontes de carbono testadas, onde foram verificadas bandas difusas.

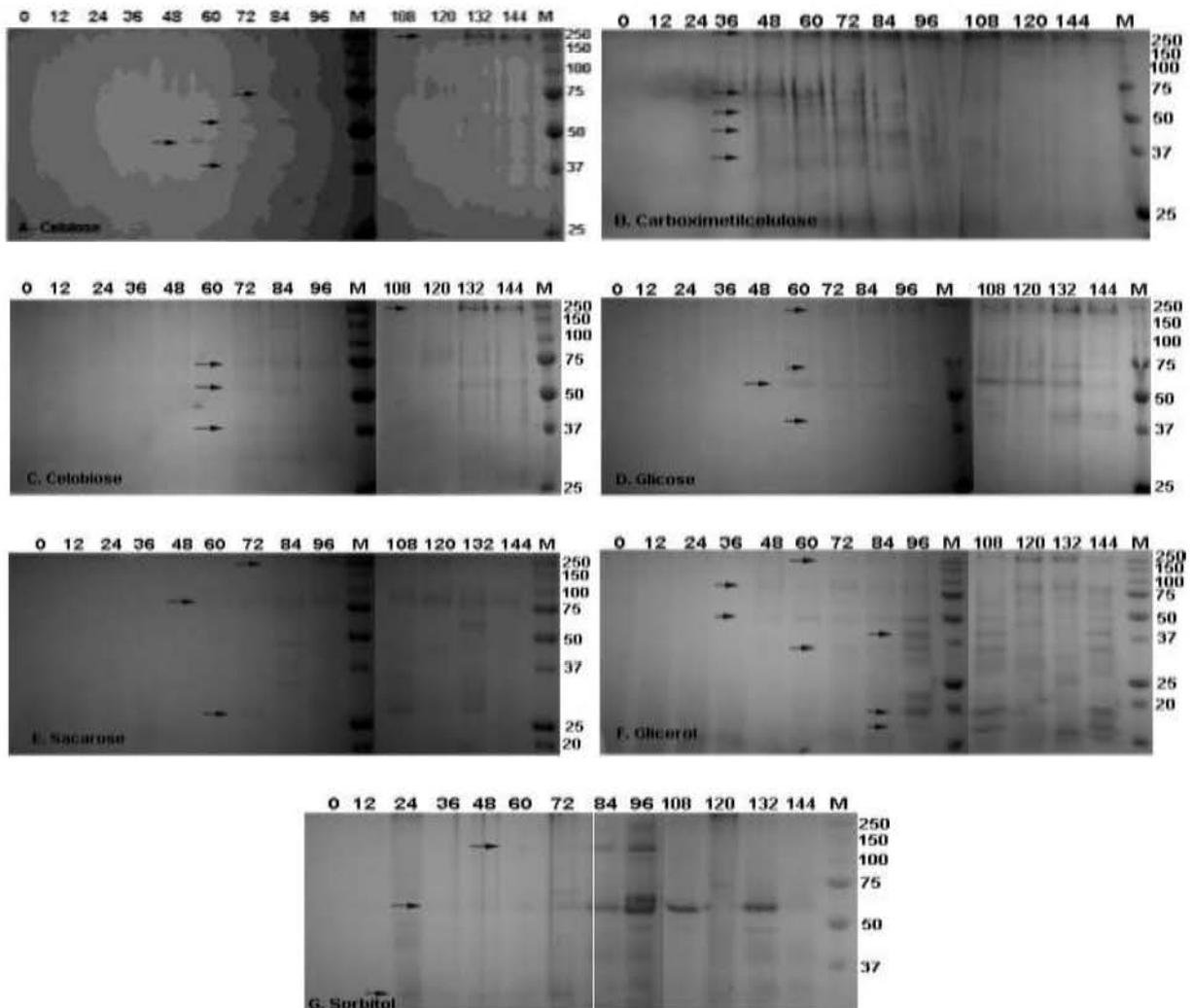


Figura 17. Perfil das proteínas totais separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir do caldo enzimático de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de fonte de carbono. Os dados das quantidades de proteínas aplicadas nos géis encontram-se na Tabela 4. As informações na parte superior das figuras relacionam-se ao tempo de cultivo em horas. M - marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular.

4.6 Zimograma para atividade de endoglicanases de caldos enzimáticos produzidos por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos

Para a determinação da atividade da enzima endoglicanase foram realizadas eletroforeses com soluções obtidas de caldos de cultivos tratadas com SDS e as proteínas corridas em gel de poliacrilamida com SDS e CMC como substrato. Após o gel foi lavado para retirada do SDS e adicionado de solução 1% (m/v) de vermelho congo e revelação com solução de NaCl 1M. As figuras, correspondentes as fotografias, são apresentadas em escala de cinza.

Como observa-se na Figura 18, nas amostras obtidas do cultivo com celulose existem halos nas posições equivalentes a 232,77 e 71,30 kDa a partir de 60 horas de cultivo. Estas bandas mantiveram-se até o fim do experimento (144 h). Em 72 horas, observa-se uma banda de atividade de endoglicanase de 42,83 kDa, e a partir de 108 horas também evidenciam-se bandas de 58,61; 22 e 19,56 kDa. Ainda em 108 horas de cultivo é possível perceber a atividade de endoglicanase na posição 48,18 kDa (Figura 18A).

A diminuição da intensidade de bandas poderia ser explicada pela perda da atividade enzimática decorrente da inativação enzimática durante o cultivo, possivelmente pela ação de proteases ou da interação das enzimas com inibidores.

A atividade endoglicanásica apresentada na Figura 18B corrobora a atividade detectada no gel de atividade (Figura 18A). Verificou-se que o aparecimento de bandas ocorre a partir de 60 horas de cultivo, quando se dá o início do aumento da produção enzimática. O gel apresentou diversos halos de atividade na coleta de 108 horas de cultivo o que coincide com a maior produção enzimática visualizada no gráfico da atividade de endoglicanase.

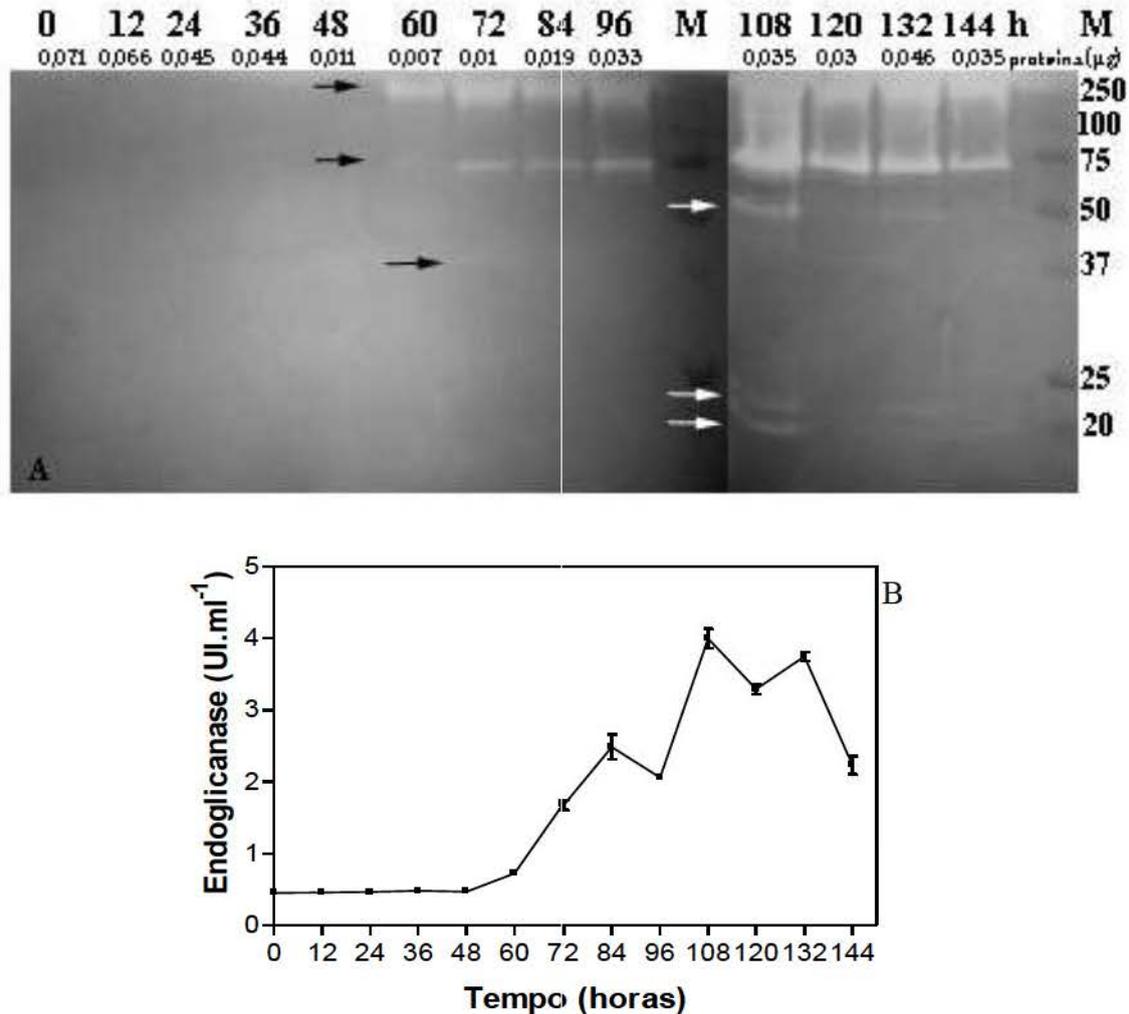


Figura 18. Atividade de endoglicanases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **celulose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas a partir de 5 µL do caldo enzimático de zero a 48 horas, 3 µL de 60 a 96 horas e 1 µL a partir de 108 horas de cultivo. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em µg. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade endoglicanásica.

