

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

Expressão gênica e atividades de celulasas, β -glicosidases, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29

DENISE ZAMPIERI

Caxias do Sul
2015

DENISE ZAMPIERI

Expressão gênica e atividades de celulases, β -glicosidases, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Caxias do Sul
2015

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

Z26e Zampieri, Denise, 1981-
Expressão gênica e atividades de celulases, β -glicosidases, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29 / Denise Zampieri. – 2015.
129 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.
Orientadores: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon, Profa. Dra. Marli Camassola.

1. *Penicillium*. 2. Regulação de expressão gênica. 3. Celulases. 4. Enzimas. 5. Xilanases. I. Título.

CDU 2. ed.: 582.282.123.2

Índice para o catálogo sistemático:

1. <i>Penicillium</i>	582.282.123.2
2. Regulação de expressão gênica	601.4:577.213.3/.7
3. Celulase	547.458.8
4. Enzimas	577.15
5. Xilanases	547.455.526

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

DENISE ZAMPIERI

EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADES DE CELULASES, β -GLICOSIDASES, XILANASES E SWOLENINAS DE *Penicillium echinulatum* S1M29

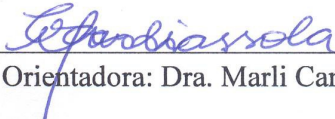
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores: Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Dra. Marli Camassola

TESE APROVADA EM 06 DE AGOSTO DE 2015.



Orientador: Dr. Aldo José Pinheiro Dillon



Orientadora: Dra. Marli Camassola



Dra. Elba Pinto da Silva Bon



Dr. Marco Antônio Záchia Ayub



Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna

“Os ventos que às vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar...

Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado.

Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre...”

(Bob Marley)

Dedico este trabalho aos meus amáveis pais Celestino e Ione, aos meus carinhosos irmãos Andressa e Jeison e ao meu querido Roger 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, confiança depositada e conhecimento compartilhado;
- aos professores da banca de acompanhamento Dr. Sérgio Echeverrigaray, Dra. Mariana Roesch-Ely e Dra. Eloane Malvessi;
- 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 às estagiárias Luísa C. Nora e Vanessa Basso que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho;
- aos amigos de longa data que estiveram sempre ao meu lado;
- aos meus pais Celestino e Ione Zampieri pela confiança depositados em mim. Aos meus irmãos Andressa e Jeison por apoiar minhas decisões. Ao meu querido Roger, por fazer a diferença nesta etapa final estando sempre ao meu lado;
- ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em especial aos Drs. Márcio J. Poças Fonseca, Ildinete S. Pereira e Marciano R. Rubini, pelo auxílio na definição da metodologia molecular deste trabalho;
- ao apoio estrutural e financeiro da UCS e CNPq.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE QUADROS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
NOMENCLATURA	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Biomassa lignocelulósica	3
2.2 Enzimas lignocelulolíticas	7
2.2.1 Celulases	7
2.2.2 Xilanases	10
2.2.3 Oxidases	12
2.3 Swoleninas	13
2.4 <i>Penicillium echinulatum</i>	13
2.5 Produção de enzimas do complexo celulósico	16
2.6 Expressão de genes para celulases, β -glicosidases, xilanases e swoleninas	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Linhagem	24
3.2 Crescimento e manutenção da linhagem fúngica	24
3.3 Condições de cultivo e produção proteica	24
3.4 Caracterização dos materiais celulósicos	25
3.4.1 Determinação do teor de cinzas	25
3.4.2 Determinação dos compostos extraíveis	26
3.4.3 Análise química dos substratos celulósicos	26
3.5 Determinação do crescimento fúngico	27
3.6 Determinação das proteínas solúveis	27
3.7 Determinação de atividades enzimáticas	28
3.7.1 Determinação de <i>filter paper activity</i>	28
3.7.2 Determinação de endoglicanases	29

3.7.3 Determinação de celobiohidrolases	29
3.7.4 Determinação de β -glicosidases	29
3.7.5 Determinação de xilanases	30
3.8 Perfil eletroforético das proteínas extracelulares	30
3.9 Zimogramas	31
3.9.1 Zimograma para endoglicanases	31
3.9.2 Zimograma para celobiohidrolases	32
3.9.3 Zimograma para β -glicosidases	32
3.9.4 Zimograma para xilanases	33
3.10 Estudos Moleculares	33
3.10.1 Extrações e preparações de RNAs de <i>Penicillium echinulatum</i> para estudo de expressão gênica	34
3.10.2 Obtenção de cDNA	35
3.10.3 <i>Real Time</i> (qRT-PCR)	35
3.10.3.1 Validação de genes normalizadores	35
3.10.3.2 Expressão de celulases, β -glicosidase, xilanase e swolenina	37
3.11 Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Caracterização dos materiais celulósicos	40
4.2 Crescimento fúngico	41
4.3 Determinação das proteínas solúveis secretadas por <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em cultivos submersos	44
4.4 Atividades enzimáticas de celulases, β -glicosidases e xilanases de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em cultivos submersos	44
4.5 SDS-PAGE das proteínas e zimogramas para endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases de caldos enzimáticos produzidos por <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em cultivos submersos	52
4.6 qRT-PCR	62
4.6.1 Validação de genes normalizadores	63
4.6.2 Expressão de genes de endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases, xilanases e swolenina de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 a partir de cultivos submersos	67
5. CONCLUSÕES	87

6. PERSPECTIVAS	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO 1 Artigo publicado	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de compostos obtidos na caracterização da celulose Celufloc E [®] e do BCA.	41
Tabela 2. Atividades específicas de FPA, endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases dos pontos de maior secreção enzimática, obtidas a partir dos caldos produzidos em meios formulados por celulose Celufloc E [®] , BCA ou glicose.	52
Tabela 3. Quantidade de proteínas utilizadas na realização das eletroforeses em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E [®] , BCA e glicose.	53
Tabela 4. Quantidades de proteínas utilizadas na realização de zimogramas para atividade de endoglicanases em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E [®] , BCA e glicose.	55
Tabela 5. Quantidades de proteínas utilizadas na realização de zimogramas para atividade de celobiohidrolases em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E [®] , BCA e glicose.	57
Tabela 6. Quantidades de proteínas utilizadas na realização de zimogramas para atividade de β -glicosidases em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E [®] , BCA e glicose.	59
Tabela 7. Quantidades de proteínas utilizadas na realização de zimogramas para atividade de xilanases em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E [®] , BCA e glicose.	61
Tabela 8. Genes candidatos a controle interno e os respectivos valores de eficiência calculados a partir de curva de calibração realizada com diluições seriadas da amostra de cDNA.	64
Tabela 9. Estatística descritiva de dois genes candidatos a controle interno com base em seus valores de Cq e resultados obtidos com o uso do <i>software BestKeeper</i> .	65
Tabela 10. Candidatos a gene-referência analisados a partir de diferentes cultivos de <i>Penicillium echinulatum</i> e ranqueados de acordo com o valor de estabilidade (M) pelo <i>software geNorm</i> .	66
Tabela 11. Valores de eficiência calculados a partir de curva de calibração realizada com diluição seriada da amostra de cDNA para os genes de endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases, xilanases e swolenina.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Propriedades das celulasas produzidas pelo <i>Trichoderma reesei</i> .	20
Quadro 2. Composição da reação de PCR para a verificação da pureza da amostra de RNA.	34
Quadro 3. Relação dos <i>primers</i> para os genes candidatos a controle interno.	37
Quadro 4. Relação dos <i>primers</i> utilizados no estudo da expressão gênica na reação de qRT-PCR.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura lignocelulósica evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose.	4
Figura 2. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose.	5
Figura 3. Estrutura da celulose indicando a região cristalina e amorfa.	5
Figura 4. Ação das enzimas celulolíticas e da swolenina.	9
Figura 5. Estrutura da xilana e os sítios de ação das enzimas do complexo xilanase.	12
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do micélio da linhagem 9A02S1 de <i>Penicillium echinulatum</i> .	14
Figura 7. Modelo de indução de celulases em <i>Penicillium purpurogenum</i> .	18
Figura 8. Representação esquemática dos fatores de transcrição na regulação da expressão de genes de celulases e xilanases.	19
Figura 9. Fluxograma representando a metodologia empregada na análise de expressão gênica da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> .	33
Figura 10. Concentração da massa micelial de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em cultivos submersos utilizando diferentes fontes de carbono como substrato, obtido através da hidrólise enzimática da quitina da parede celular.	42
Figura 11. Variação dos valores de pH ao longo do cultivo de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 com diferentes fontes de carbono.	42
Figura 12. Avaliação das amostras do caldo de cultivo por HPLC, produzido por <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em meios formulados com (A) celulose Celufloc E [®] , (B) BCA e (C) glicose nos tempos 0 e 12 h.	43
Figura 13. Concentração das proteínas solúveis nos caldos enzimáticos produzidos por <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em cultivos submersos utilizando diferentes fontes de carbono como substrato.	44
Figura 14. Atividades sobre papel filtro (FPA) determinadas a partir de cultivos submersos de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca.	45
Figura 15. Atividades de endoglicanases determinadas a partir de cultivos submersos de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca.	46
Figura 16. Atividades celobiohidrolases determinadas a partir de cultivos submersos de	47

Penicillium echinulatum 9A02S1 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca.

Figura 17. Atividades de β -glicosidases determinadas a partir de cultivos submersos de *Penicillium echinulatum* S1M29 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca. 47

Figura 18. Atividades de xilanases determinadas a partir de cultivos submersos de *Penicillium echinulatum* S1M29 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca. 48

Figura 19. Atividades enzimáticas de FPA, endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases em relação ao crescimento micelial obtido em cultivos submersos em meios formulados com celulose como fonte de carbono para o desenvolvimento do *Penicillium echinulatum* S1M29. 49

Figura 20. Atividades enzimáticas de FPA, endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases em relação ao crescimento micelial obtido em cultivos submersos em meios formulados com BCA como fonte de carbono para o desenvolvimento do *Penicillium echinulatum* S1M29. 50

Figura 21. Atividades enzimáticas de FPA, endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases em relação ao crescimento micelial obtido em cultivos submersos em meios formulados com glicose como fonte de carbono para o desenvolvimento do *Penicillium echinulatum* S1M29. 51

Figura 22. Perfil das proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir do caldo enzimático de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso, utilizando: A – celulose Celufloc E[®] (200 μ L), B – BCA (200 μ L) e C – glicose (300 μ L) como fonte de carbono. 54

Figura 23. Perfil da atividade de endoglicanases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso, utilizando: A – celulose Celufloc E[®] (2 μ L), B – BCA (2 μ L) e C – glicose (10 μ L) como fonte de carbono. 56

Figura 24. Perfil da atividade de celobiohidrolases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir da precipitação do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso, utilizando: A – celulose Celufloc E[®] (100 μ L), B – BCA (100 μ L) e C – glicose (100 μ L) como fonte de 58

carbono.

Figura 25. Perfil da atividade de β -glicosidases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir da precipitação do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso, utilizando: A – celulose Celufloc E[®] (400 μ L), B – BCA (200 μ L), C – glicose (200 μ L) como fonte de carbono. 60

Figura 26. Perfil da atividade de xilanases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso, utilizando: A - celulose Celufloc E[®] (50 μ L) e B – BCA (10 μ L) como fonte de carbono. 62

Figura 27. Curvas de dissociação dos *primers* para os genes (A) *actb*, (B) *tf*, (C) *tub* e (D) *g3* obtidas a partir das amostras de micélio cultivado em meio constituído por celulose Celufloc E[®], BCA ou glicose em diferentes tempos de cultivo. 63

Figura 28. Curva de calibração dos *primers* para os genes: *actb* (A), *tf* (B), *tub* (C) e *g3* (D), obtida a partir de diluição seriada da amostra de cDNA. 64

Figura 29. Valores decrescentes de estabilidade dos candidatos a gene-referência para o estudo da expressão gênica de *Penicillium echinulatum* estimado pelo software geNorm. 66

Figura 30. Curvas de dissociação dos primer para os genes (A) *egl1*, (B) *egl2*, (C) *egl3*, (D) *egl4*, (E) *cbh1*, (F) *bgl1*, (G) *xyll* e (H) *swol*. 68

Figura 31. Curva de calibração dos primers para os genes: (A) *egl*, (B) *egl2*, (C) *egl3*, (D) *egl4*, (E) *cbh1*, (F) *bgl1*, (G) *xyll* e (H) *swol*, obtida a partir de diluição seriada da amostra de cDNA. 69

Figura 32. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *egl1* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose. 71

Figura 33. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *egl2* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose. 73

Figura 34. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *egl3* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose. 74

Figura 35. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *egl4* de *Penicillium* 75

echinulatum por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E®, (B) BCA e (C) glicose.

Figura 36. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *cbh1* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E® e (B) BCA. 77

Figura 37. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *bgl1* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E®, (B) BCA e (C) glicose. 79

Figura 38. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *xy11* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E® e (B) BCA. 81

Figura 39. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *swol* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E®, (B) BCA e (C) glicose. 82

Figura 40. Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes de *Penicillium echinulatum* estudados por qRT-PCR obtidos a partir de cultivos em meio formulado com celulose Celufloc E® em diferentes tempos de indução. 84

Figura 41. Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes de *Penicillium echinulatum* estudados por qRT-PCR obtidos a partir de cultivos em meio formulado com BCA em diferentes tempos de indução. 84

Figura 42. Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes de *Penicillium echinulatum* estudados por qRT-PCR obtidos a partir de cultivos em meio formulado com glicose em diferentes tempos. 85

NOMENCLATURA

- ACE – ativador da expressão de celulases
- BCA – bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor
- BGL – β -glicosidase
- CBH – celobiohidrolase
- CMC – carboximetilcelulose
- CMCase – carboximetilcelulase
- Cq – ciclo de quantificação
- CRE – elemento de repressão catabólica
- DEPC – dietilpirocarbonato
- DNS – ácido 3,5-dinitrossalicílico
- EG – endoglicanase
- FPA – filter paper activity
- GH – glicosil hidrolase
- MS – meio de saís
- MUC – metilumbeliferil- β -D-celobiosídeo
- NCBI – National Center for Biotechnology Information
- ND – não determinado
- NREL – National Renewable Energy Laboratory
- p*NPC – *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo
- p*NPG – *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
- VBA – aplicação básica visual
- XYR – regulador de xilanase

RESUMO

A linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* é um fungo filamentososo cujo sistema celulolítico tem potencial para aplicação em processos de degradação de materiais lignocelulósicos visando a obtenção de produtos com interesse biotecnológico, como o etanol de segunda geração. A abundância de biomassas lignocelulósicas associada à busca por alternativas aos combustíveis fósseis faz aumentar o interesse em estudos que envolvam a elucidação dos mecanismos de secreção de enzimas lignocelulolíticas. Neste estudo, o *P. echinulatum* S1M29 foi crescido em condições de indução para a produção de endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases, xilanases e swoleninas. Foram avaliados os perfis enzimáticos em géis de poliacrilamida e o padrão de expressão gênica para estas proteínas. Observou-se que a produção enzimática foi favorecida pela presença de celulose Celufloc E[®] e bagaço de cana-de-açúcar (BCA) no meio de cultivo em comparação à glicose, sendo que o uso de resíduo de biomassa proporcionou a obtenção dos melhores rendimentos. Resultado semelhante foi atingido na análise dos perfis de secreção enzimática em gel de poliacrilamida, sugerindo ainda, a presença de uma endoglicanase constitutiva de aproximadamente 80 kDa. O estudo de qRT-PCR revelou a presença de quatro genes para endoglicanases com padrão de expressão distintos, destacando-se um acúmulo de transcritos 9779,19 vezes superior à amostra calibradora do gene *eglI* em 24 h de cultivo no meio formulado com celulose Celufloc E[®]. Este mesmo gene gerou 1257,58 vezes mais transcritos acumulados que a amostra calibradora em meio suplementado com BCA. Na avaliação da expressão relativa do gene para celobiohidrolase obteve-se expressão superior no meio formulado com BCA em 48 h em relação ao meio com celulose Celufloc E[®] em 24 h, correspondendo, respectivamente, a 6464,49 e 3093,26 vezes mais transcritos acumulados que a amostra calibradora. O gene para β -glicosidase expressou-se em meio formulado com BCA no início do cultivo, embora a atividade desta enzima tenha ocorrido ao final do cultivo. A expressão de xilanases foi mais significativa com o uso de celulose Celufloc E[®] no meio de cultivo. Já o gene para swolenina apresenta um perfil de expressão com valores semelhantes em comparação ao uso de celulose Celufloc E[®] e BCA no meio de cultivo, apesar da presença de BCA ter proporcionado uma expressão mais tardia. Para todos os genes avaliados foram verificados valores muito reduzidos de expressão quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono para o *P. echinulatum*. Observou-se ainda uma expressão coordenada de genes codificadores de endoglicanases, celobiohidrolase, β -glicosidase e swolenina.

Palavras-chave: *Penicillium echinulatum*, expressão gênica, celulasas, swolenina.

ABSTRACT

The strain S1M29 of *Penicillium echinulatum* is a filamentous fungus that presents a cellulolytic system with potential for application in the degradation process of lignocellulosic materials to obtain products of biotechnological interest, such as second-generation ethanol. The availability of lignocellulosic biomass associated with the search for alternatives to fossil fuels increases the interest in studies that involve understanding the secretion mechanisms of lignocellulolytic enzymes. In this study, *P. echinulatum* S1M29 was grown under inducing conditions for the production of endoglucanases, cellobiohydrolases, β -glucosidases, xylanases and swollenins. The enzyme secretion profiles were evaluated in polyacrylamide gels and the pattern of gene expression for these proteins was also assessed. It was observed that enzyme production was enhanced in the presence of cellulose Celufloc E[®] and sugar cane bagasse (SCB) in the culture medium compared to glucose, with the use of biomass residue providing the best yields. A similar result was obtained analyzing enzyme secretion profiles in polyacrylamide gels, suggesting the presence of constitutive endoglucanases of approximately 80 kDa. Studies with qRT-PCR revealed the presence of four genes encoding endoglucanases with distinct expression patterns, standing out an accumulation of transcripts from *egl1* gene 9779.19 times higher than the calibrator sample in 24 h of growth in medium formulated with cellulose Celufloc E[®]. The same gene generated 1257.58 more accumulated transcripts than the reference sample in medium supplemented with SCB. Evaluation of gene expression for cellobiohydrolase yielded higher expression levels in the medium formulated with SCB in 48 h, in comparison to the medium containing cellulose Celufloc E[®] in 24 h, corresponding, respectively, to 6464.49 and 3093.26 more accumulated transcripts than the reference sample. The β -glucosidase gene was expressed in medium formulated with SCB at the beginning of growth, as opposed to that seen for activity of this enzyme, which occurred at the end of cultivation. The xylanase expression was more significant with the use of cellulose Celufloc E[®] in the culture medium. On the other hand, the gene for swollenin presents an expression profile with similar values compared to using cellulose Celufloc E[®] and SCB in the culture medium, although the presence of SCB has provided a later expression. Very low values of gene expression have been found for all genes evaluated when glucose was used as carbon source for *P. echinulatum*. A coordinated expression of endoglucanases, cellobiohydrolase, β -glucosidase and swollenin was also verified.

Key words: *Penicillium echinulatum*, gene expression, cellulases, swollenin.

1. INTRODUÇÃO

O uso de resíduos de biomassa lignocelulósica é uma perspectiva promissora para contribuir com a produção de etanol de segunda geração em larga escala. Isso baseia-se principalmente na hidrólise enzimática de lignocelulósicos, empregando celulases e xilanases na produção de xaropes de glicose e pentoses que, posteriormente, possam ser fermentados para a produção de etanol ou outros produtos biotecnológicos.

O crescente interesse na hidrólise de resíduos lignocelulósicos tem justificado a prospecção e o estudo da expressão gênica em novos microrganismos produtores de enzimas relacionadas à degradação dos lignocelulósicos. Entre os microrganismos que apresentam um grande potencial biotecnológico para a secreção de celulases visando a hidrólise da celulose, encontram-se as linhagens mutantes de *P. echinulatum*. As linhagens 9A02S1 e S1M29, quando crescidas em cultivos submersos em frascos mantidos em regime de agitação recíproca, em biorreatores e também em cultivos em estado sólido, apresentam secreções enzimáticas com atividades relevantes quanto à capacidade de preparados enzimáticos de hidrolisar papel filtro e carboximetilcelulose. O complexo enzimático já encontra-se caracterizado quanto a temperatura e pH ótimos e estabilidade térmica para atividade de FPA (*filter paper activity*) e β -glicosidasas.

Apesar do elevado potencial das linhagens de *P. echinulatum* participarem como componentes de tecnologia de hidrólise de lignocelulósicos, pouco é conhecido sobre a expressão gênica das celulases, xilanases, β -glicosidasas e swoleninas deste fungo. Apenas um dos genes para celulases de *P. echinulatum*, uma endoglicanase, foi identificado e clonado em *Scheffersomyces pastoris* (anteriormente conhecida como *Pichia pastoris*). À exceção desse, os demais genes para celulases, assim como para xilanases, ainda não foram identificados. Desconhece-se, portanto, o momento em que esses são expressos, as condições nas quais a expressão é acentuada e se as proteínas enzimáticas apresentam uma ou mais isoformas. Essas informações são de grande valia para a análise da capacidade enzimática da linhagem S1M29 de *P. echinulatum*.

A presença de enzimas obtidas em diferentes processos e tempos de cultivo é o resultado da expressão de um conjunto de genes e dos efeitos dos mecanismos regulatórios. A escassez de conhecimento sobre a regulação gênica de genes associados às enzimas lignocelulósicas de linhagens de *P. echinulatum*, produtoras de enzimas para a hidrólise da parede celular vegetal, dificulta a otimização de processos de produção dessas enzimas.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a atividade enzimática, caracterizar as enzimas e analisar a expressão gênica para as celulases, β -glicosidases, xilanases e swolenina de *P. echinulatum* S1M29, produzidas em condições de indução em cultivos submersos, tendo como objetivos específicos:

- determinar atividades de FPA, celobiohidrolases, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases de soluções enzimáticas de *P. echinulatum* S1M29 em condições induzidas (celulose Celufloc E[®] e bagaço de cana-de-açúcar) e não induzida (glicose);

- avaliar os perfis de atividades de endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases e proteico de soluções enzimáticas de *P. echinulatum* S1M29 em condições induzidas e não induzidas por meio de zimogramas;

- selecionar o gene de controle interno (*housekeeping gene*) mais adequado para o estudo de expressão gênica em *P. echinulatum* S1M29;

- analisar as diferenças nas expressões dos genes para endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases, xilanases e swolenina de *P. echinulatum* S1M29 por qRT-PCR em condições induzidas e não induzida para a produção de celulases.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A crescente demanda mundial por energia, a redução dos recursos petrolíferos e a limitação de combustíveis fósseis; a emissão de gases causadores do efeito estufa e a poluição do ar têm provocado um aumento no interesse em combustíveis alternativos, com enfoque na produção de etanol de milho, cana-de-açúcar e de lignocelulose (Sheehan & Himmel, 1999; Zaldivar *et al.*; 2001; Lynd *et al.*, 2008). O Brasil está em direção à independência energética no que se refere aos combustíveis fósseis, com a descoberta do petróleo no pré-sal e também pela expansão de fontes alternativas como bioetanol e biodiesel. De acordo com o Banco Mundial (2008), a produção de etanol proveniente da cana-de-açúcar é sustentável em termos financeiros e ambientais. A produção de um litro de etanol de cana-de-açúcar no Brasil requer cerca da metade da área de terra necessária para a produção do mesmo volume a partir do milho nos Estados Unidos, porém para obter benefícios políticos e alfandegários, o Brasil precisa expandir a sua produção sem desmatamento (Banco Mundial, 2013). Segundo o Balanço Energético Nacional (2013), de toda a energia ofertada para consumo no ano de 2012, 42,4% foi proveniente de fontes renováveis, sendo 15,4% de biomassa de cana-de-açúcar. A dimensão do mercado brasileiro e as características climáticas permitiram estabelecer uma produção sistemática e competitiva de etanol a partir do açúcar da cana-de-açúcar e garantem o sucesso das iniciativas no que se refere à energia oriunda da biomassa (Escobar *et al.*, 2009).

2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica representa um abundante recurso renovável que pode ser usado para gerar biocombustíveis e produtos químicos. A conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis depende de processos químicos ou principalmente da capacidade de degradação da biomassa por uma gama de enzimas produzidas por diversos microrganismos celulolíticos (Kovács *et al.*, 2009).

A lignocelulose é o principal componente da biomassa, incluindo cerca de metade do material vegetal produzido pela fotossíntese, representando o mais abundante recurso orgânico renovável. É constituída por celulose, hemicelulose e lignina, encontrando-se estes componentes fortemente interligados (Pérez *et al.*, 2002) (Figura 1). Durante os estágios iniciais de crescimento das plantas, o conteúdo de celulose pode variar de 35 a 50%; de hemicelulose, de 25 a 35%; e de lignina, 5 a 30% de sua massa seca (Lynd *et al.*, 2002).

A lignina presente na parede celular constitui uma estrutura de suporte, impermeável e resistente ao ataque microbiano (Pérez *et al.*, 2002). Trata-se de uma estrutura amorfa de elevada massa molecular, formada pela polimerização de unidades fenólicas e alcoólicas. Estudos de degradação da lignina são de extrema importância, pois encontra-se associada à celulose e à hemicelulose nos vegetais, dificultando o aproveitamento destes carboidratos. Pela sua estrutura molecular complexa, a lignina associa-se covalentemente à hemicelulose e previne o acesso de agentes hidrolíticos à celulose (Pérez *et al.*, 2002).

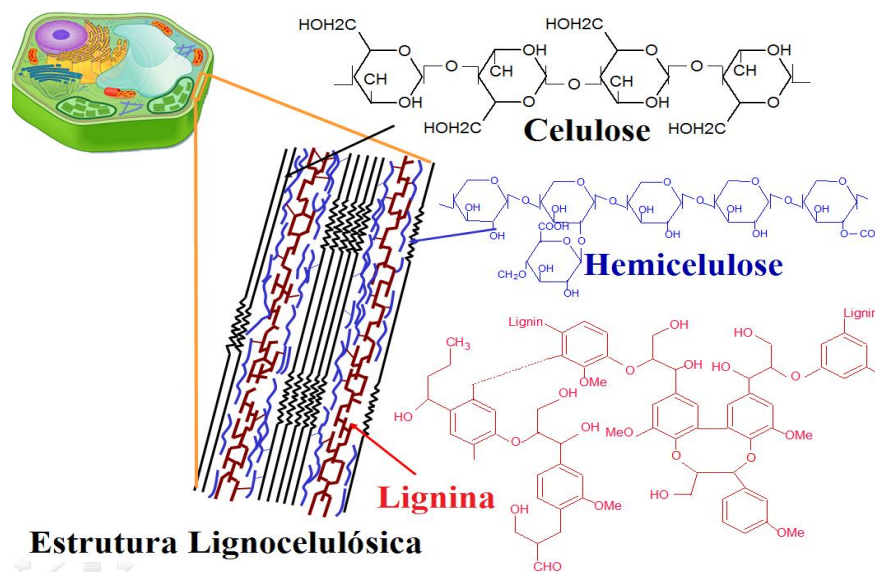


Figura 1. Estrutura lignocelulósica evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose. Figura elaborada por Marli Camassola.