A atividade da enzima endoglicanase do caldo enzimático produzido a partir do meio formulado com CMC foi detectada a partir de 36 horas de cultivo, apresentando halos de hidrólise nas posições de 234,73 e 134,97 kDa até o final do experimento (Figura 19A). Nas coletas de 36 a 96 horas de cultivo também foram evidenciada bandas de 74,75 e 69,41 kDa. Em 48 e 72 horas de cultivo foram detectadas endoglicanases de 19,98 kDa.

O aumento na produção de endoglicanases no meio formulado com CMC ocorreu a partir de

36 horas de cultivo (Figura 19A e B). Após um pico em 84 horas de cultivo, ocorreu o decréscimo da atividade endoglicanásica, o que pode ser percebido no gel de atividade com a ausência de bandas de menores massas moleculares a partir desta coleta.

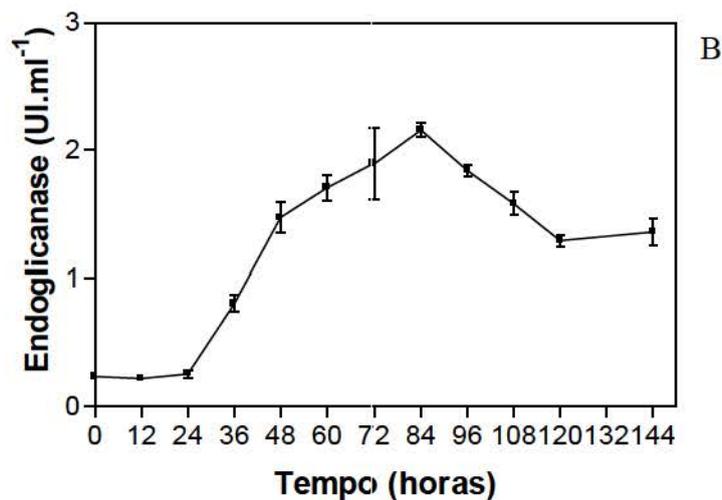
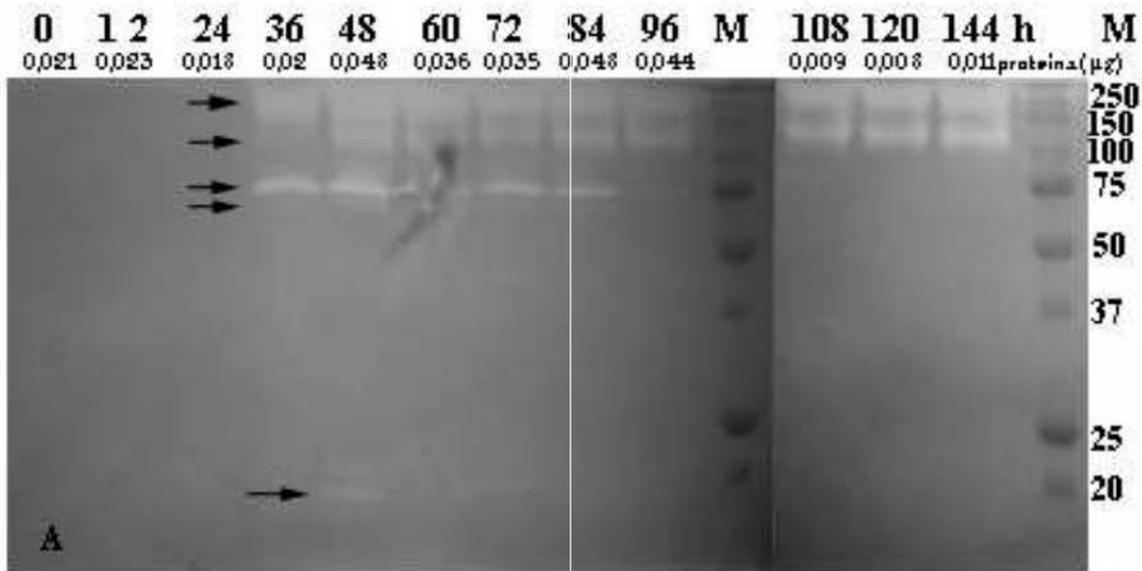


Figura 19. Atividade de endoglicanases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de CMC em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas a partir de 5 μ L do caldo enzimático de zero a 48 horas, 3 μ L de 60 a 96 horas e 1 μ L a partir de 108 horas de cultivo. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade endoglicanásica.

No zimograma preparado com amostras provenientes do meio formulado com celobiose foi

possível verificar halos de atividade endoglicanásica a partir de 24 horas na posição de 75,87 kDa (Figura 20A). Também foi detectada atividade enzimática em 84, 120, 132, 144 horas de cultivos, estas de 244,71, kDa. A partir do gráfico de atividade endoglicanásica para amostras formuladas com celobiose (Figura 20B), percebeu-se que a atividade é detectável apesar de ser muito reduzida, sugerindo que na presença de celobiose, apenas endoglicanases constitutivas tenham sido detectadas.

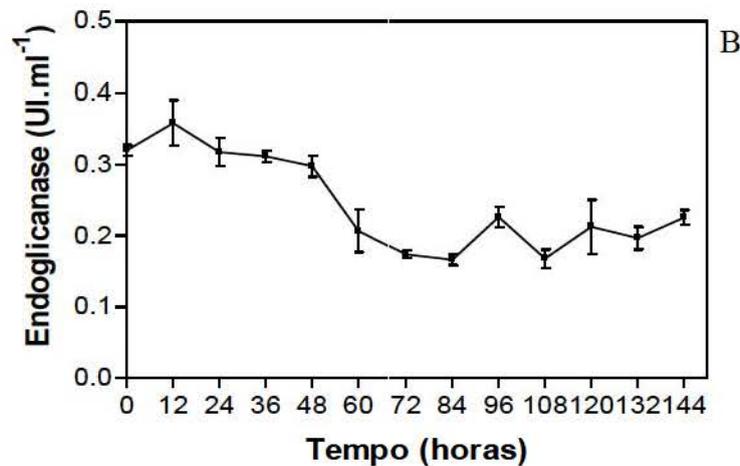
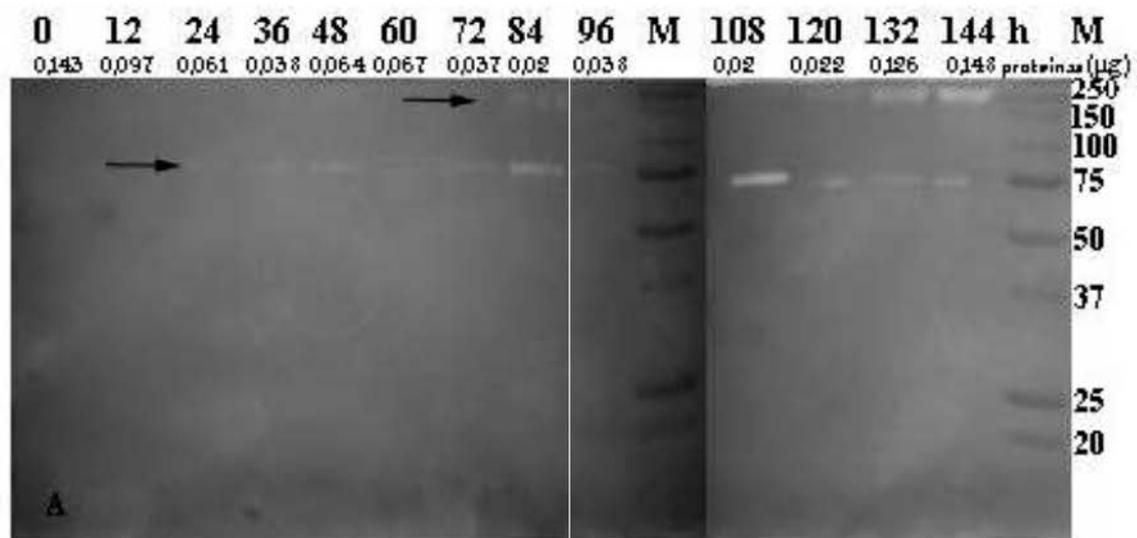


Figura 20. Atividade de endoglicanases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **celobiose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 30 µL do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em µg. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade endoglicanásica.

A Tabela 5 apresenta as quantidades de proteínas aplicadas nos géis de poliacrilamida obtido a partir dos cultivos com glicose, sacarose e sorbitol.

Tabela 5. Quantidades em μg de proteínas utilizadas na realização das eletroforeses em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com glicose, sacarose e sorbitol.

Horas de coleta	Quantidade de proteína correspondente ao volume utilizado em SDS-PAGE (μg)		
	glicose	sacarose	sorbitol
0	0,401	0,377	0,069
12	0,626	0,412	0,069
24	0,275	0,257	0,068
36	0,150	0,185	0,065
48	0,456	0,362	0,068
60	0,225	0,331	0,073
72	0,799	0,217	0,082
84	0,484	0,096	0,076
96	0,763	0,228	0,067
108	0,796	0,249	0,067
120	0,622	0,231	0,077
132	0,624	0,212	0,066
144	0,924	0,279	0,082

O zimograma realizado com caldos enzimáticos produzidos em cultivos formulados com glicose evidencia atividade enzimática de endoglicanase a partir de 72 horas de cultivo com halos de hidrólise na posição 214,91 kDa. Ainda foram detectadas bandas de 77,26 kDa em 48 e 60 horas de cultivo. As bandas visualizadas não de baixa intensidade devido à reduzida atividade enzimática detectada como visto na figura 11.

Sun *et al.* (2008), em estudo realizado com *Penicillium decumbens* obteve zimogramas para endoglicanase com quatro bandas a partir dos meios formulados com glicose e 10 bandas dos meios

com celulose, sendo que destas, quatro eram as mesmas do meio com glicose, significando que tratam-se de enzimas basais. Concluíram também que endoglicanases de pequeno peso molecular são expressas mesmo na ausência de indução.

O gráfico da atividade endoglicanásica obtido a partir do caldo enzimático do cultivo contendo sacarose como fonte de carbono mostrou que esta fonte de carbono não foi favorável para a produção desta enzima apresentando taxas muito reduzidas, assim como foi observado no gel de atividade onde bandas de baixa intensidade de 70,13 e 78,83 kDa foram detectadas a partir de 84 horas de cultivo. Bandas de 77,23 kDa foram observadas no gel de atividade a partir do caldo enzimático formulado com sorbitol, porém a partir de 36 horas de cultivo.

Nos cultivos com glicerol foram verificadas bandas de atividade endoglicanásica de 240,20 e 76,80 kDa durante todo o experimento, e em 108, 132 e 144 horas, bandas com menores massas moleculares foram observadas (48,01 e 40,80 kDa) (Figura 21A).

O gráfico de atividade endoglicanásica para as amostras obtidas em cultivo com glicerol (Figura 21B) apresentou constância na produção enzimática sem pontos de máxima produção expressivos.

Os resultados observados nos zimogramas para endoglicanases das amostras provenientes de cultivos com variação na fonte de carbono dão indícios da presença de endoglicanases constitutivas ou basais, como o que é indicado pela presença constante de bandas e torno de 76 kDa. Estes dados corroboram com Sun *et al.*, (2008) que relataram em estudo com *P. decumbens* a existência de uma endoglicanase com 34 kDa com síntese basal. Ainda a detecção de bandas com menores massas moleculares ao mesmo tempo que ocorreu a redução da intensidade de bandas de maiores massas moleculares, especialmente observado no meio formulado com celulose, sugerem que as formas de maior massas moleculares podem ser clivadas ou diferentes formas da enzima são expressas de

acordo com as formas de celulose presentes no meio.

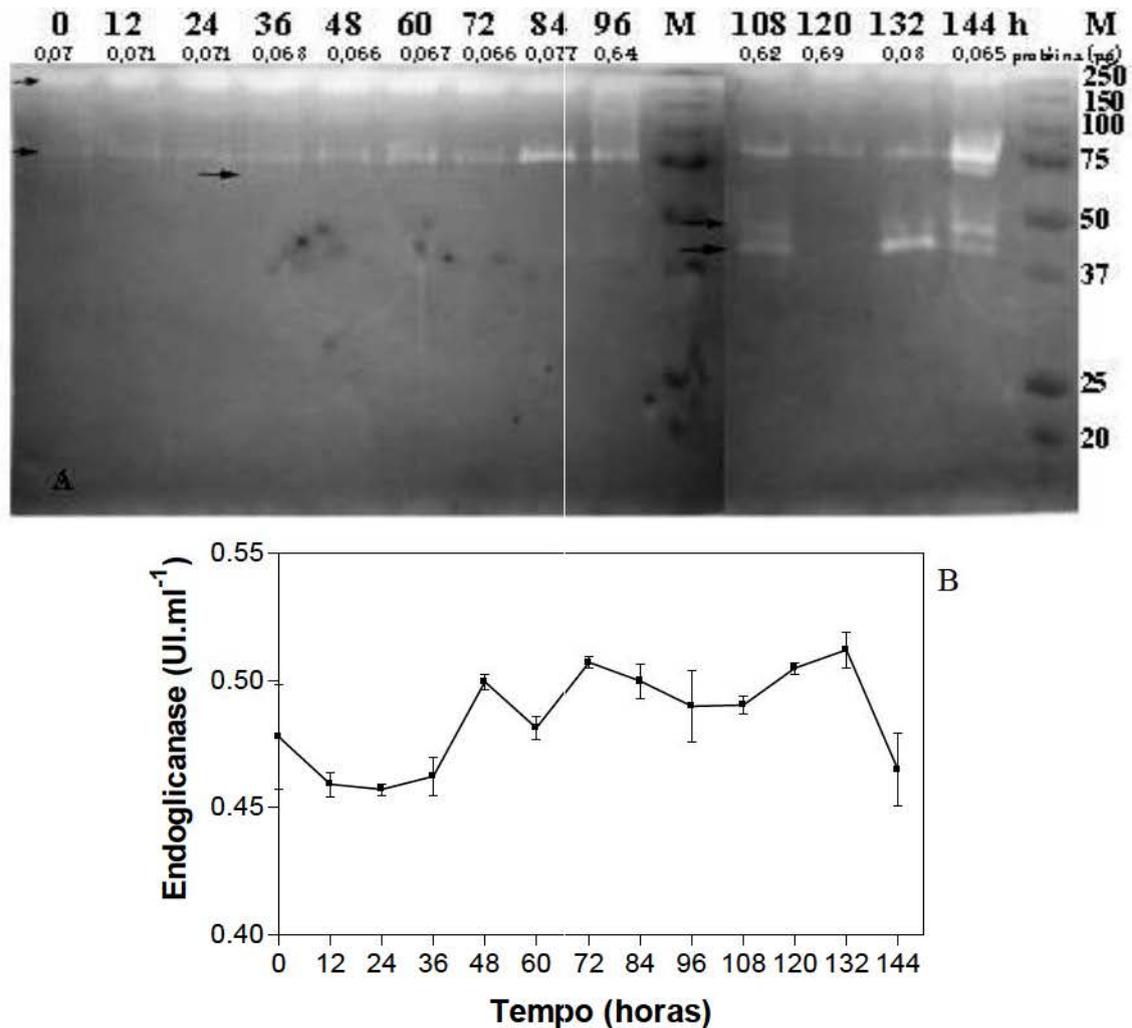


Figura 21. Atividade de endoglicanases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **glicerol** em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 100 μ L do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade endoglicanásica.

4.7 Zimograma para atividade de β -glicosidases de caldos enzimáticos produzidos por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos

Para determinar a massa molecular relativa das β -glicosidases, amostras precipitadas do caldo enzimático produzido pelo fungo *P. echinulatum* 9A02S1 nos diferentes meios de cultivo foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, e, após lavagem os géis

foram imersos em solução de esculina e revelados com solução aquosa de cloreto férrico. As figuras foram apresentadas em escala de cinza.

A análise dos géis mostrou que estas enzimas expressam-se mais tardiamente, após a ação das celobiohidrolases e endoglicanases, e apresentam uma elevada massa molecular.

No meio suplementado com celulose, a expressão das β -glicosidases foi detectada em 108, 132 e 144 horas de cultivo com atividade intensa, apresentando bandas de 228,76 kDa (Figura 22A).

A Figura 22B apresenta o gráfico da atividade enzimática de β -glicosidases em cultivo formulado com celulose, onde foi possível comparar os pontos de máxima produção enzimática com os resultados obtidos no gel de atividade.

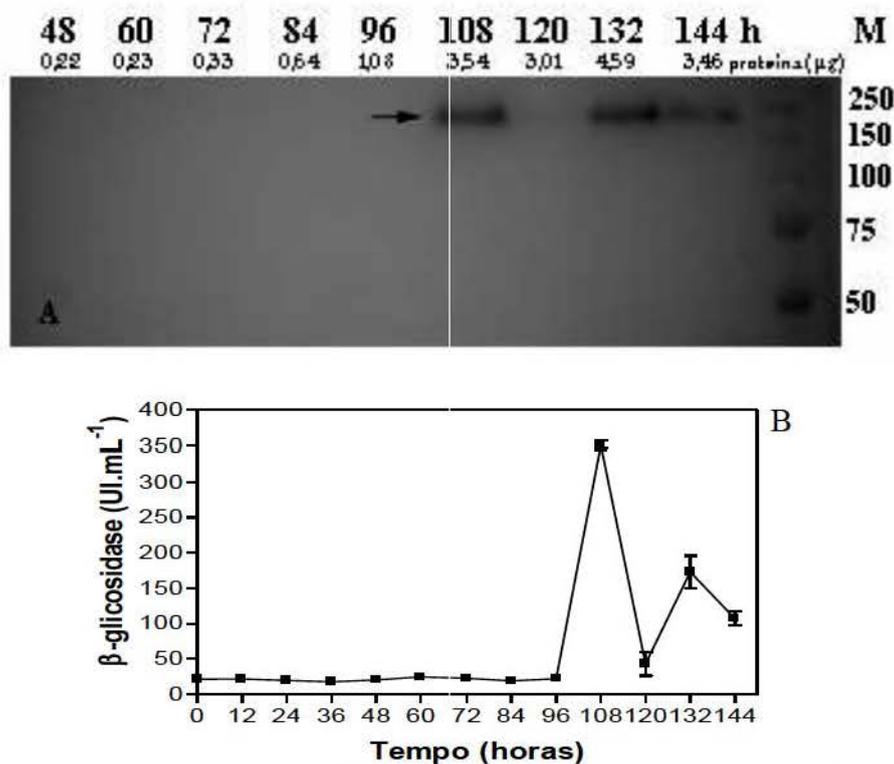


Figura 22. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **celulose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 100 μ L do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade β -glicosidásica do caldo enzimático sobre ρ NPG.