A hemicelulose é um polissacarídeo de baixa massa molecular, compreendendo de 30% a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, tendo como função ligar as microfibrilas de celulose (Coughlan & Hazlewood, 1993). A xilana é seu componente mais abundante e se constitui em heteropolissacarídeo formado por unidades de β -D-xilopirranose unidas por ligações do tipo β -1,4 e, ocasionalmente, por ligações do tipo β -1,3. Todos os monômeros da hemicelulose são unidos por ligações facilmente hidrolisáveis (Pérez *et al.*, 2002).

A celulose é o principal componente das fibras vegetais. Trata-se de um homopolissacarídeo formado por unidades de β -glicopirranose (D-glicose) (2000 a 20000 resíduos) unidas por ligações do tipo β -1,4. Cada resíduo de glicose tem uma orientação de 180° em relação ao adjacente, formando assim a celobiose, subunidade repetitiva do polímero. A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glicose cujo carbono anomérico não está livre é chamada extremidade redutora; aquela que está livre, não-redutora (Figura 2) (Sandgren *et al.*, 2005).

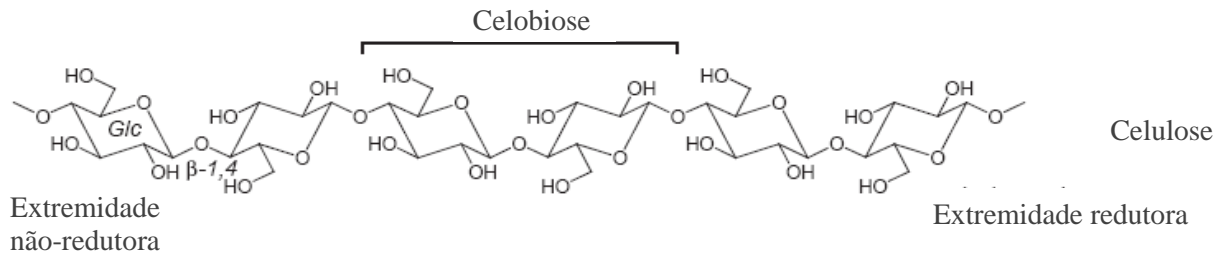


Figura 2. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de Sandgren, 2005).

As fibrilas são unidas por ligações de hidrogênio tanto intra- como intercadeias de celulose. Cada camada adjacente de celulose é ainda unida por forças de van der Waals resultando em uma fibra compacta (Lynd *et al.*, 2002). Apesar da molécula de celulose ser hidrofílica, é difícil que a água penetre no interior da celulose cristalina à temperatura ambiente. As regiões de celulose cristalina, mais compactas e de difícil degradação enzimática, são separadas por regiões de menor organização, denominadas amorfas (Figura 3). As regiões de celulose amorfa apresentam menor resistência aos ataques químicos e biológicos e são, portanto, pontos de degradação (Fan *et al.*, 1980).

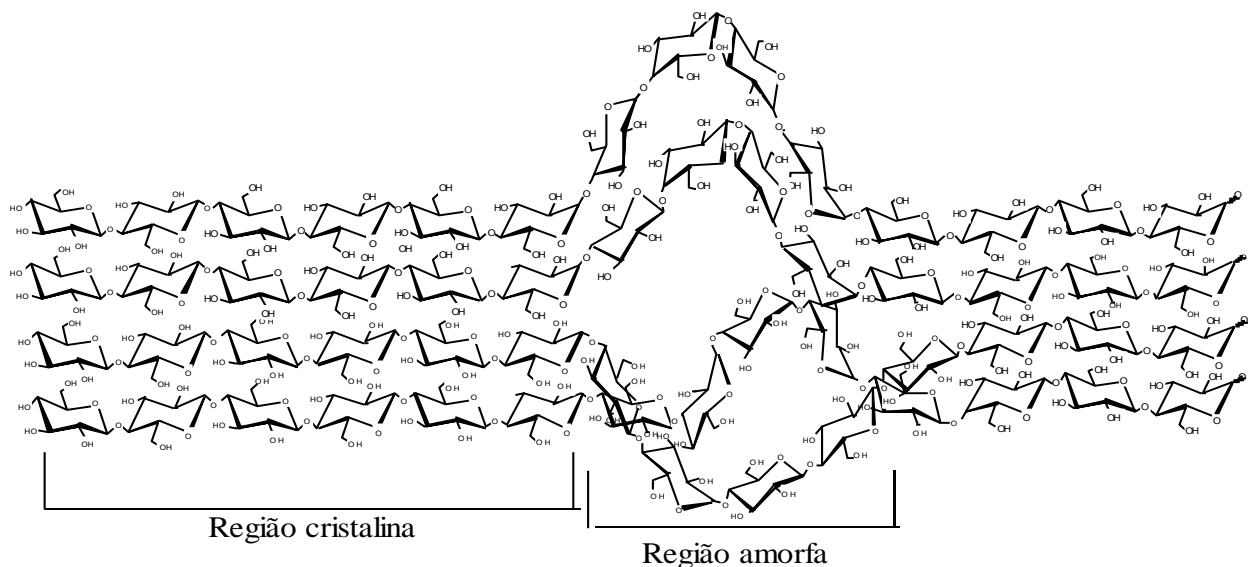


Figura 3. Estrutura da celulose indicando a região cristalina e amorfa (Dillon, 2004).

A biomassa lignocelulósica também apresenta alguns compostos minoritários que representam uma fração menor na composição química dos materiais lignocelulósicos. São formados por amido, resinas pécicas, ácidos graxos, ceras, terpenos e compostos fenólicos (Martín *et al.*, 2007).

Tais componentes dividem-se em duas classes. A primeira engloba materiais conhecidos como extrativos, por serem extraíveis com solventes como água e compostos orgânicos neutros ou

volatilizáveis por arraste de vapor. Por sua vez, a segunda classe engloba materiais que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados como, por exemplo, compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécnicas. A presença de alguns materiais limita o acesso aos carboidratos, causando hidrólise incompleta. Os solventes e o número de extrações necessárias para remover todos os materiais não-estruturais variam de acordo com o tipo de biomassa e os constituintes presentes. A ordem das etapas de extração também é importante (Ramos, 2003).

Existe uma necessidade do emprego de um método que amenize a interação entre os principais componentes da biomassa e os torne suscetíveis à conversão em combustíveis ou insumos para a indústria química (Ramos, 2003). Os métodos de pré-tratamento podem ser físicos, químicos, biológicos ou combinados.

Explosão a vapor é o método mais comumente usado para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (Ruiz *et al.*; 2008). Este método é um dos mais eficientes para tornar a biomassa mais acessível ao ataque das celulasas (Szengyel, 2000). Neste processo o material é aquecido em condições de alta pressão por alguns minutos e é subitamente interrompido pela descompressão à pressão atmosférica.

Os pré-tratamentos com água quente comprimida são utilizados para hidrolisar a hemicelulose da matéria-prima em um ambiente ligeiramente ácido para impedir a formação de compostos inibitórios (Yang & Wyman, 2004). Na AFEX (*ammonia fiber explosion*), a matéria-prima é exposta a amônia líquida em alta temperatura/pressão por um curto período de tempo e, então, a pressão é reduzida rapidamente (Mes-Hartree *et al.*, 1988). Explosão por CO₂ também é usada para pré-tratamento de diferentes matérias-primas parecendo ser mais rentável do que a AFEX e ainda impede a formação de compostos inibitórios (Zheng *et al.*, 1998).

Altos rendimentos de hidrólise foram relatados com pré-tratamento de materiais com H₂SO₄ diluído, o que pode levar a uma alta velocidade de reação e significativa melhora na hidrólise da celulose (Esteghlalian *et al.*, 1997). Ácido sulfúrico concentrado também pode ser utilizado para pré-tratamento de matérias-primas, porém o ácido deve ser removido ou neutralizado antes da fermentação. Ácidos clorídrico, fosfórico e nítrico também foram testados (Mosier *et al.*, 2005).

O pré-tratamento alcalino é descrito como causador de menor degradação de açúcar do que o pré-tratamento ácido (Kumar & Wyman, 2009). Hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio são considerados pré-tratamentos alcalinos adequados. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com NaOH diluído causam intumescimento, levando a um aumento na área de superfície interna, diminuição no grau de polimerização, diminuição na cristalinidade da celulose, separação da

ligação estrutural entre a lignina e os carboidratos e rompimento da estrutura da lignina (Taherzadeh & Karimi, 2008). A remoção da lignina aumenta a eficácia das enzimas, reduzindo os sítios de adsorção não produtivos para as enzimas e aumentando a acessibilidade à celulose (Kim & Holtzapfel, 2006).

A degradação de lignina por fungos de podridão branca ocorre através da ação de enzimas de degradação da lignina tais como peroxidases e lacases (Kumar & Wyman, 2009). Os pré-tratamentos biológicos são vantajosos por não necessitarem da adição de produtos químicos poluentes, não gerarem resíduos causadores de poluição ambiental e por demandarem baixas quantidades de energia. No entanto, como outros processos biológicos, são lentos e apresentam perdas de materiais, como celulose e hemicelulose, que são consumidos pelos microrganismos (Szengyel, 2000; Sun & Cheng, 2002).

2.2 Enzimas lignocelulolíticas

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 celulasas despertaram interesse em todo o mundo. A investigação para encontrar substratos adequados para a produção de enzimas celulolíticas visando a obtenção de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração, tem sido de grande interesse. O substrato ideal deve ser de baixo custo, facilmente processável, disponível em grandes quantidades e sua composição deve ser adequada tanto para a produção de enzima celulolítica como para a hidrólise (Lawford & Rousseau, 2003). Comparadas com a maioria das outras enzimas industriais, a maior importância das enzimas lignocelulolíticas é a complexidade de sua composição. Com relação à complexidade estrutural e composição química de materiais lignocelulósicos, as enzimas lignocelulolíticas produzidas por microrganismos são complexos enzimáticos contendo diversos tipos de enzimas degradadoras (Liu *et al.*, 2013).

2.2.1 Celulasas

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas (Henrissat, 1991). A classificação das celulasas, 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 ou celobiohidrolases, que atuam na região externa da

celulose; e (3) β -glicosidasas, que hidrolisam, em glicose, oligossacarídeos solúveis (Lynd *et al.*, 2002; Dillon & Camassola, 2014).

Endoglicanase (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, clivando randomicamente ligações nas regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo estes redutores e não-redutores (Lynd *et al.*, 2002). Além disso, é a enzima responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização – GP), devido à fragmentação da celulose em oligossacarídeos (Kleman-Leyer *et al.*, 1996). As endoglicanasas podem pertencer a várias famílias de glicosil hidrolase (GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH10, GH12, GH26, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74 e GH124) (<http://www.cazy.org>).

A exoglicanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase (Lynd *et al.*, 2002). A celobiohidrolase (CBH) ainda pode ser dividida em dois tipos: a enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores e é classificada como pertencente a família GH7, e é também conhecida como CBH7A; e a do tipo II (CBH II), que hidrolisa terminais não-redutores. As exoglicanasas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (Messner & Kubicek, 1991). A CBH II é classificada como pertencente à família 6A de glicosil hidrolase (GH). A família GH6 compreende enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 com inversão da configuração do carbono anomérico (Henrissat *et al.*, 1996). Além dessas famílias, também são exoglicanasas as glicosil hidrolases GH5 e GH9 (<http://www.cazy.org>).

O terceiro grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a β -glicosidase (EC 3.2.1.21), que tem a propriedade de hidrolisar, em glicose, celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) (Lynd, *et al.*, 2002). Por não atuar diretamente sobre a celulose, não é considerada uma celulase por muitos autores. Contudo, a baixa atividade de β -glicosidasas resultará no acúmulo de celobiose, que é um inibidor da atividade de celobiohidrolase (Tolan & Foody, 1999). De modo geral, acreditava-se que a insuficiência de β -glicosidasas no complexo de celulases de *Trichoderma reesei* seria um dos gargalos na eficiente hidrólise da celulose (Saloheimo *et al.*, 2002a). Na verdade, a suplementação das celulases de *T. reesei* com preparações externas de β -glicosidasas mostrou melhoria na produção de glicose a partir da degradação da celulose (Chen *et al.*, 2008). As β -

glicosidasas pertencem às famílias glicosil hidrolase GH1, GH3, GH5, GH9, GH30 e GH116 (<http://www.cazy.org>).

As enzimas do complexo celulolítico atuam conjuntamente na degradação de celulose insolúvel em glicose (Figura 4), apresentando um rendimento superior à soma dos rendimentos individuais, efeito conhecido como sinergismo (Lynd *et al.*, 2002; Sipos *et al.*, 2010).