A atividade enzimática de β -glicosidases para o meio formulado com CMC pode ser

detectada a partir de 72 horas de cultivo, intensificando-se nos pontos finais da coleta. As bandas apresentaram 215,77 kDa (Figura 23A).

Na Figura 23B é possível verificar graficamente a atividade β -glicosidásica dos caldos enzimáticos dos cultivos contendo CMC como fonte de carbono, onde ocorreu um aumento gradativo da produção desta enzima, apesar de pouco expressiva a partir de 48 horas de cultivo chegando em 144 horas ao ponto de máxima produção enzimática.

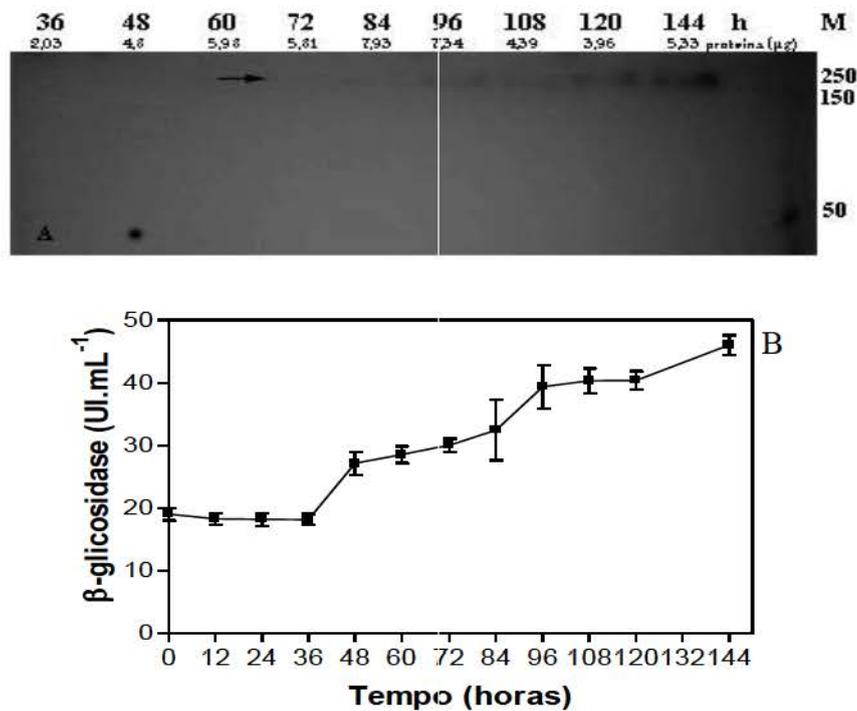


Figura 23. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de CMC em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 500 μ L do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade β -glicosidásica do caldo enzimático sobre ρ NPG.

No meio formulado com celobiose (Figura 24A), a atividade de β -glicosidases foi evidenciada somente nos dois últimos pontos de coleta (132 e 144 horas), assim como é possível verificar no gráfico da atividade enzimática (Figura 24B). Este meio de cultivo permitiu a visualização de duas isoformas com atividade de β -glicosidases de massas relativas de 212,25 e

146,95 kDa. O aumento na quantidade de amostra precipitada não alterou o resultado encontrado.

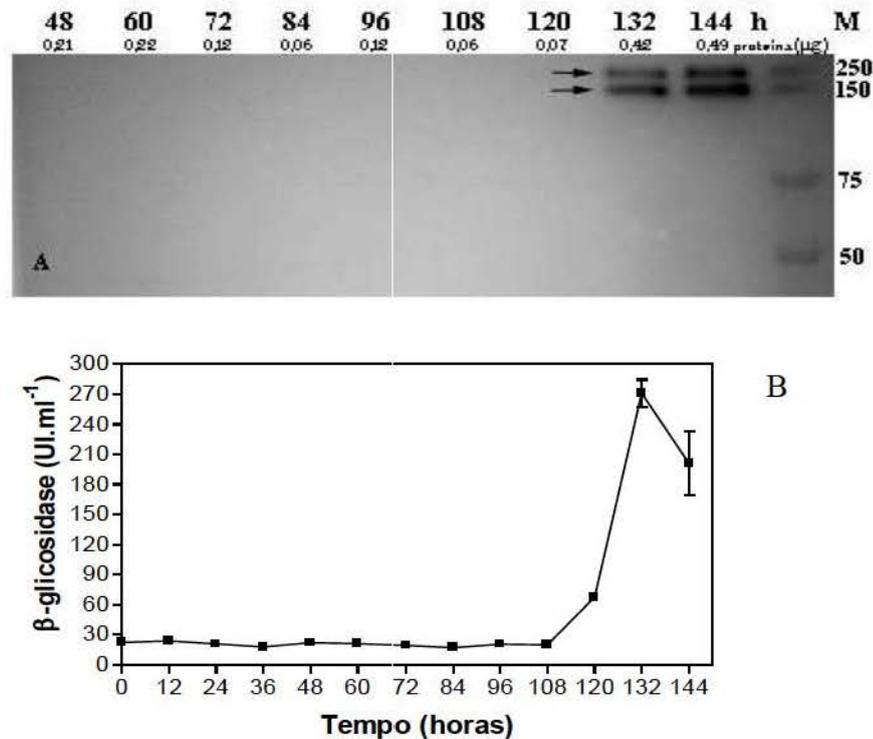


Figura 24. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **celobiose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 100 μ L do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade β -glicosidásica do caldo enzimático sobre ρ NPG.

O meio formulado com glicose apresentou atividade de β -glicosidases a partir de 72 horas de cultivo (Figura 25A), após o consumo da glicose pelo fungo, bem antecipadamente quando se compara às outras fontes de carbono utilizadas com a mesma quantidade de caldo enzimático precipitado. As bandas apresentadas possuem 216,18 kDa.

O gráfico da atividade enzimática de β -glicosidases apresentado na Figura 25B apresenta o aumento da produção desta enzima a partir de 72 horas de cultivo assim como foi detectado no gel de atividade.

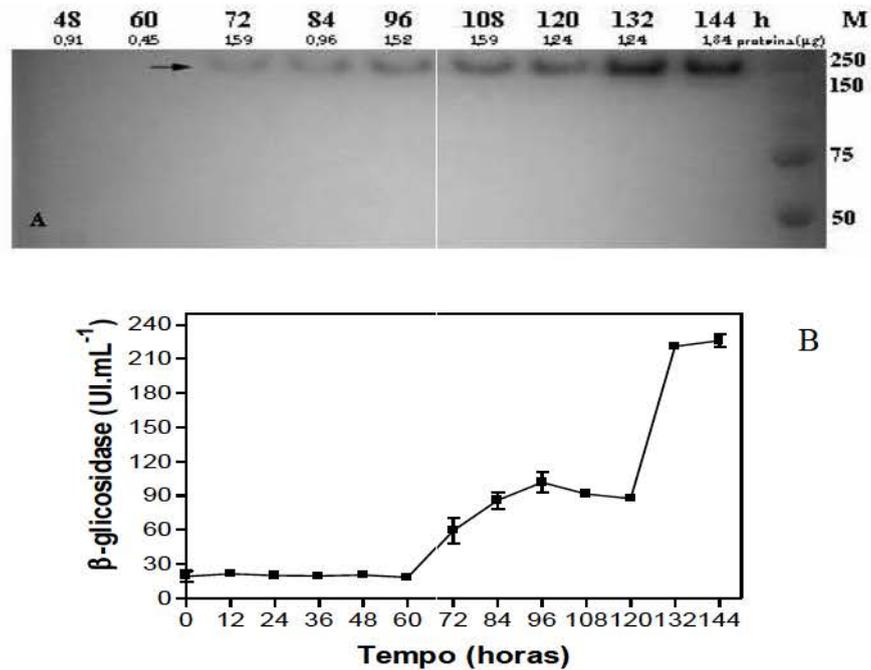


Figura 25. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **glicose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 200 μ L do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade β -glicosidásica do caldo enzimático sobre ρ NPG.

A atividade de β -glicosidases (Figura 26A), a partir da amostra precipitada do meio formulado com sacarose, apresentou bandas de 222,30 kDa, sendo detectada em 96, 120 e 144 horas de cultivo, assim como é verificado no gráfico de atividade desta enzima (Figura 26B).

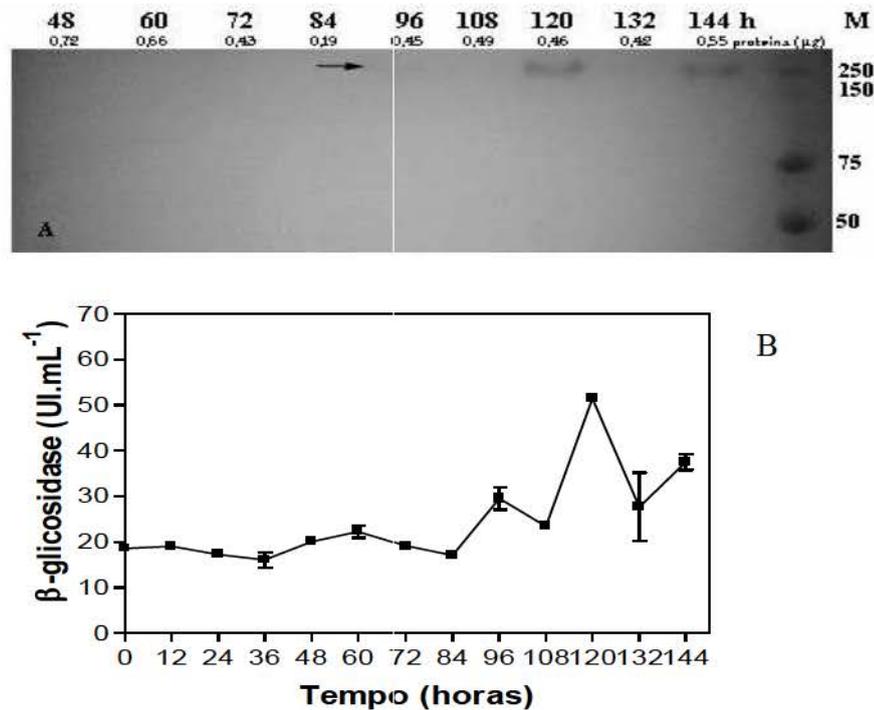


Figura 26. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **sacarose** em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 200 μ L do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade β -glicosidásica do caldo enzimático sobre ρ NPG.

Quando o substrato do meio de cultivo foi o glicerol, a atividade de β -glicosidases evidenciou-se somente nos últimos pontos de coleta (120, 132 e 144 horas). A banda visualizada em 144 horas possui 216,69 kDa (Figura 27A). Em 120 e 132 horas foram visualizadas bandas menores (150,22 kDa) que as encontradas nos demais meios de cultivo, sendo mais expressiva em 120 horas. No gráfico da atividade enzimática foi verificada a máxima produção desta enzima em 120 horas de cultivo (Figura 27B).

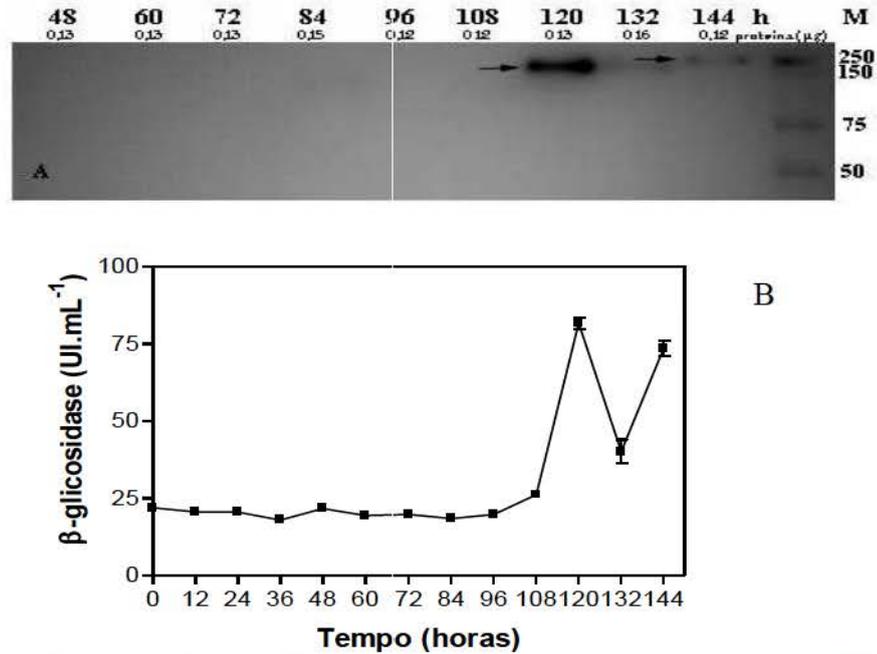


Figura 27. Atividade de β -glicosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de **glicerol** em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 200 μ L do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade β -glicosidásica do caldo enzimático sobre ρ NPG.

A partir do cultivo no qual foi utilizado sorbitol como substrato, pode-se observar a atividade de β -glicosidases com bandas de 224,10 kDa, em 96, 108 e 132 horas de cultivo (Figura 28A), sendo que a banda com maior intensidade foi detectada em 108 horas, o que pode ser comprovado com o gráfico de atividade enzimática, onde em 108 horas de cultivo obteve-se a máxima produção desta enzima (Figura 28).

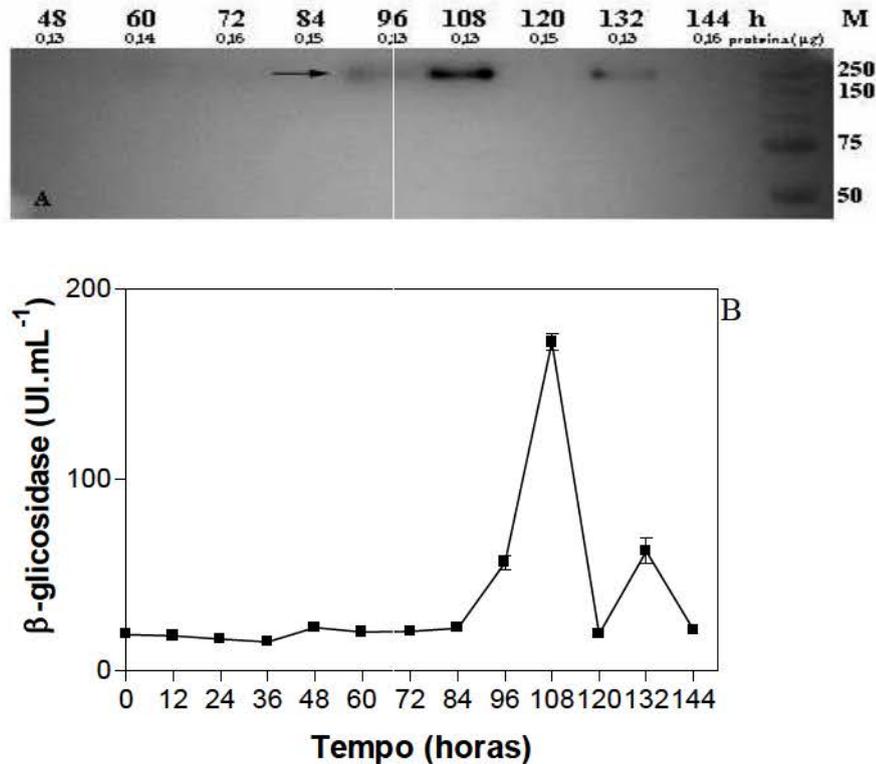


Figura 28. Atividade de β -glucosidases em gel e na mistura reacional do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em cultivos submersos, utilizando 1% de sorbitol em frascos mantidos sob agitação recíproca. A – Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 200 μ L do caldo enzimático. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tempo de cultivo em horas e a quantidade de proteína aplicada no gel em μ g. M – marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. B – gráfico da atividade β -glucosidásica do caldo enzimático sobre pNPG.

A partir dos resultados encontrados nos zimogramas para os diferentes meios de cultivo, fica evidente que a produção de β -glucosidases se acentua no final do processo de fermentação do fungo *P. echinulatum*, o que corresponde ao quinto e sexto dias de cultivo. Nas condições empregadas na realização deste experimento, independente da fonte de carbono utilizada para a produção enzimática sempre foi expressa uma banda de β -glucosidase em torno de 220 kDa, o que é indicativo de que esta trata-se de uma enzima que pode ser produzida mesmo na ausência de indutor, mas que pode ser aumentada quando o indutor está presente. Os meios formulados com celobiose e glicerol em que foram expressas enzimas de 146,95 kDa e 150,22 kDa, sugerem que diferentes genes ou a existência de diferentes modificações pós-traducionais envolvidos na

expressão desta enzima em *P. echinulatum*.

Os resultados dos ensaios descritos no presente trabalho indicam que ocorre secreção de celulasas, β -glicosidases e xilanases pela linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum*, embora em níveis muito distintos, em cultivos submersos, em meios formulados com celulose, carboximetilcelulose, celobiose, glicose, glicerol, sacarose e sorbitol.

A celulose, seguido da carboximetilcelulose, como esperado, foram as fontes que resultaram em maiores valores de atividade enzimática.

Para evitar interferências não utilizou-se os substratos complexos farelos de trigo ou soja, já descritos como aditivos para a secreção de celulasas em *P. echinulatum* (Dillon *et al.*, 2006). Esta seria a explicação dos valores de atividades de celulasas terem sido menores do que os encontrados na literatura. Entretanto não foi objetivo deste trabalho otimizar meios para a produção de enzimas. Sabe-se que a incorporação de resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, em meios para a produção de enzimas, ajuda a reduzir os custos de produção destes complexos enzimáticos capazes de hidrolisar fontes lignocelulósicas para a formação de xaropes fermentados, contribuindo assim para a produção viável de etanol de segunda geração (Camassola & Dillon, 2010). Os resultados obtidos no estudo realizado por Camassola & Dillon (2007b) estabelecem o potencial do *P. echinulatum* 9A02S1 para secreção de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases em fermentação em estado sólido, podendo substituir-se parcialmente o farelo de trigo por bagaço de cana-de-açúcar.

Verificou-se a presença de β -glicosidases com diferentes isoformas em estudos de géis de atividade em cultivos com glicerol e celobiose, que por sua vez não foram favoráveis para a produção de celulasas.

Salienta-se que no presente estudo constam os primeiros dados de atividade enzimática em

gel de poliacrilamida para as enzimas produzidas por *P. echinulatum*, constituindo-se em um passo importante para a realização de estudos de controle gênico.

5. CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos neste trabalho a partir das condições avaliadas permite concluir que:

- a linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* cresce em cultivos submersos com diferentes fontes de carbono (celulose, carboximetilcelulose, celobiose, glicose, sacarose, glicerol e sorbitol) e apresenta atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), endoglicanases, β -glicosidases e xilanases;

- o meio formulado com celulose produziu um caldo enzimático que apresentou as maiores atividades para todas as enzimas analisadas;

- celobiose, glicose, glicerol, sacarose e sorbitol não apresentaram efeito indutor para a produção de FPA, endoglicanases e xilanases;

- apesar do menor crescimento micelial apresentado no meio formulado com CMC, o caldo enzimático apresentou atividades relativamente elevadas de FPA, endoglicanases e xilanases, quando comparado com as demais fontes de carbono utilizadas, exceto a celulose;

- a queda do pH do caldo enzimático correlacionou-se com o aumento da massa fúngica, exceto para o meio formulado com CMC;

- β -glicosidases foram detectadas somente ao final do cultivo, com maiores atividades no meio com celulose, seguido por celobiose e glicose;

- os zimogramas para atividade de endoglicanases indicaram que esta enzima é minimamente secretada quando utilizado celobiose, glicose, sacarose e sorbitol como fonte de carbono;

- as múltiplas isoformas (6) detectadas no gel de atividade para endoglicanases a partir de 108 horas de cultivo nos meios contendo celulose e glicerol, sugerem a expressão de diferentes genes ou de modificações pós-traducionais;

- os zimogramas de atividade de β -glicosidases em todos os cultivos apresentaram bandas a partir de 108 horas, com a ocorrência constante de uma banda em torno de 220 kDa, enquanto que nos meios contendo celobiose e glicerol observaram-se 2 bandas de atividade.

- os dados obtidos neste trabalho contribuem para ampliar o conhecimento sobre a fisiologia da produção de celulasas e xilanases de *P. echinulatum*, e, ao mesmo tempo, possibilitam o planejamento de ações para otimização de processos de produção destas enzimas.

6. PERSPECTIVAS

Diante aos resultados obtidos torna-se necessário, para ampliar os conhecimentos em relação à expressão de enzimas do complexo celulásico e xilanásico:

- avaliar os perfis eletroforéticos de celobiohidrolases e xilanases;
- verificar o efeito de outras fontes de carbono tais como sofrorose, sorbose e gentiobiose para avaliação da produção enzimática;
- avaliar a produção de enzimas com misturas de fontes de carbono;
- sequenciar as proteínas a fim de verificar se as formas de menor massa molecular são oriundas de formas de maiores massas moleculares, especialmente no caso das endoglicanases.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão-Neto, J.; Rossini, C.H.; El-Gogari, S.; Henrique-Silva, F.; Crivelaro, O.; El-Dorry, H. (1995). Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Biochem.** 34: 10456-10462.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008). Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMS as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochem. Eng. J.** 42:41-46.
- Ahmed, S.; Bashir, A.; Saleem, H.; Saadia, M.; Jamil, A. (2009). Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pak. J. Bot.** 41(3):1411-1419.
- Alea, F.; Rodrigues, H.; Enríques, A. (1991). Selection of hypercellulolytic derepressed mutants of *Cellulomonas* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 35: 643-645.
- Allen, A.L.; Andreotti, R.E. (1982). Cellulase production in continuous and fed-batch culture by *Trichoderma reesei* MCG80. **Biotechnol. Bioeng.** 12: 451-456.
- Anish, R.; Suto, M.; Tomida, F. (2007). Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims. **Biotechnol. Bioeng.** 96: 48-56.
- Aro, N.; Saloheimo, A.; Ilmén, M.; Penttilä, M. (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.** 276: 24309-14.

- Bailey, M.J.; Tahtiharju, J. (2003). Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 62: 156-162.
- Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23:257-270.
- Banco Mundial (2008). Global financial & climate crises. **Disponível (online)** <http://web.worldbank.org/WBSITE/EXTERNAL/COUNTRIES/LACEXT/0,,contentMDK:22005179~pagePK:146736~piPK:146830~theSitePK:258554,00.html> (27 de Janeiro de 2009).
- Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 326-338.
- Beguin, P. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. **Ann. Rev. Microbiol.** 44: 219-248.
- Beldman, G.; Voragem, G.; Rombouts, F.M.; Searle-van Leeuwen, M.F.; Pilnik, W. (1987). Adsorption and kinetic behavior of purified endoglucanase and exoglucanase from *Trichoderma viride*. **Biotechnol. Bioeng.** 30:251-257.
- Behr, A.; Eilting, J.; Irawadi, K.; Leschinski, J.; Lindner, F. (2008). Improved utilisation renewable resources: New important derivatives of glycerol. **Green Chem.** 10-13.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.** 18: 355-383.
- Bhat, M.K.; Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol. Adv.** 15(3-4): 583-620.

- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol.** 3: 286-290.
- Bittencourt, L.R.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2002). Quantificação de massa celular de *Penicillium echinulatum* a partir do conteúdo de quitina hidrolisada enzimaticamente. In: VII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Resumos.** 209. Maringá, Paraná, Brasil.
- Blandino, A.; Iqbalsyah, T.; Pandiella, S.S.; Cantero, D.; Webb, C. (2002). Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58, 164–169.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** 8: 93-99.
- Botella, C.; Diaz, A.; Ory, I.; Webb, C.; Blandino, V. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochem.** 42: 98-101.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Camassola, M.; Bittencourt, L.R.; Sehnem, N.T.; Andreus, J.; Dillon, A.J.P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransfor.** 22: 391-6.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2010). Cellulases e xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162:1889-1900.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; (2007a). Effect of methylxanthines on production of cellulases by

Penicillium echinulatum. **J. Appl. Microbiol.** 102:478-485.

Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007b). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **J. Appl. Microbiol.** 103:2196-2204.

Cannel, E.; Moo-Young, M. (1980). Solid-state fermentation systems. **Process Biochem.** 28: 2-7.

Carlile, M.J.; Watkinson, S.C. (1997). **The fungi**. London: Academic Press, 460 p.

Carrau, J.L.; Dillon, A.J.P.; Ribeiro, R.T.S.; Leygue-Alba, N.M.R.; Azevedo, J.L. (1981). Produção de enzimas celulolíticas por microrganismos. In: Simpósio Internacioanl de Engenharia Genética. **Anais.** 39:205-210.

Carvalho, E. (2005). Potencial de mercados para o etanol. **Disponível (online)** http://www.aea.org.br/docs/seminários_2005/comvustiveis/01_Eduardo_de_Carvalho.pdf (29 de Janeiro de 2009).

Chahal, D.S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 205-10.

Cheng, Y.; Song, X.; Qin, Y.; Qu, Y. (2009). Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10. **J. Appl. Microbiol.** 107:1837-1846.

Collins, T.; Hoyoux, A.; Dutron, A.; Georis, J.; Genot, B.; Dauvrin, T.; Arnaut, F.; Gerday, C.; Feller G. (2006). Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **J. Cereal. Sci.** 43: 79-84.

Considine, P.J.; Hackett, T.J.; Coughlan, M.P. (1987). Solid-state cultivation of cultivation of

Penicillium capsulatum on beet pulp. **Biotechnol. Lett.** 9: 131-134.

Coughlan, M.P.; Hazlewood, G. (1993). β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17: 259-289.

Damaso, M.C.T.; Andrade, C.M.M.C.; Pereira Jr, N. (2002). Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lamuginosus* IOC-4145. **Braz. J. Microbiol.** 33: 333-338.

Daroit, D.J.; Simonetti, A.; Hertz, P.F.; Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18(5):933-941.

Dasari, M.A.; Kiatsimkul, P.P.; Sutterlin, W.R. (2005). Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Suppes Appl. Catal. A: Gen.** 281:225-231.

Datagro (2005). **Disponível (online)** http://www.datagro.com.br/r_home.php. (19 de Janeiro de 2009).

Dillon, A.J.P.; Paesi-Toresan, S.; Barp, L.B. (1992). Isolation of cellulase - producing mutants from *Penicillium* sp. strains denominated 3MUV3424. **Rev. Bras. Gen.** 15: 491-8.

Dillon, A.J.P. (2004a). Celulases. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Editado por Said, S.; Pietro, R.C.L.R. **Editora Legis Summa**, 243-269.

Dillon, A.J.P. (2004b). Aspectos da secreção de celulases em *Penicillium echinulatum*. In: VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC). **Anais.** 69. Rio de Janeiro.

Dillon, A.J.P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J.A.P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid

media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and b-glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 270: 740-6.

Domingues, F.C.; Queiroz, J.A.; Cabral, J.M.S.; Fonseca, L.P. (2001). Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnol. Lett.** 23: 771-775.

Durand, H.; Clanet, M.; Tiraby, G. (1988). Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. **Enzyme Microb. Technol.** 10: 341-346.

Eberhart, B.M.; Beek, R.S.; Goolsby, K.M. (1977). Cellulose of *Neurospora crassa*. **J Microbiol** 130:181-186.

El-Gogary, S.; Leite, A.; Crivellara, O.; Eveleigh, E.; El-Dorry, H. (1989). Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. **Proc. Nath. Acad. Sci. USA.** 86:6138-6141.

El-Hawary, F.I.; Mostafa, Y.S. (2001). Cellulase production and conversion of rice straw to lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. **Acta. Alimentaria.** 30: 281-295.

Escobar, J.C.; Lora, E.S.; Venturini, O.J.; Yáñez, E.E.; Castilho, E.F.; Almazan, O. (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. **Renew. Sust. Energy Rev.** 13: 1275-1287.