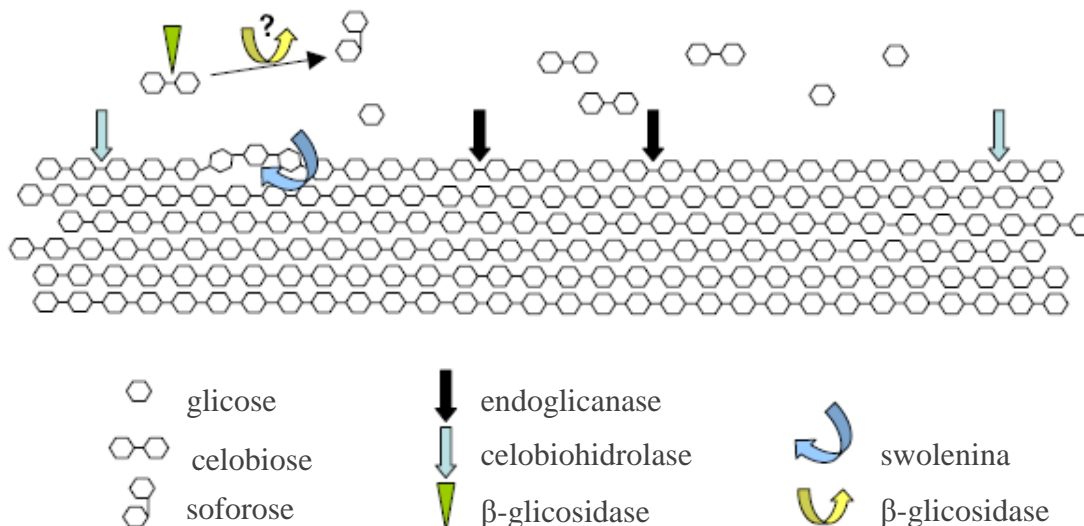


Figura 4. Ação das enzimas celulolíticas e da swolenina (Adaptado de Aro *et al.*, 2005).

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

Comercialmente, essas enzimas são principalmente empregadas na indústria têxtil e de detergentes (Anish *et al.*, 2007); no processo de bioestonagem de tecidos (Jurgen, 2001); como aditivos na preparação do malte de cerveja. Também é aplicada em processos de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcaloides 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 (McDonald *et al.*, 1991). Contudo, seu maior potencial – o emprego na sacarificação da celulose para a produção de hidrolisados – ainda está sendo estudado através de plantas-piloto visando a fermentação destes produtos para a obtenção de etanol de segunda geração (Dillon & Camassola, 2014). No entanto, o processo requer altas quantidades dessas enzimas, o que o torna desfavorável economicamente. (Himmel *et al.*, 1999; 2007; Gusakov *et al.*, 2007; Saranraj *et al.*, 2012).

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

Os microrganismos celulolíticos são abundantes na natureza e desempenham um importante papel no ciclo de carbono, na reciclagem do dióxido de carbono fixado através da fotossíntese (Byrne *et al.*, 1999). 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. Devido à sua excepcional capacidade de expressar e secretar proteínas, tornaram-se indispensáveis para a produção enzimática. Enzimas nativas ou recombinantes são produzidas principalmente por *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *T. reesei*, além de outras linhagens que estão em desenvolvimento (Punt *et al.*, 2002).

O complexo enzimático produzido por *T. reesei* é conhecido por apresentar baixa atividade de β -glicosidases e uma grande quantidade de exoglicanases, que podem atingir cerca de 80% do total de proteínas secretadas por esse fungo (Teeri, 1997). De acordo com Martins *et al.* (2008), o complexo enzimático de *P. echinulatum* apresenta atividade de β -glicosidase superior ao de *T. reesei*. Este fato indica sua potencialidade em processos onde a sacarificação total da celulose seja desejada, pois a manutenção da celobiose em baixos níveis evita o efeito inibitório desta sobre as celulasas.

2.2.2 Xilanases

A bioconversão de materiais lignocelulósicos em açúcares é essencial para a obtenção de produtos biotecnológicos como o etanol lignocelulósico. Para tanto, além de celulasas, é importante a hidrólise realizada por hemicelulasas, que facilitam a hidrólise da celulose uma vez que

proporcionam a exposição das fibras tornando-as mais acessíveis (Gírio *et al.*, 2010). As xilanases (1,4- β -D-xilana xilanoidrolase, EC 3.2.1.8) têm atraído atenção devido a seu potencial biotecnológico em diferentes processos industriais, sendo utilizadas em formulações de rações para animais (Xiong *et al.*, 2005); para melhorar a eficiência na produção de silagens (Kulkarni *et al.*, 1999); na indústria de papel para hidrolisar a xilana presente na polpa e facilitar a extração da lignina e, assim, reduzir o consumo de reagentes tóxicos requeridos no processo de branqueamento da polpa (Ninawe & Kuhad, 2006; Kapoor *et al.*, 2007), além de possibilitar a obtenção de papel com maior resistência (Damaso *et al.*, 2002). No processamento de alimentos, as xilanases são empregadas na clarificação de sucos e vinhos em associação às pectinases e celulases; em processos de maceração de vegetais; na extração de aromas e pigmentos, óleos vegetais e amido (Bhat, 2000; Beg *et al.*, 2001; Kapoor e Kuhad, 2007), além de serem empregadas na indústria de panificação para aumentar a qualidade dos produtos (Collins *et al.*, 2006). Seu potencial também está na sacarificação da hemicelulose para a obtenção de produtos biotecnológicos como o xilitol e o etanol (Beg *et al.*, 2001).

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. Ademais, as xilanases fúngicas são produzidas em associação a celulases, formando um complexo capaz de hidrolisar de forma mais eficiente substratos lignocelulósicos (Beg *et al.*, 2001).

O sistema requer a ação de diversas enzimas (Figura 5): endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam aleatoriamente a cadeia principal da xilana liberando xilo-oligossacarídeos; α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), que removem as cadeias laterais da L-arabinofuranose; α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139), que hidrolisam resíduos de metil glucuronato; acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), que hidrolisam grupos acetato da cadeia principal; feruloil esterases (EC 3.1.1.73) e coumaroil esterases (EC 3.1.1.-), que hidrolisam os respectivos ácidos aromáticos ligados aos resíduos de arabinofuranose (Chávez *et al.*, 2006).

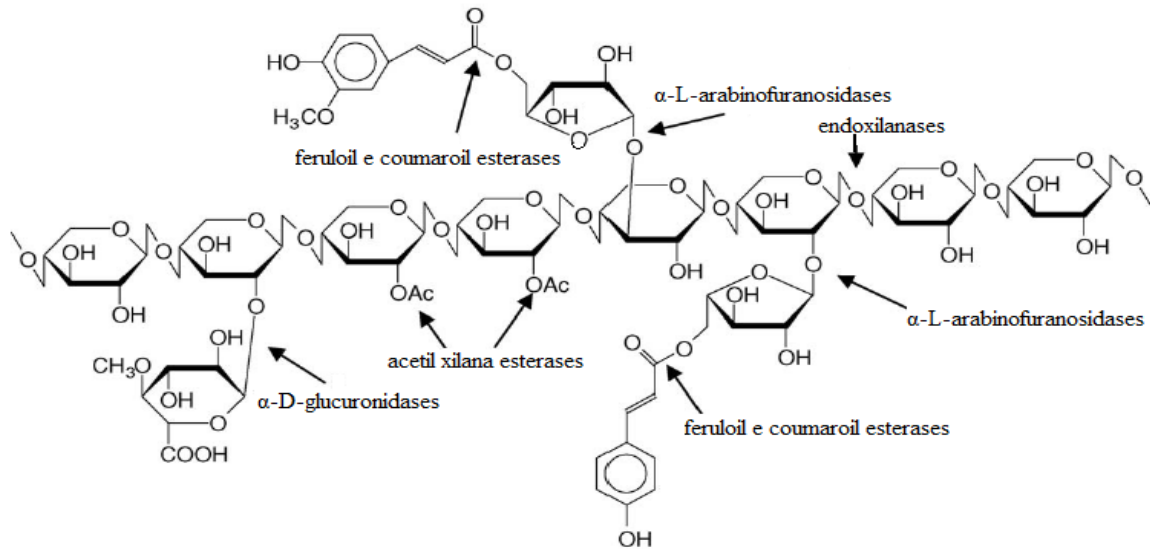


Figura 5. Estrutura da xilana e os sítios de ação das enzimas do complexo xilanase (adaptado de Chávez *et al.*, 2006).

Entre os gêneros de microrganismos produtores de xilanases encontram-se *Bacillus* (Sa-Pereira *et al.*, 2004), *Trichoderma* (Xiong *et al.*, 2004) e *Streptomyces* (Wang *et al.*, 2003; Suchita *et al.*, 2007). *P. echinulatum* também secreta xilanases (Camassola & Dillon, 2007a; Camassola & Dillon, 2010).

2.2.3 Oxidases

As oxidases são enzimas cobre-dependentes da família glicosil hidrolase 61 (GH61) que, em combinação com celobiose desidrogenase, aumentam a hidrólise de celulose por celulases, favorecendo a hidrólise de lignocelulósicos para a obtenção de biocombustíveis derivados de açúcar (Harris *et al.*, 2010). São enzimas oxidativas que fazem a clivagem da superfície da celulose sem requerer a separação da cadeia de glucanos (Phillips *et al.*, 2011). As mono-oxigenases também conhecidas como polissacarídeo mono-oxigenases (PMOs) apresentam uma natureza sinérgica de ação que decorre da sua capacidade de se ligar à celulose, que é cristalina, e clivagem oxidativa das ligações glicosídicas na presença de um doador externo de elétrons, aumentando a acessibilidade das celulases (Li *et al.*, 2012, Beeson *et al.*, 2012). Estas enzimas podem acelerar a conversão enzimática da biomassa, reduzindo assim a carga de enzima e o tempo de processamento. Além disso, elas podem agir sob materiais mais compactos e inacessíveis, podendo afetar positivamente não só os custos da etapa de sacarificação enzimática, mas também otimizar o processo de pré-tratamento e o delineamento de processos em geral (Horn *et al.*, 2012).

2.3 Swoleninas

A cristalinidade é um fator relevante para a hidrólise da celulose, pois pode afetar a adsorção das celulases (Hall *et al.*, 2010) e, portanto, a acessibilidade à celulose (Arantes & Saddler, 2011). Para elevadas taxas de hidrólise da celulose e maiores rendimentos, a acessibilidade à celulose precisa ser aumentada; sua cristalinidade, reduzida (Rollin *et al.*, 2011).

Destaca-se, dentre as enzimas acessórias na hidrólise de lignocelulose, a swolenina, caracterizada como uma proteína relacionada à expansina das plantas, proteína com ação de afrouxamento da parede celular (Saloheimo *et al.*, 2002b), podendo, desta forma, apresentar função similar e levar ao rompimento das fibras de celulose da parede celular vegetal (Figura 4). Assim, a swolenina pode ter um papel importante na degradação enzimática de lignocelulose (Arantes & Saddler, 2010). As swoleninas ocorrem em fungos como *Trichoderma asperellum* (Brotman *et al.*, 2008), *Aspergillus fumigatus*, *T. virens* e *T. atroviride*. Exemplo de sua potencialidade é a swolenina clonada a partir de *T. pseudokoningii*, que possui atividade glicohidrolítica (Yao *et al.*, 2008). Os níveis de expressão de swolenina em *T. reesei* são relativamente baixos (1 mg.L⁻¹) quando comparados aos de *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg.L⁻¹) (Saloheimo *et al.*, 2002b), sendo ainda mais elevados em *A. oryzae* (50 mg.L⁻¹) (Wang *et al.*, 2010). O estudo realizado por Ribeiro *et al.*, (2012) identificou swolenina no secretoma de *P. echinulatum* nas cinco condições de crescimento avaliadas.

Assim como as celulases, essas proteínas possuem uma estrutura modular com o N-terminal CBD (domínio de ligação ao substrato), que tem o papel de mediar a ligação das enzimas ao substrato insolúvel. Os resultados obtidos a partir dos estudos dessa proteína em *T. reesei* fornecem uma nova visão em relação ao mecanismo de degradação de lignocelulósicos por microrganismos. Primeiramente haveria a ação da swolenina, afrouxando as fibras da parede vegetal e rompendo as ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose, permitindo que as enzimas hidrolíticas apresentassem sua ação potencializada. A descoberta da swolenina em *T. reesei* não somente tem auxiliado no esclarecimento do mecanismo de hidrólise enzimática da lignocelulose, mas também na relação do seu papel para o aumento da eficiência da conversão enzimática da celulose (Cosgrove, 2000a; Cosgrove, 2000b).

2.4 *Penicillium echinulatum*

T. reesei sempre foi usado como o principal microrganismo para produzir *cocktails* de celulases, e várias estratégias foram aplicadas para melhorar os seus rendimentos de enzimas com a

finalidade obtenção de menores custos de produção (Dashtban *et al.*, 2009; Seiboth *et al.*, 2012). Fungos do gênero *Penicillium* recentemente tem atraído uma grande atenção da pesquisa, e são considerados como potenciais alternativas ao uso do *T. reesei* para produção de biocombustíveis de segunda geração (Gusakov, 2011).

Dentre os microrganismos com potencial de secreção celulolítica para a hidrólise de celulose encontram-se os mutantes (Dillon *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 2006) e fusionantes de *P. echinulatum* (Dillon *et al.*, 2008). Imagem de microscopia eletrônica de varredura do micélio da linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum* é representada na Figura 6. Estudos em cultivo submerso têm mostrado atividades de FPA próximo a 2 FPU.mL⁻¹ (Dillon *et al.*, 2006). Diferente de *T. reesei*, *P. echinulatum* não é induzido por lactose, apesar desse dissacarídeo poder ser utilizado favoravelmente como umas das fontes de carbono para a produção de celulases (Sehnem *et al.*, 2006). Metilxantinas, como a cafeína, podem ser adicionadas ao meio de cultivo para reduzir a repressão catabólica na presença de glicose (Camassola & Dillon, 2007b). Reis *et al.* (2013a) relatam atividades de FPase de 8,3 U.mL⁻¹, de endoglicanases de 37,3 U.mL⁻¹ e de xilanases de 177 U.mL⁻¹, em estudos de batelada alimentada com *P. echinulatum* S1M29 utilizando 40 g.L⁻¹ de celulose.

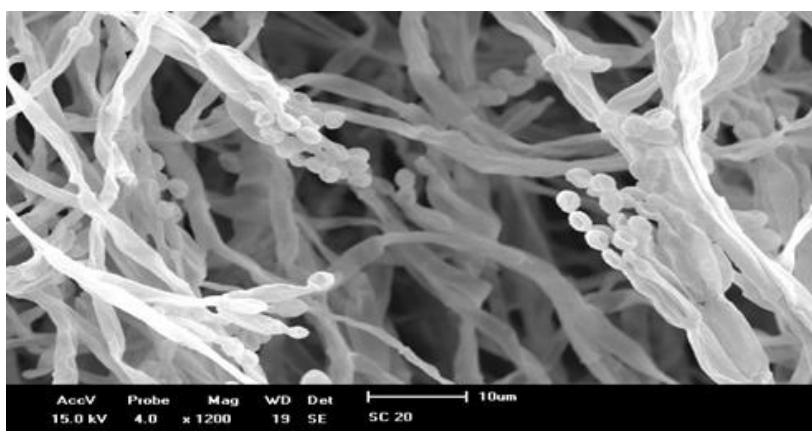


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do micélio da linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* (Obtida por Marli Camassola).

Em cultivos em estado sólido com meio contendo bagaço de cana-de-açúcar, a linhagem mutante 9A02S1 de *P. echinulatum* apresenta expressiva produção de celulases (30 FPU.g⁻¹ de matéria seca) (Camassola & Dillon, 2007a). Em cultivo submerso com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor também foram obtidos resultados satisfatórios em relação à produção de FPA, β -glicosidases e xilanases (Pereira *et al.*, 2013). A caracterização da mistura enzimática da linhagem 9A02S1 mostrou uma boa estabilidade térmica para FPA e β -glicosidases a

50°C (Camassola *et al.*, 2004) e uma mais adequada relação entre atividade FPA e β -glicosidases, em comparação com o complexo enzimático de *T. reesei*, para a hidrólise eficiente de celulose (Martins *et al.*, 2008).

Schneider *et al.* (2014) estudaram as diferenças na morfologia de *P. echinulatum* influenciadas por distintas fontes de carbono e verificaram que, no meio formulado com celulose ou bagaço de cana-de-açúcar, o micélio cresceu mais disperso, o que teria favorecido a secreção enzimática.

Estudo de caracterização de celulasas de *P. echinulatum* mostrou a presença de uma banda com atividade endoglicanásica de 76 kDa no caldo enzimático de cultivos com diferentes fontes de carbono, sugerindo tratar-se de uma enzima constitutiva (Zampieri *et al.*, 2013). O estudo de 20 secretomas de *P. echinulatum*, obtidos a partir de cinco diferentes condições de cultivo baseadas em bagaço de cana-de-açúcar, possibilitou a identificação de 99 proteínas fúngicas. Dessas, 16 foram identificadas em todas as condições de cultivo, enquanto 29 somente foram encontradas no cultivo em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento. De todas as proteínas identificadas, 80% foram classificadas como endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases, evidenciando o papel desse fungo na produção de enzimas voltadas para a degradação de celulose (Ribeiro *et al.*, 2012). O secretoma do *P. echinulatum* é constituído por enzimas CAZy, sendo majoritariamente: glicosil hidrolases, carboidrato esterases, pectina liases, enzimas auxiliares, swolenina, bem como módulo de ligação a carboidrato (Schneider, 2014).

Rubini *et al.* (2010) desenvolveram estudo de isolamento, clonagem e caracterização de cDNA (DNA complementar ao RNA mensageiro) de *P. echinulatum* 9A02S1 que codifica uma endoglicanase predita. A análise da sequência identificou 387 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 41,1 kDa. Sua sequência de 1161 pares de base exibe alto grau de identidade (48 a 60%) com genes de endoglicanases fúngicas da família glicosil hidrolase 5A. A enzima secretada por *eglI* de *P. echinulatum* apresentou alta atividade sobre ampla escala de pH (5 – 9) e temperatura ótima de 60°C. Além disso, esta apresentou termoestabilidade a 70°C, temperatura em que cerca de 84% de sua atividade de CMCase (carboximetilcelulase) inicial foi mantida após 1 hora de pré-incubação. Foi demonstrado que EGL I hidrolisa CMC (carboximetilcelulose) e MUC (4-metilumbeliferil- β -D-celobiosídeo), sugerindo que esta enzima apresenta atividade de endo- e exoglicanase.

O estudo realizado por Pozzan (2011) mostrou a maior expressão de mRNA de *eglI* de *P. echinulatum* em 24 h de cultivo em meio com celulose, verificando a maior atividade de

endoglicanase em 72 h. Meios formulados com glicose mostraram expressão muito reduzida no 3º e 4º dias de cultivo.

O genoma do *P. echinulatum* foi recentemente sequenciado em parceria com Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE – e está atualmente em análise. Sabe-se que apresenta 30,5 Mb com 8500 genes mapeados, sendo 174 pertencentes a família GH e 615 proteínas secretadas previstas (dados não publicados).

2.5 Produção de enzimas do complexo celulolítico

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. Assim, para que o crescimento ocorra, é preciso que o microrganismo tenha disponível os elementos básicos e indispensáveis para seu metabolismo. Desse modo, elementos como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e cálcio, além de ferro, cobre, cobalto, zinco, manganês e molibdênio, são requeridos pelos microrganismos e devem estar presentes no meio (Smits *et al.*, 1996).

Na formulação de um meio de cultivo para a produção de celulasas, deve-se controlar 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). A síntese de celulasas pode ser induzida por diversos oligo- e dissacarídeos (Hrmova *et al.*, 1991; Magnelli & Forchiassin, 1999). A glicose, por outro lado, reprime a síntese de celulasas pelo mecanismo de repressão catabólica em nível de transcrição (Beguin, 1990; Fowler, 1993).

Os materiais lignocelulósicos servem como matéria-prima abundante e de baixo custo, portanto vêm sendo estudados como fonte de açúcares fermentescíveis, sendo necessários para produzir enzimas para o processo de obtenção etanol de segunda geração a partir de recursos renováveis a custos economicamente viáveis (Martín *et al.*, 2007). Dentre essas fontes renováveis, podem-se destacar os resíduos agroindustriais como casca e palha de arroz, palha de cevada, palha de trigo, sabugo e forragem de milho e principalmente o bagaço e a palha de cana-de-açúcar. Esses e outros substratos lignocelulósicos têm se mostrado eficientes para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por alguns fungos como *Aspergillus awamori*, *T. reesei*, *A. niger*, *Penicillium purpurogenum* e *Humicola grisea* (Silva, 2009; Sánchez, 2009).

A extração do açúcar resulta no acúmulo de bagaço de cana-de-açúcar. O uso adequado dessa biomassa acrescenta valor a esse material e é uma solução para a remoção de resíduos abundantes, resolvendo o problema da indústria de açúcar e aumentando o rendimento econômico do processo, obtendo-se, portanto, um efeito duplo: ecológico e econômico. O bagaço de cana-de-açúcar permite o desenvolvimento de produtos, além daqueles provenientes apenas de sua combustão considerando-se que ainda assim há um excedente de resíduos da cana-de-açúcar, envolvendo principalmente o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento integral da cana-de-açúcar em relação à produção de etanol e produtos biotecnológicos de alto valor agregado (Gámez *et al.*, 2006). A produção de endoglicanases, β -glicosidases e xilanases pelo fungo *P. echinulatum* 9A02S1 mostrou-se favorecida em cultivos sólidos formulados com misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (Camassola & Dillon, 2010), assim como em cultivos submersos com a utilização de 1, 2 e 3% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. A incorporação de fontes de baixo custo, como o bagaço de cana-de-açúcar, nos meios de cultivo, deve contribuir para uma diminuição nos custos de produção de complexos enzimáticos capazes de hidrolisar resíduos lignocelulósicos para a formação de xaropes fermentescíveis (Camassola & Dillon, 2012a).

Estudos realizados por Menegol *et al.* (2014) e Scholl *et al.* (2015) avaliaram o emprego de outro material lignocelulósico, o capim-elefante, na produção de enzimas do complexo celulolítico por *Penicillium echinulatum*, em cultivos submersos ou em estado sólido, assim como a aplicação destas enzimas na hidrólise enzimática desta mesma biomassa. A secreção de endoglicanases e FPA foi favorecida na presença de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor em cultivo submerso, enquanto o efeito sobre xilanases mostrou-se negativo (Scholl *et al.*, 2015). Basso *et al.* (2014) avaliou diferentes acessos de capim-elefante na produção de enzimas lignocelulolíticas, em cultivos submersos, objetivando identificar genótipos com potencial para a produção de enzimas para indústria de etanol de segunda geração, chegando à valores 4,7 e 4 vezes superiores de produção de endoglicanases e FPA, respectivamente em comparação com à celulose.

2.6 Expressão de genes para celulases, β -glicosidases, xilanases e swoleninas

Para o aumento da produção enzimática é importante o uso de microrganismos com modificações nos controles de produção de celulases, obtidos por melhoramento genético, além de processos de cultivo eficientes (Dillon, 2004).

Estudos iniciais com o emprego de *Northern blot* e *Slot blot* (Ilmén *et al.*, 1997) permitiram acompanhar a expressão dos principais genes para celulases em *T. reesei* e verificar que estes são induzidos por celulose e pelo dissacarídeo sofrorose, reprimidos por glicose e que não sofrem ação de sorbitol ou glicerol. *T. reesei*, possui síntese basal das celulases que pode ser interrompida por deleção em segmentos *upstream* do gene *cbh1* (Henrique-Silva *et al.*, 1996). As celulases basais ou constitutivas são normalmente expressas em baixo nível e podem digerir celulose para liberar oligossacarídeos que entram nas células e promovem a expressão das celulases (Figura 7). Evidências experimentais têm mostrado que a atividade da celulase basal extracelular atua como um evento cascata de indução na síntese de celulase por celulose (Sun *et al.*, 2008).

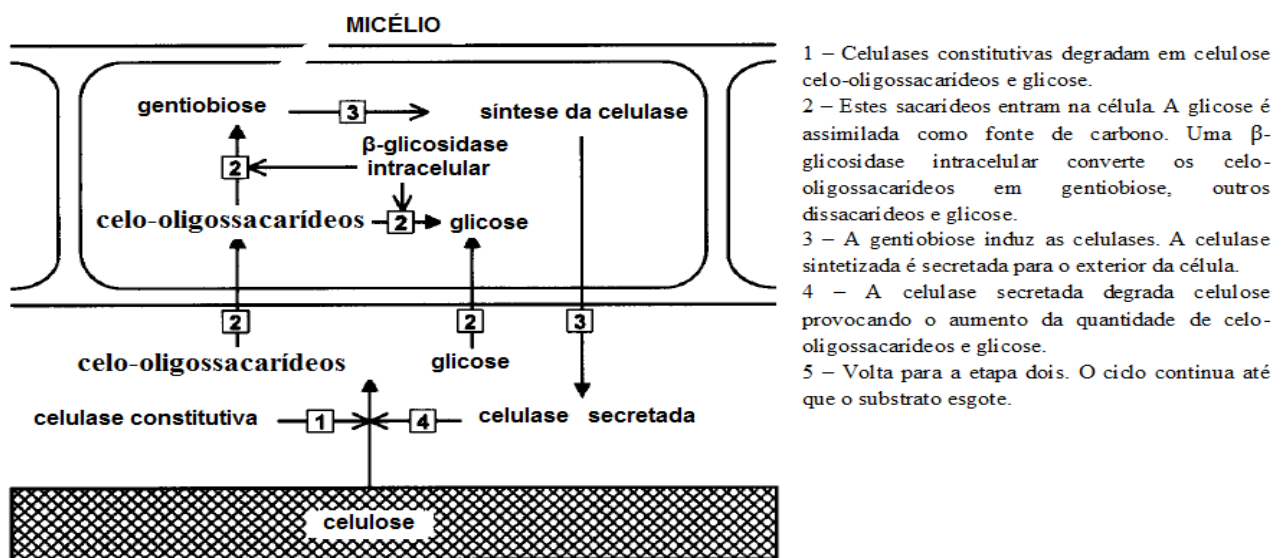


Figura 7. Modelo de indução de celulases em *Penicillium purpurogenum* (adaptado de Suto & Tomita, 2001).