Fan, L.T.; Lee, Y-H.; Beardmore, D.H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** XXII: 177-199.

Foyle, T.; Jennings, L.; Mulcahy, P. (2007). Compositional analysis of lignocellulosic materials:

evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. **Bioresource. Technol.** 98: 3026-36.

Fowler, T. (1993). Deletion of the *Trichoderma reesei* b-glucosidase gene, bgII. In: Esen, A. (Ed.), b-Glucosidase, Biochemistry, and Molecular Biology. **American Chemical Society**, Washington, DC, USA. 56-65.

Fritscher, C. Messner, R. Kubicek, C.P. (1990). Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*. **Exp. Mycol.** 14: 405-415.

Gazzoni, D.L. (2006). Álcool – etanol brasileiro. **Disponível (online)** <http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.html>. (20 de Janeiro de 2009).

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure. Appl. Chem.** 59: 257-268.

Gong, C.S.; Ladisch, M.R.; Tsao, G.T. (1979). Biosynthesis, purification and mode of action of cellulases of *Trichoderma reesei*. **Adv. Chem. Ser.** 181:261–288.

Grad, P. (2006). Biofuelling Brazil: An overview of the bioethanol success story in Brazil. **Biofuels** 7 (3), 56–59.

Gritzali, M.; Brown, R.D. Jr. (1979). The cellulase system of *Trichoderma*: relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. **Adv. Chem. Ser.** 181:237–260.

Gusakov, A.V.; Salanovich, T.N.; Antonov, A.I.; Ustinov, B.B.; Okunev, O.N.; Burlingame, R.; Emalfarb, M.; Baez, M.; Sinistyn, A.P. (2007). Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 97: 1028-38.

- Haltrich, D.; Nidetzky, B.; Kulbe, K.D.; Steiner, W.; Zupancic, S. (1996). Production of fungal xylanases. **Bioresour. Technol.** 58:137-161.
- Harikrishna, S.; Rao, K.C.S; Babu, J.S.; Reddy, D.S. (2000). Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM9414. **Bioprocess. Eng.** 22: 467-470.
- Hendy, N.A.; Wilke, C.R.; Blanch, H.W. (1984). Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 73-77.
- Henrique-Silva, F.; El-Gogary, S.; Carle-Urioste, E.; Matheucci, J.R.; Crivellaro, O.; El-Dorry, H. (1996). Two regulatory regions controlling basal cellulose induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are adjacent to its TATA box. **Biochem. Bioph. Res. Commun.** 228: 229-37.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 280:309-316.
- Hesseltine, C.W. (1972). Solid state fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 14: 517-532.
- Himmel, M.E.; Ruth, M.F.; Wyman, C.E. (1999). Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 358-64.
- Holtzapple, M.; Cognata, M.; Shu, Y.; Hendrickson, C. (1990). Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnol. Bioeng.** 36:275-87.
- Hrmova, M.; Petrakova, E.; Biely, P. (1991). Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homoand hetero-disaccharides composed of glucose and xylose. **J. Gen. Microbiol.** 137: 541-547.

- Ilmén, M.; Saloheimo, A.; Onnela, M.L.; Penttillä, M.E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1298-1306.
- Ilmén, M.; Thrane, C.; Penttillä, M.E. (1996). The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: isolation and repression of a full-length and a truncated mutant form. **Mol. Gen. Genet.** 251: 451-460.
- Joglekar, A.V.; Karanth, N.G. (1984). Studies on cellulases production by mutant *Penicillium funiculosum*. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 1079-1084.
- Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F. and Olsson, L. (2003). Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme Microbial. Technol.** 32: 851-861.
- Jørgensen, H.; Mørkeberg, A.; Krogh, K.B.R.; Olsson, L. (2004) Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. *Journal of Biotechnology* 109: 295–299
- Juhász .T.; Egyházi, A.; Réczey, K. (2005). beta-Glucosidase production by *Trichoderma reesei*. **Appl Biochem. Biotechnol.** 121–124:243–54.
- Kadowaki, M.K.; Souza, C.G.M.; Simão, R.C.G.; Peralta, R.M. (1997). Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 66: 97-106.
- Kalra, M.K.; Sidhu, M.S.; Sandhu, D.K.; Sandhu, R.S. (1984). Production and regulation of cellulases in *Trichoderma reesei*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 20:427–429.
- Karinen, R.S.; Krause, A.O.I. (2006). Gen. **Appl. Catal.** 306, 128.

- Kleman-Leyer, K.M.; Siika-Aho, M.; Teeri, T.T.; Kirk, T.K. (1996). The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. **Appl. Environ. Microbiol.** 62(8):2883-2887.
- Klepacova, K.; Mravec, D.; Hajekova, E.; Bajus, M. (2003). **Petroleum and Coal.** 45-54.
- Kubicek, C.P. (1993). From cellulose to cellulase inducers: facts and fiction, p. 181–188. In P. Suominen and T. Reinikainen (ed.), Proceedings of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, Finland.
- Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.; Kubicek-Pranz, E.M. (1993). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 90-99.
- Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 23: 411-456.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. **Nature** 227: 680-685.
- Lal, T. (2008). Crop residues as soil amendments and feedstock for bioethanol production. **Waste Manag.** 28: 747-58.
- Lawford, H.G.; Rousseau, J.D. (2003). Cellulosic fuel ethanol - alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 105:457–69.

- Lin, J.Q.; Lee, S.M.; Koo, Y.M. (2000). Modeling of typical microbial cell growth in batch culture. **Biotechnol. Bioprocess. Eng.** 5:382–5.
- Lin, S.F.; Hu, H.M.; Inukai, T.; Tsai, Y.C. (1993). Solid state fermentation: Acid protease production in controlled CO₂ e O₂ environments. **Biotechnol. Adv.** 11: 417-427.
- Liu, W.; Lu, Y.; Ma, G. (1999). Induction and glucose repression o fendo-β-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process. Biochem.** 34:67-72.
- Lynd, L.R., Laser, M.S., Bransby, D., Dale, B.E., Davison, B., Hamilton, R., Himmel, M., Keller, M., McMillan, J.D., Sheehan, J., Wyman, C.E., (2008). How biotech can transform biofuels. **Nat. Biotechnol.** 26, 169–172.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; van Lyl, W.H.; Pretorius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol.** 66:506-577.
- Lynd, L.R.; Zhang, Y. (2002). Quantitative determination of cellulose concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnol. Bioeng.** 77(4):467-475.
- Mach, R.L.; Zeilinger, S. (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60:515-522.
- Mach, R.L.; Strauss, J.; Zeilinger, S.; Schindler, M.; Kubicek, C.P. (1996). Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*. **Mol. Microbiol.** 21(6):1273-1281.

- Macris, B.J.; Kekos, D.; Evangelidou, E. (1989). A simple and inexpensive method for cellulose and β -glucosidase production by *Neurospora crassa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol** 31:150–151.
- Madlala, A.M.; Bissoon, S; Singh, S.; Christov, L. (2001). Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. **Biotechnol. Lett.** 23: 345-351.
- Magnelli, P.; Forchiassin, F. (1999). Regulation of the cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides*: induction and repression by carbohydrates. **Mycol.** 91: 359-364.
- Mandels, M. (1975). Cellulose as a chemical and energy resource. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 5 - 81.
- Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 6: 21-33.
- Mandels, M.; Parrish, F.W.; Reese, E.T. (1962). Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **J. Bacteriol.** 83: 400-408.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1960). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **J. Bacteriol.** 79:816–826.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1956). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-78.
- Mandels, M.; Weber, J. (1969). The production of cellulases. **Adv. Chem. Ser.** 95: 391-414.
- MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2006). **Disponível (online)**. http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/PLANOS/PNA_2006_2011/PLAN

O%20NACIONAL%20DE%20AGROENERGIA%202006%20-%202011-
%20PORTUGUES.PDF (30 de março de 2010).

- Margolles-Clark, E.; Ilmén, M.; Penttilä, M. (1997). Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **J. Biotechnol.** 57: 167-179.
- Martinez, D. *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocres jecorina*). **Nat. Biotechnol.** 26(5):555-560.
- Martins, L.F.; Camassola, M., Dillon, A.J.; Ramos, L.P. (2005). Perfil hidrolítico das celulases de *Penicillium echinulatum*. **SINAFERM: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos.**
- Martins, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. (2008). Comparison between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.** 99: 1417-1424.
- McCleary, B.V. (1986). Enzymatic modification of plant polysaccharides. **Int. J. Biol. Macromol.** 8: 349-354.
- Medve, J.; Stahlberg, J.; Tjerneld, F. (1997). Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 66(1):39–56.
- Menegol, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2010). Hidrólise enzimática de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) por complexos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* visando a produção de etanol. IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC). **Anais.** 108. Rio de Janeiro.

- Menon, K.; Rao, K.K.; Pushalkar, S. (1994). Production of β -glucosidase by *Penicillium rubrum* O stall. **Indian. J. Exp. Biol.** 32:706–709.
- Messner, R.; Kubicek, C.P. (1991). Carbon Source control of cellobiohydrolase I and II formation by *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.** 57(3):630-635.
- Miettinen-Oinonen, A. (2004). *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. **Disponível (online)** <http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2004/P550.pdf>. (20 de Maio de 2010).
- Miettinen-Oinonen, A.; Suominen, P. (2002). Production of *Trichoderma reesei*. endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 3956-64.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31, 426–428.
- Morikawa, Y.; Ohashi, T.; Mantani, O.; Okada, H. (1995). Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44:106-111.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Mukhopadhyey, S.; Nandi, B. (1999). Optimization of cellulose production by *Trichoderma reesei* ATCC 26921 using a simpliWed medium on water hyacinth biomass. **J. Sci. Ind. Res.** 58:107–111.