A expressão de genes de celulases e hemicelulases é altamente regulada, sendo estas enzimas sintetizadas quando um indutor está presente no meio (Aro *et al.*, 2005; Kubicek *et al.*, 2009). Esta regulação deve-se a fatores de transcrição (FT), como XYR1, ACE2, HAP2/3/5, ACE1 e CRE1 (Kubicek *et al.*, 2009), conforme apresentado na Figura 8. O XYR1 (regulador de xilanase 1) é considerado o principal ativador da expressão dos genes de celulases e hemicelulases (Stricker *et al.*, 2006; Stricker *et al.*, 2008). Sua deleção eliminou a indução por diversos tipos de indutores (Stricker *et al.*, 2006).

Acredita-se que o complexo HAP2/3/5 seja necessário para a geração de uma abertura na estrutura da cromatina visando a ativação da transcrição integral (Zeilinger *et al.*, 2003).

A região *upstream* do promotor para o gene *cbh1* de *Trichoderma* (Torigoi *et al.*, 1996), pode sofrer a ação do produto do gene *cre1* – que codifica para um repressor catabólico CRE1 (elemento da repressão catabólica) – 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* (ativador da expressão de celulases) (Saloheimo *et al.*, 2000; Aro *et al.*, 2001) e do gene *ace2* (Aro *et al.*, 2001) que exercem atividades de indução de celulases. Esses autores isolaram os genes e identificaram esses dois ativadores de transcrição que codificam para proteínas que se ligam ao DNA. Genes homólogos a *ace1* já foram identificados em seqüências expressas em *Aspergillus* e *Neurospora*, indicando que esse gene também ocorre em outros fungos filamentosos (Todd *et al.*, 1998).

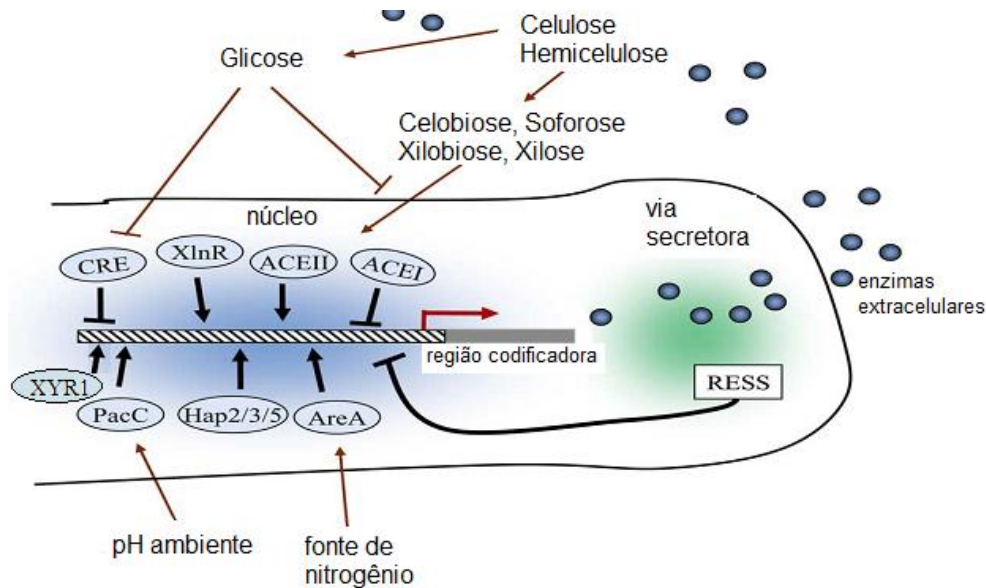


Figura 8. Representação esquemática dos fatores de transcrição na regulação da expressão de genes de celulases e xilanases (adaptado de Aro *et al.*, 2005).

Sun *et al.* (2008) desenvolveram um estudo da expressão de genes para celulases por RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase), com o fungo *Penicillium decumbens*, mostrando que os principais genes para celulase *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* e *bgl1* apresentam síntese basal. É interessante que a comparação de duas endoglicanases tenha mostrado 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.

Independentemente 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).

T. reesei secreta pelo menos seis tipos de endoglicanases (EG I, EG II, EG III, EG IV, EG V e EG VI) que diferem em massa molecular e ponto isoelétrico (Quadro 1). EG I 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 EG II chega a 0,5% e as endoglicanases restantes apresentam-se como componentes minoritários (Saloheimo *et al.*, 2002a). No entanto, de acordo com Martinez *et al.* (2008), foram identificadas duas celobiohidrolases e oito endoglicanases em *T. reesei*. Outros microrganismos, porém, apresentam uma variedade maior de celulasas, como é o caso de *Magnaporthe grisea*, com 5 celobiohidrolases e 25 endoglicanases; *Phanerochaete chrysosporium* com 8 celobiohidrolases e 19 endoglicanases; *Aspergillus nidulans* com 4 celobiohidrolases e 14 endoglicanases, etc.

Quadro 1. Propriedades das celulasas produzidas pelo *Trichoderma reesei* (adaptado de Saloheimo *et al.*, 2002a; Miettinen-Oinonen, 2004; Martinez *et al.*, 2008).

Enzima	Aminoácidos	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico
EG1/CEL7B/GH7	437	50 – 55	4,6
EG2/CEL5A/GH5	397	48	5,5
EG3/CEL12A/GH12	218	25	7,4
EG4/CEL61A/GH61	326	37	ND
EG45/CEL45A/GH45	225	23	2,8 – 3
EG VI	838	75 – 105	4,1 – 4,3
CBH I/Cel7A/GH7	497	59 – 68	3,5 – 4,2
CBH II/Cel6A/GH6	447	50 – 58	5,1 – 6,3
BGL I	744	75	ND
BGL II/CEL1A	466	52	ND

ND – não determinado.

Dois tipos de celobiohidrolases (CBH I e CBH II) já foram identificados no complexo celulolítico secretado por *T. reesei* (Teeri, 1997). Essas exoglicanases são produzidas em maior quantidade do que as outras enzimas celulolíticas do complexo. CBH I responde por cerca de 60% do total de proteínas liberadas no meio de cultura, enquanto que CBH II chega a 20% (Miettinen-Oinonen, 2004). Nesse mesmo fungo, foram descritos dois principais genes de β -glicosidases: *bgl1*, que codifica uma β -glicosidase extracelular (BGL I); e *bgl2*, que codifica uma enzima intracelular (BGL II), sendo que a última, além de hidrolisar celobiose, também possui ação de transglicosilação (Saloheimo *et al.*, 2002a). No entanto, a quantidade de β -glicosidases produzida por *T. reesei* não é suficiente para ser empregada na indústria.

Verbeke *et al.* (2009) demonstraram que a expressão de celobiohidrolase I, endoglicanase III e as duas β -glicosidasas de *T. reesei* estão também coordenadas, juntamente com a expressão de dois genes *swol1*, que codificam para swolenina (Saloheimo *et al.*, 2002b).

A repressão catabólica por carbono é conhecida como a inibição da síntese proteica induzida em resposta à presença de uma fonte de carbono favorável, como a glicose, e é frequentemente associada à repressão da transcrição (Bazzolli *et al.*, 2008). A glicose é um forte repressor da produção de celulases e hemicelulases. A proteína CRE A (elemento de repressão catabólica) em *Aspergillus* e a homóloga CRE1 em *Trichoderma* tem sido considerada mediador da regulação transcricional dos genes codificadores de celulases e hemicelulases para metabolismo de outros açúcares (Strauss *et al.*, 1995; Ilmén *et al.*, 1996; De Vries *et al.*, 1999; Mach & Zeilinger, 2003; Jørgensen *et al.*, 2004). Esse mecanismo favorece a assimilação de fontes de carbono com alto rendimento energético em vez de fontes que produzam menos energia. Enfatiza-se a importância desse gene para a melhoria da produção enzimática em *T. reesei* (Nakari-Setälä *et al.*, 2009).

Promotores de celulases também são regulados por fatores (ACE1 e ACE2) que são ativadores ou repressores de expressão de celulases (Saloheimo *et al.*, 2000; Aro *et al.*, 2001). ACE1 age como um repressor e se liga ao segmento AGGCA no promotor *cbh1* (Aro *et al.*, 2003). Entretanto, ACE2 ativa a expressão de *cbh1* ligando-se a uma sequência-motivo GGCTAA na região *upstream* de *cbh1* (Ling *et al.*, 2009).

A função do fator ACE2 foi estudada por Aro *et al.* (2001) no que se refere aos efeitos de deleção de *ace2* na linhagem hipercelulolítica *T. reesei* ALKO2221. A deleção do gene *ace2* levou à diminuição cinética da indução de mRNAs codificadores das principais celulases – celobiohidrolases I e II e endoglicanases I e II – e de 30 a 70% de redução na atividade de celulase quando o fungo foi cultivado em meio contendo celulose (Solka-floc[®]). O nível de expressão do gene que codifica xilanase também foi afetado. A deleção de *ace2* levou a uma menor expressão de *xyn2* no cultivo induzido por celulose. Indução de celulase por sofrorose não foi afetada pela deleção de *ace2*.

Em estudo realizado por Mello-de-Sousa *et al.* (2011), a análise de qRT-PCR revelou um pico de acúmulo de mRNA para a maioria dos genes de codificação de hidrolases de *Humicola grisea* var. *thermoidea* em 2 h em meio alcalino com bagaço de cana-de-açúcar, indicando uma resposta rápida à indução assim como já observado em *T. reesei* (Verbeke *et al.*, 2009) e *Polyporus arcularius* (Ohnishi *et al.*, 2007).

Estudo realizado por Martinez *et al.* (2008) revelou 99% do genoma de *T. reesei*. Detectaram-se 9129 genes semelhantes a *Neurospora crassa* (Galagan *et al.*, 2003), mas cerca de 2500 a menos que o número de genes de *Fusarium graminearum* (Cuomo *et al.*, 2007), uma grande diferença, uma vez que o *F. graminearum* e o *T. reesei* compartilham um ancestral comum. A média do tamanho dos genes em *T. reesei* é de 1797 pb. Em comparação com outros fungos, *T. reesei* apresenta um menor repertório de genes para celulases, hemicelulases e pectinases. O genoma deste fungo revela que várias famílias de enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos são reduzidas ou ausentes. Todavia, este número limitado de enzimas é suficiente para que *T. reesei* possa competir na natureza com outros fungos que degradam celulose e hemicelulose.

A qRT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real) é um método que contribui para uma medida quantitativa sensível e confiável da expressão do gene por mRNA. A reação de qRT-PCR apresenta alta sensibilidade, reprodutibilidade e ampla quantificação (Bar *et al.*, 2003; Fleige & Pfaffl, 2006). Porém, para o sucesso total das análises baseadas em RNA, a integridade e pureza do RNA são elementos críticos. RNA com baixa qualidade pode comprometer fortemente os resultados (Imbeaud *et al.*, 2005).

A expressão gênica pode ser quantificada por dois métodos: absoluto ou relativo. Na quantificação absoluta, o número absoluto de cópias de mRNA é determinado por comparação a uma curva padrão (Pfaffl & Hageleit, 2001). A expressão relativa é baseada na expressão do gene-alvo comparada a um gene-referência também chamado de normalizador, gene controle interno ou *housekeeping* gene, sendo esse tipo de quantificação muito eficiente. Contudo, é fortemente dependente do gene-referência e dos métodos de normalização utilizados. A avaliação da estabilidade dos genes controle interno para cada condição experimental é um pré-requisito importante para a normalização e confiabilidade dos resultados da expressão gênica (Pfaffl *et al.*, 2004). Os genes-referência mais comumente utilizados são aqueles que codificam proteínas responsáveis pela manutenção de estruturas e metabolismo básico da célula, como actina, tubulina (Choi *et al.*, 1991), 18S rRNA e 28S rRNA (Bhatia *et al.*, 1994). Genes com essa função não devem variar sua expressão nas células, tecidos, mudanças de meio e sob diferentes condições de tratamento em um determinado experimento. Porém, sua estabilidade pode variar consideravelmente e diversos estudos objetivam a escolha do gene mais adequado para cada situação (Vandesompele *et al.*, 2002; Czechowski *et al.*, 2005). Existem *softwares* que medem a

estabilidade dos genes-referência das amostras analisadas, dentre os quais pode-se citar: *GeNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004) e *NormFinder* (Andersen *et al.*, 2004).

Diante deste contexto, a compreensão de mecanismos de expressão de genes para a degradação de parede celular vegetal por *P. echinulatum* constitui-se em uma forma de ampliar os conhecimentos sobre este microrganismo, bem como fornecer dados para possibilitar a otimização de processos de produção dessas enzimas. Além disso, o estudo da expressão gênica das celulasas, hemicelulasas e swolenina fornece meios para compreensão da eficiência na hidrólise de resíduos lignocelulósicos, constituindo-se como um importante acesso biotecnológico para obtenção de moléculas que possam ser convertidas em produtos de interesse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem

Foi utilizada a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* obtida a partir da linhagem 9A02S1 (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. A linhagem 9A02S1 corresponde a um mutante parcialmente desreprimido a glicose, obtido por mutagênese (Dillon *et al.*, 2006), a partir da linhagem 2HH, isolada do trato intestinal do coleóptero *Anobium punctatum* (Carrau *et al.*, 1981). A linhagem S1M29 foi obtida por meio de mutagênese empregando peróxido de hidrogênio e seleção dos mutantes em meio suplementado com 2-deoxiglicose (Dillon *et al.*, 2011).

3.2 Crescimento e manutenção da linhagem fúngica

A linhagem foi crescida e mantida em agar-celulose, elaborado com 40% (v/v) de suspensão de celulose intumescida (2,5% m/v), 10% (m/v) de meio de sais (MS 10×), 0,2% (m/v) de proteose peptona (Oxoid L85), 1,8% (m/v) de agar e 50% (v/v) 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 (Dillon *et al.*, 2006).

As suspensões de celulose intumescida foram elaboradas a partir de 5 g de celulose Celufloc E[®], autoclavada em 60 mL de água e a suspensão mantida sob agitação recíproca, a 180 rpm, por 48 h, a 28°C e, após, completada para 200 mL com água destilada e armazenada a 4°C. O meio de sais foi elaborado baseado na formulação de Mandels & Reese (1956), composto por: 2% de KH₂PO₄, 1,4% de (NH₄)₂SO₄, 0,3% de CO(NH₂)₂, 0,3% de MgSO₄·7H₂O, 0,3% de CaCl₂, dissolvidos em água destilada acrescido de 1 mL de solução de micronutrientes (5% de FeSO₄·7H₂O; 1,56% de MnSO₄·H₂O; 1,48% de ZnSO₄·7H₂O; 2% g de CoCl₂ solubilizados em água destilada).

3.3 Condições de cultivo e produção proteica

O crescimento fúngico e a produção enzimática foram realizados em cultivos submersos, em triplicatas, utilizando-se frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio líquido (0,1% (m/v) de Prodex[®], 0,2% (m/v) de proteose peptona, 0,1% (v/v) de Tween[®] 80, 10% (v/v) de MS 10× e 90% (v/v) de água destilada) acrescido de 1% (m/v) de fonte de carbono com ação indutora

(celulose Celufloc E[®] ou bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor - BCA) e não indutora (glicose).

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, pertencente ao mesmo lote, foi gentilmente cedido pelo grupo de açúcar e etanol Usina Vale do Rosário (fundida com a Santa Elisa Vale), localizada em Morro Agudo, São Paulo, Brasil. Esta planta processa 250 toneladas de bagaço por dia, durante a época de colheita, para a alimentação do gado. O pré-tratamento foi feito com cerca de 1 tonelada de bagaço seco em um reator de aço inoxidável de 5000 L (Caldema Equipamentos Industriais, Sertãozinho, São Paulo, Brasil). O reator foi selado hermeticamente e injetado vapor até uma pressão de cerca de 1,53 MPa (equivalente a 200°C). Após 7 min de pressurização, o reator foi rapidamente despressurizado e a suspensão explodida a vapor foi descarregada em um recipiente de 8000 L, e, em seguida, recolhido em um recipiente cilíndrico. A fração sólida foi separada da fração líquida através da centrifugação da suspensão a 1100 rpm por 10 min em centrífuga semi-industrial de 100 L (Grisanti Máquinas Industriais Ltda, Ribeirão Pires, São Paulo, Brasil). No laboratório, o bagaço (fração sólida) foi seco durante 48 h à temperatura ambiente e mantido nesta condição até o momento do uso. A quantidade de BCA utilizada na elaboração dos meios de cultivo foi de 2,3%, o que corresponde a 1% de celulose, baseado no conteúdo de celulose desta biomassa que foi previamente caracterizada, que é de 43,6%, e ainda constitui-se de 8,75% de hemicelulose, 33,75% de lignina, além de extrativos, sais e outros componentes.

Os meios foram autoclavados a 1 atm por 15 min. Após resfriados, adicionou-se de 1,6 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ciprofloxacina e inoculados com 400 mg de massa úmida (correspondendo a 60 mg de massa seca) de micélio crescido em uma fonte de carbono neutra (glicerol), por 48 h (Ilmén *et al.*, 1997; Vaheri *et al.*, 1979). Os frascos foram mantidos a 28°C, sob agitação recíproca, a 180 rpm, até o sexto dia, sem ajuste do pH inicial. Foram realizadas coletas destrutivas diárias para as análises, sendo o caldo enzimático obtido por centrifugação a $3500 \times g$, durante 20 min, armazenado sob refrigeração para testes posteriores após a determinação do pH em pH-metro PHS-3B (Phtek) e, o micélio armazenado a -80°C em tubos de 15 mL estéreis.

3.4 Caracterização dos materiais celulósicos

3.4.1 Determinação do teor de cinzas

Quantidades de 300 mg de celulose Celufloc E[®] e BCA foram acondicionados em cadinhos de porcelana, previamente calcinados e tarados, sendo então calcinados em mufla a uma

temperatura de 575°C por 2 h, de acordo com as recomendações do relatório técnico NREL/TP-510-42622 (National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter *et al.*, 2008a). O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial.

3.4.2 Determinação dos compostos extraíveis

O teor de compostos extraíveis do BCA foi determinado com o uso do extrator Tecnal TE-044-8/50 a partir de uma quantidade conhecida de amostra empregando-se uma sequência de quatro solventes, diclometano, etanol:tolueno 1:2 (v/v), etanol 95% (v/v) e água quente, seguindo as recomendações do relatório técnico NREL/TP-510-42619 (Sluiter *et al.*, 2008b) com adaptações.

A quantificação dos compostos extraíveis da celulose Celufloc E[®] procedeu-se somente com etanol 95% (v/v) e água quente no mesmo equipamento. O percentual de cada extrato foi calculado pela perda de massa em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

3.4.3 Análise química dos substratos celulósicos

A composição dos substratos celulósicos utilizados nos cultivos foi realizada de acordo com o relatório técnico NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2011). Uma quantidade conhecida de amostra seca livre de compostos extraíveis (100 mg) foi tratada com 1 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v), a 25°C, por um período de 1 h, sob agitação constante. Após este tempo, a mistura foi diluída até uma concentração de 3% (v/v) em ácido sulfúrico e a suspensão aquecida em autoclave (118°C), por 1 h, para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Posteriormente, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch de porosidade 2 (30 mL) previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até peso constante e a porcentagem de lignina insolúvel em ácido foi determinada em relação à massa seca de amostra (Gomide & Demuner, 1986). O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 100 mL para determinação da lignina solúvel em ácido por espectrofotometria na luz ultravioleta (Dence, 1992).

A composição em carboidratos dos substratos celulósicos foi determinada no hidrolisado resultante. Alíquotas dos hidrolisados foram filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC20AD, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 20A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO20A e detectores modelos RID10A para índice de refração e SPD20A com rede de fotodiodos para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a

60°C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H_2SO_4 5 mmol.L^{-1} a uma vazão de 0,6 mL.min^{-1} . A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético, levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glicose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente nos seus respectivos derivados anidro. Os resultados obtidos foram expressos em relação à massa seca do material original.

3.5 Determinação do crescimento fúngico

A biomassa fúngica foi determinada indiretamente pela hidrólise enzimática da quitina da parede celular (Bittencourt *et al.*, 2002). Para tanto, 1 mL de amostra foi centrifugada por 20 minutos a $3500 \times g$, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de água destilada ao *pellet*. Centrifugou-se novamente por 20 minutos a $3500 \times g$. Após a retirada do sobrenadante, foram adicionado 3 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L^{-1} , pH 4,8, e as amostras foram tratadas em ultrassom, por 60 min. Em cada amostra foi adicionado 2 mL da enzima Viscozyme L[®] 30 % (v/v) permanecendo incubada a 45°C, por 24 h. Em seguida, as amostras foram mantidas a 100°C, por 10 min, sendo centrifugadas por 20 min, a $3500 \times g$, após o resfriamento.

Para a determinação do teor de N-acetil-D-glicosamina resultante da hidrólise da quitina foi utilizada a metodologia segundo Aidoo *et al.* (1981). Em tubos contendo 1 mL da amostra hidrolisada e centrifugada foi adicionado 1 mL da solução de 3% de acetilacetona em carbonato de sódio 1,25 mol.L^{-1} . As amostras foram fervidas por 20 min. Após o resfriamento, adicionou-se 6 mL de etanol e 1 mL 4-dimetilaminobenzaldeído – DMAB - (8% de DMAB, 50% de etanol e 50% de HCl). Os tubos foram incubados a 65°C, por 10 min e, em seguida, realizou-se a leitura da absorbância a 530 nm. As concentrações miceliais foram obtidas a partir de curva padrão construída com micélio seco com concentrações entre 0 e 30 g.L^{-1} .

3.6 Determinação das proteínas solúveis

Para a determinação quantitativa das proteínas solúveis, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976) com modificações – cuja solução para reação é 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 0 e 100

mg.L⁻¹. Para a determinação das proteínas solúveis das amostras, a reação constituiu-se de 10 µL da amostra diluída em 90 µL de água destilada com 200 µL do reagente de Bradford. Transcorridos 10 min, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

3.7 Determinação de atividades enzimáticas

3.7.1 Determinação de *filter paper activity*

Para a dosagem de celulasas totais foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA) conforme recomendação da Comissão de Biotecnologia da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), de acordo com Mandels *et al.* (1976) adaptada conforme Camassola & Dillon (2012b).

Foram utilizadas placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL). Em cada poço da placa, foram adicionados 50 µL de solução enzimática e 100 µL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8. A placa foi colocada em banho a 50°C, durante 10 min, 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 min em banho a 50°C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL 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 acondicionada em banho a 100°C, por 5 min.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de amostra em placa de poliestireno cristal de 96 poços (com volume individual de 0,4 mL) e 200 µL 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 0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8 com concentrações de 0, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg.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 µmol.L⁻¹ de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

3.7.2 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 mol.L^{-1} , pH 4,8, em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi colocada em banho a 50°C, por 10 min, 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% (m/v) - preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L^{-1} , 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 min em banho a 50°C. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μL da solução do reagente DNS e a placa colocada em banho a 100°C, por 5 min. A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação da atividade de endoglicanases procederam tal como para FPA, utilizando-se curva de calibração de glicose nas concentrações de 0 a 2,0 mg.mL^{-1} . As unidades de endoglicanases foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

3.7.3 Determinação de celobioidrolases

Para a determinação da atividade de celobiohidrolases foi utilizado como substrato o *p*-nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (*p*NPC), empregando-se a metodologia adaptada de Deshpande *et al.* (1984). Uma mistura reacional contendo 10 μL de solução enzimática e 90 μL de *p*-nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (*p*NPC 1 mg.mL^{-1} em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L^{-1} , pH 4,8) foi incubada a 50°C, por 30 min, sendo interrompida com a adição de 200 μL de uma solução Na_2CO_3 10% (m/v). As amostras foram estimadas espectrofotometricamente por leitura da absorbância de *p*-nitrofenol, a 405 nm.

As concentrações de celobiohidrolases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de *p*-nitrofenol 2 mmol.L^{-1} em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L^{-1} , pH 4,8, com concentrações de 0, 0,04, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2, 1,6 e 2 mmol.L^{-1} , por meio de regressão linear. Uma unidade de atividade de celobiohidrolase foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de *p*-nitrofenol por minuto.

3.7.4 Determinação de β -glicosidases

Para a determinação da atividade de β -glicosidases foi utilizado como substrato o *p*-

nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG), empregando-se a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma mistura reacional contendo 10 μ L de solução enzimática e 90 μ L de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG 4 mg.mL⁻¹ em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8) foi incubada a 50°C, por 30 min, sendo interrompida com a adição de 200 μ L de uma solução 10% (m/v) de Na₂CO₃. A leitura das amostras foi estimada espectrofotometricamente pela absorvância de *p*-nitrofenol, a 405 nm.

As concentrações de β -glicosidases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de *p*-nitrofenol 2 mmol.L⁻¹ em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8 assim como descrito anteriormente para celobiohidrolases. Uma unidade de atividade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 μ mol.L⁻¹ de *p*-nitrofenol por minuto.

3.7.5 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 90 μ L de solução de xilana de madeira de faia (*Fagus*) 1% (m/v) - preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8, e previamente aquecida a 50°C. A placa foi mantida em banho a 50°C, por 5 min. A reação foi interrompida adicionando-se 300 μ L de DNS e a placa mantida em banho a 100°C, por 5 min.

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 absorvância 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 10 mmol.L⁻¹ em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8 com concentrações de 0, 1, 2,5, 5, 7,5 e 10 mmol.L⁻¹, por meio de regressão linear. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol.L⁻¹ de xilose por minuto.

3.8 Perfil eletroforético das proteínas extracelulares

Para obter-se o perfil das proteínas extracelulares de *P. echinulatum* S1M29, foram realizadas eletroforeses 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 4%, e 6,0 cm de gel para separação das proteínas 12%, utilizando a metodologia de Laemmli (1970).

O tampão da amostra para proteína nativa possui a seguinte composição: 26% (v/v) de glicerol, 21% (v/v) de solução SDS 10%, 2% (v/v) de solução azul de bromofenol 0,5%, 13% (v/v) de tampão Tris-HCl pH 6,8 e 37,5% de água destilada, sendo acrescentado à amostra a ser aplicada no gel.

As amostras foram precipitadas com acetona gelada na proporção volumétrica 1:2, sendo 200 μ L para as amostras obtidas dos meios com celulose Celufloc E[®] e BCA e 300 μ L para as formuladas com glicose. Esta mistura foi mantida a -20°C por pelo menos 15 min. 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 30 μ L de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel.

Como marcador de massa molecular foi utilizado o marcador *Precision Plus Protein™ Standards All Blue* (Bio Rad). Para a corrida eletroforética, foi utilizada uma solução tampão Tris-glicina pH 8,3, composta de 3,03% (m/v) de Tris base; 14,4% (m/v) de glicina e 1% (m/v) de SDS, diluídos em água destilada (Laemmli, 1970). A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical *Bio Rad Mini-PROTEAN® Tetra System*, a 200V, por tempo suficiente para a corrida total das amostras.