- Muthuvelayudham, R.; Viruthagiri, T.; Selvapandian, T. (2005). Biosynthesis of cellulase protein on substrates like cellulose, xylose and lactose using *Trichoderma reesei*. **J. Eng. Technol.** 118-121.
- Nigam, P.; Singh, D. (1994). Solid-state substrate fermentation systems and their applications in biotechnology. **J. Basic. Microbiol.** 34: 405–423.
- Nisizawa, T.; Suzuki, H.; Nakayama, M.; Nisizawa, K. (1971). Inductive formation of cellulase by sophorose in *Trichoderma viride*. **J. Biochem.** 70:375–385.
- Nogawa, M.; Goto, M.; Okada, H.; Morikawa, Y. (2001). L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. **Curr. Genet.** 38: 329-334.
- Olsson, L.; Christensen, T.M.I.E.; Hansen, K.P.; Palmqvist, E.A. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 612-619.
- Pardo, A.G.; Forchiassin, F. (1999). Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in *Nectria catalinensis*. **Ver. Argent. Microbiol.** 31:31–35.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; De-la-Rubia, T.; Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.** 5:53–63.
- Petkowicz, C.L.O. *et al.* (2007). Bioquímica: aulas práticas. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. 7ed. Curitiba Ed. UFPR.
- Petruccioli, M.; Piccioni, P.; Federici, F.; Polsinelli, M. (1995). Glucose oxidase overproducing mutantas of *Penicillium variable* (P16). **FEMS Microbiol. Lett.** 128:107-111.

- Punt, P.J.; van Biezen, N.; Conesa, A.; Albers, A.; Mangnus, J.; van den Hondel, C.A. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends. Biotechnol.** 20:200–6.
- Rajendran, A.; Gunasekaran, P.; Lakshmanan, M. (1994). Cellulase activity of *Humicola fuscoatra*. **Indian. J. Microbiol.** 34:289–295
- Ramos, L.P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova.** 26: 863-871.
- Rashid, M.H.; Rajoka, M.I.; Siddiqui, K.S.; Shakoori, A.R. (1997). Kinetic properties of chemically modified b-glucosidase from *Aspergillus niger* 280. **Pak. J. Zool.** 29: 354-363.
- Reese, E.T.; Maguire, A. (1969). Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. **Appl. Microbiol.** 17: 242-245.
- Rigon, L.; Vencato, A.; Corrêa, S.; Reetz, E.; Rosa, G. R.; Beling, R.R. (2007). Com a mão na biomassa. **An. Bras. Agroenerg.** 10-54.
- Romio, T.; Dillon, A.J.P. (2006). Avaliação da produção de celulasas em *Penicillium echinulatum* sob efeito de polipropilenoglicol e Tween 80. In: XIV Encontro de Jovens Pesquisadores. **Resumo.** Caxias do Sul, 2006.
- Royer, J.C.; Nakas, J.P. (1990). Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56:2535–2539.

- Rubini, M.R.; Dillon, A.J.P.; Kyaw, C.M.; Faria, F.P.; Poças-Fonseca, M.J.; Silva-Pereira, I. (2009). Cloning, characterization and heterologous expression of the first *Penicillium echinulatum* cellulase gene. **J. Appl. Microbiol.** 108(4):1187-1198.
- Ryu, D.Y.; Mandels, M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme Microb. Technol.** 2: 91-102.
- Sa-Pereira, P., Sofia, A., Carvalho Costa-Ferreira, L.M. (2004); Thermostabilization of *Bacillus subtilis* CCM1. **Enzyme Microbiol. Technol.** 34:278-282.
- Saha, B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microb. Biotechnol.** 30:279-291.
- Said, S.; Pietro, R. (2002). Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. **Ed. Eventos.** p.35-36.
- Saloheimo, A.; Aro, N.; Ilmén, M.; Penttilä, M. (2000). Isolation of *ace1* gene encoding a Cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.** 275: 5817-5825.
- Saloheimo, M.; Kuja-Panula, J.; Ward, M.; Penttilä, M. (2002). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -Glucosidase BGLII (CellA). **Appl. Environ. Microbiol.** 68:4546-4563.
- Sandgren, M.; Sahlberg, J.; Mitchinson, C. (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved stability, and ligand complexes. **Prog. Bioph. Mol. Biol.** 89:246-291.
- Schulein, M. (1998). Kinetics of fungal cellulases. **Biochem Soc Trans.** 26:164-167.
- Sehnm, N.; Bittencourt, L.R.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 163–167.

- Seyis, I.; Aksoz, N. (2005). Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 55:115-119.
- Schmoll, M.; Kubicek, C.P. (2003). Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.** 50, 125–145.
- Schwarz, W.H.; Bronnenmeier, K.; Grabnitz, F.; Staudenbauer, W.L. (1987). Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage -glucans. **Anal. Biochem.** 164:72–77.
- Shen, H.; Byers, L.D. (2007). Thioglycoside hydrolysis catalyzed by beta-glucosidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 362(3):717–720.
- Silva, R., Gomes, E. (2004). Ligninases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Editores). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa. pp. 349-379.
- Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Soccol, A.R.; Panday, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 44:13-18.
- Smits, J.P.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Van Sonsbeek, H.M.; Kno1, W. (1996). Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM 9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 46: 489-496.
- Steiner, J.; Saccha, C.; Enzyguirre, J. (1993). Culture condition for enhanced cellulose production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. **World. J. Microbiol. Biotechnol.** 10:280–284.
- Sternberg, D.; Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.

- Stewart, B.J.; Leatherwood, J.M. (1976). Depressed synthesis of cellulases by *Cellulomonas*. **J. Bacteriol.** 128: 609-615.
- Suchita, N., Mukesh, K. Ramesh, C.K. (2007). Purification and characterization of extracellular xylanses from *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresour. Technol.** 99(5):1252-1258.
- Sun, S.; Ziyong, L.; Kai, Z.; Xin, S.; Yinbo, Q. (2008). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. **Enzyme Microb. Technol.** 42: 560-567.
- Suto, M.; Tomita, F. (2001). Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 305-311.
- Takao, S.; Kamagata, Y.; Sasaki, H. (1985). Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. **J. Ferment. Technol.** 63: 127-134.
- Tangu, S.K.; Blanch, H.W.; Charles R.; Wilke, C.R. (1981). Enhanced production of cellulases, hemicellulase, and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). **Biotechnol. Bioeng.** 23: 1837-1849.
- Teeri, T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Tibtech.** 15:160-167.
- Tengerdy, R. P. (1985). Solid substrate fermentation. **Trends Biotechnol.** 3: 96-99.
- Terrasan, C.R.; Temer, B.; Duarte, M.C.T.; Carmona, E.C. (2010). Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresour. Technol.** 101:4139–4143.
- Todd, R.B.; Andrianopoulos, A.; Davis, M.A.; Hynes, M.J. (1998). FacB, the *Aspergillus nidulans*

activator of acetate utilization genes binds dissimilar DNA sequence. **EMBO J.** 17:2043-2054.

Tolan, J.S.; Foody, B. (1999). Cellulase from submerged fermentation. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 65:41–67.

Torigoi, E.; Henrique-Silva, F.; Escobar-Vera, J.; Carle-Urioste, C.; Crivellaro, O.; El-Dorry, H.; El-Gogary, S. (1996). Mutants of *Trichoderma reesei* are defective in cellulose induction, but not basal expression of cellulase-encoding genes. **Gene.** 173: 199-203.

Vaheri, M.P.; Leisola, M.; Kauppinen, V. (1979a). Transglycosilation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei*. **Biotechnol. Lett.** 1: 41-46.

Vaheri, M.P.; Vaheri, M.E.O.; Kauppinen, V.S. (1979b). Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 8:73–80

Wang, S.L., Yen, Y.H., Shih, I.L., Chang, A.C. (2003) Production of xylanases from Rice bran by *Streptomycetes actuosus* A-151. **Enzyme Microbiol. Technol.** 33:917-925.

Wheals, A.E.; Bassoc, L.C.; Alves, D.M.G.; Amorim, H.V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol.** 17 (12), 482–487.

Wilkins, M.R.; Widmer, W.W.; Grohmann, K. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. **Process. Biochem.** 42: 1614-9.

WWF – Emerging economies also emerging leaders in effective climate action. (2010). **Disponível (online)**<http://wwf.panda.org/?197147/Emerging-economies-also-emerging-leaders-in-effective-climate-action> (26 de novembro de 2010).

- Wyman, C.E. (2007). What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends Biotechnol.** 25, 153–157.
- Xiong, H.; Weymarn, N.; Turunen, O.; Leisola, M.; Pastinen, O. (2005). Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. **Bioresour. Technol.** 96: 753-759.
- Xiong, H., Weymarn, N., von Leisola, M. Turunen O. (2004). Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochem.** 39:731-736.
- Xuan, J.; Leung, M.K.H.; Leung, D.Y.C.; Ni, M. (2009). A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. **Renew. Sust. Energy Rev.** 13: 1301-1013.
- Yinbo, Q.; Zhu, M.; Liu, K.; Bao, X.; Lin, J. (2006). Studies on cellulosic ethanol production for sustainable supply of liquid fuel in China. **J. Biotechnol.** 1: 1235-1240.
- Zaldivar, M.; Velasquez, J.C.; Contreras, I.; Perez, L.M. (2001). *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potencial use in vaste cellulose degradation and/or biocontrol. **Eletronic. J. Biotechnol.**1-7.