As bandas foram reveladas com a incubação do gel durante 30 min em uma solução de 0,2% (m/v) de *Coomassie Brilliant Blue G 250*, 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético. Após, o gel foi lavado com água destilada e imerso em uma solução de 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético, por 30 min. Este processo foi realizado sob agitação de 60 rpm e repetido até que as bandas fossem visualizadas. O registro dos géis deu-se através do escaneamento dos mesmos em ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) e fotodocumentação em Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ Imaging System (Bio Rad).

3.9 Zimogramas

3.9.1 Zimogramas para endoglicanases

A metodologia para a detecção de atividade de endoglicanases em gel de poliacrilamida foi baseada em Sun *et al.* (2008), a partir de um sistema semidesnaturante com o uso de SDS. As proteínas foram inicialmente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com 0,15% de carboximetilcelulose (CMC-Na). Foram utilizados os volumes de 2, 2 e 10 μ L das amostras obtidas a partir dos meios com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose, respectivamente, sendo os mesmos completados para 30 μ L com o tampão de amostra. Após a corrida, o gel foi lavado em

solução contendo de isopropanol 25% em tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8, por 30 min. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo somente tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8, por 10 min, e incubado a 40°C . O gel foi corado com uma solução 0,2% (m/v) de vermelho de congo, por 30 min, e descorado com 1 mol.L^{-1} de solução de NaCl. As bandas claras em fundo vermelho é a indicação da atividade despolimerizante em carboximetilcelulose.

3.9.2 Zimogramas para celobiohidrolases

A detecção de atividade de celobiohidrolases em gel de poliacrilamida foi baseada na metodologia de Schwarz *et al.* (1987). Os géis foram elaborados tal como descrito no item 3.8. As amostras foram precipitadas com acetona gelada na proporção volumétrica 1:2, sendo $100 \mu\text{L}$ para as amostras obtidas dos meios com celulose Celufloc E[®] e BCA e $200 \mu\text{L}$ para as formuladas com glicose. Esta mistura foi mantida a -20°C por pelo menos 15 min. Após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a $9800 \times g$ e o sobrenadante descartado (Blum *et al.*, 1987). O *pellet* foi solubilizado em $30 \mu\text{L}$ de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel.

Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados por 30 min em solução de isopropanol 25% (v/v), seguido de incubação por 30 min em tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8, e então submersos em solução 1 mmol.L^{-1} de MUC em tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8. Após 30 min de incubação a 50°C , a atividade de celobiohidrolases foi detectada por fluorescência com iluminação a 340 nm, consequência da liberação do grupo fluorescente.

3.9.3 Zimogramas para β -glicosidase

Para detectar atividade de β -glicosidase a metodologia baseou-se em Kwon *et al.* (1994). O gel de poliacrilamida elaborado tal como descrito no item 3.8, foi submetido à corrida eletroforética após a aplicação das amostras.

As amostras foram precipitadas com acetona gelada na proporção volumétrica 1:2, sendo $200 \mu\text{L}$ para as amostras obtidas dos meios com glicose e BCA e $400 \mu\text{L}$ para as formuladas com celulose Celufloc E[®]. Esta mistura foi mantida a -20°C por pelo menos 15 min. 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 $30 \mu\text{L}$ de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel.

Após a corrida, o gel foi submerso em solução de isopropanol 25% (v/v) por 30 min, sendo em seguida lavado com tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8. Após a lavagem o gel foi incubado sob agitação de 60 rpm, por 40 min, em solução de 0,2% (m/v) de esculina em tampão

citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8 e, em seguida, em solução 1% (m/v) de cloreto férrico por 10 min, a 37°C . Bandas escuras em um fundo claro são indicativas da atividade de β -glicosidase, sendo os géis fotodocumentados imediatamente.

3.9.4 Zimogramas para xilanases

A metodologia para a detecção de atividade xilanase em gel de poliácridamida foi a mesma empregada para endoglicanases, descrita no item 3.9.1, porém, sendo adicionada solução de xilana de madeira de faia (*Fagus*) 1% (m/v) em substituição a CMC na elaboração do gel. Foram utilizados os volumes de 50, 10 e 10 μL das amostras obtidas a partir dos cultivos formulados com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose, respectivamente.

3.10 Estudos moleculares

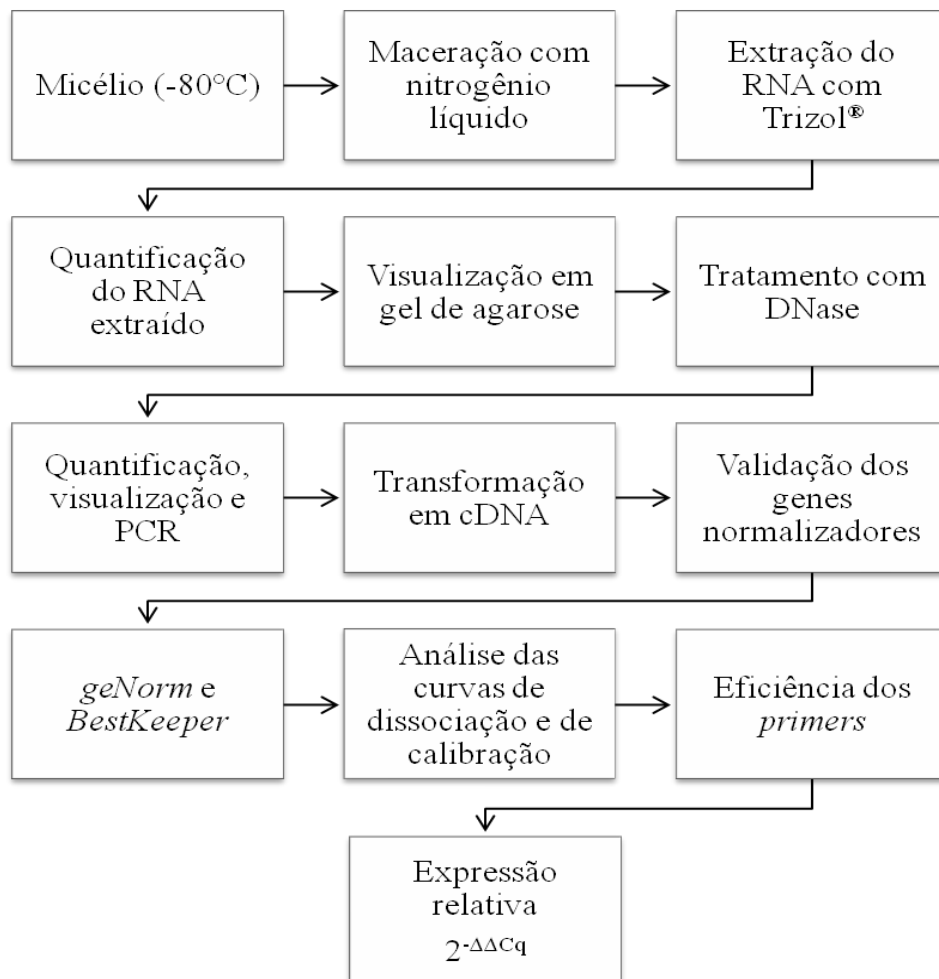


Figura 9. Fluxograma representando a metodologia empregada na análise de expressão gênica da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*.

3.10.1 Extrações e preparações de RNAs de *Penicillium echinulatum* para estudo de expressão gênica

A Figura 9 apresenta um fluxograma referente a metodologia utilizada nos estudos moleculares. O RNA total das amostras coletadas em 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 h de cultivo submerso de *P. echinulatum*, foi extraído a partir da maceração do micélio em nitrogênio líquido seguido da extração com o reagente Trizol[®] (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra de RNA foi quantificada em espectrofotômetro a 260 e 280 nm (razão entre as medidas de absorvância 260/280nm entre 1,8 e 2,0) e avaliada quanto a possível contaminação com DNA genômico e verificada a sua integridade por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio 0,01 g.mL⁻¹.

O material extraído foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega), onde 20 µg da amostra de RNA foi acrescida de 15 µL de tampão 10x e 20 µL de DNase (desoxirribonuclease), completando-se para uma volume de 150 µL com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Esta solução foi incubada por 30 min, a temperatura ambiente, após, acrescida de 20 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) 25 mmol.L⁻¹, incubada novamente por 10 min, a 65 °C, e armazenada a -20°C. Em seguida, procedeu-se a precipitação da amostra adicionando-se 17 µL de NaAc 3 mol.L⁻¹, pH 5,2, e 425 µL de etanol 100%, ficando esta mistura *overnight* a -20°C. Após as amostras foram centrifugadas por 40 min, a 4°C, 9800 × g, lavadas duas vezes com 400 µL de etanol 75% (v/v) centrifugando durante 10 min, a 4°C, 9800 × g a cada lavagem. Após secar por 30 min, a temperatura ambiente, as amostras foram ressuspensas em água tratada com DEPC. Para descartar a contaminação da amostra com DNA, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) como apresentada no Quadro 2.

Quadro 2. Composição da reação de PCR para verificação da pureza da amostra de RNA.

	Volume (µL)	Concentração final	Concentração estoque
Água milli-Q	36,3 µL		
<i>Buffer</i>	5 µL	1 ×	10 ×
MgCl ₂	1,5 µL	1,5 mmol.L ⁻¹	50 mmol.L ⁻¹
dNTPs	1 µL	0,25 mmol.L ⁻¹	12,5 mmol.L ⁻¹
<i>Primer Actina Forward</i>	1 µL	0,2 mmol.L ⁻¹	10 mmol.L ⁻¹
<i>Primer Actina Reverse</i>	1 µL	0,2 mmol.L ⁻¹	10 mmol.L ⁻¹
Taq polimerase	0,2 µL	0,02 U.µL ⁻¹	5 U.µL ⁻¹
RNA	4 µL	0,16 ng.µL ⁻¹	2 ng.µL ⁻¹
Volume total	50 µL		

Esta reação passou por um programa de amplificação em termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) de 4 min, a 94°C, seguido de 40 ciclos de 45 s, a 94°C, 1 min e 30 s a 67°C e 2 min a 72°C, finalizando com 5 min a 72°C. O produto obtido foi visualizado em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com brometo de etídio 0,01 g.mL⁻¹.

3.10.2 Obtenção de cDNA

A reação foi realizada em gelo em duas etapas: (1) foram utilizados 2 µg de amostra de RNA total extraído e tratado com DNase, que foi adicionado de 1 µL de Oligo (dT)₂₀ 50 mmol.L⁻¹, 1 µL do tampão de anelamento, completando para 8 µL com água tratada com DEPC. Este mix foi incubado em termociclador a 65°C, por 5 min e em seguida acondicionado em gelo por 1 min. Centrifugaram-se os tubos brevemente; (2) em cada amostra foram adicionados 10 µL do mix composto por dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfato) 10 mmol.L⁻¹ e MgCl₂ 10 mmol.L⁻¹, e 2 µL de SuperScript[®]III/RNaseOUT[™] mix (Invitrogen), totalizando 20 µL de reação. Os tubos foram levemente agitados e na sequência passaram por uma breve centrifugação, incubando-se em seguida por 50 min, a 50°C, após 5 min, a 85°C, e por fim, acondicionou-se imediatamente em gelo. As amostras de cDNA na concentração de 100 ng.µL⁻¹ foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

3.10.3 Real Time (qRT-PCR)

A técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) foi aplicada para a avaliação da expressão de genes de endoglicanases, celobiohidrolase, β-glicosidase, xilanase e swolenina, a partir da expressão de um gene normalizador como controle interno.

Todos os procedimentos de biologia molecular foram realizados com material esterilizado *overnight* a 180°C, ou lavado com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) por 20 min, sendo usadas ponteiras de polipropileno com filtro aerossol.

3.10.3.1 Validação de genes normalizadores

Para a realização da análise de expressão dos genes para celulasas, β-glicosidade, xilanase e swolenina, primeiramente foi realizada uma seleção, teste e validação de diversos *primers* de genes candidatos a controle interno (Quadro 3) para verificar sua especificidade e eficiência, cujas sequências foram obtidas a partir de dados disponíveis no GenBank – NCBI (National Center for

biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para o teste foi realizada uma reação com um volume final de 10 μL , sendo composta por: 1 μL de *primer* Forward, 1 μL de *primer* Reverse, 5 μL de SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 μL de água tratada com DEPC e 1 μL de cDNA 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Foi realizado também o controle negativo correspondente a 9 μL do mix acrescido de 1 μL de água tratada com DEPC. A reação passou por um programa de amplificação de 20 s, a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C, por 1 min e 1 min na temperatura ideal da cada par de *primer*. Ao final verificou-se a curva de dissociação (*melt*) obtida por 15 s nas seguintes temperaturas: 95°C, 65°C e 95°C. A curva de dissociação é necessária para a certificação da especificidade do *primer* à molécula alvo e identificação de possíveis contaminações na reação. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

As eficiências dos *primers* foram calculadas com a construção de uma curva padrão com diluições seriadas da amostra de cDNA (100, 10, 1, 0,1, 0,01 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) através da fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. O coeficiente angular da reta (*slope*) indica a eficiência da PCR e seu valor ideal deve ser 2, o que corresponde a 100%. A estabilidade dos genes candidatos a controle interno foi avaliada pelos softwares *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004) e *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002).

O software *geNorm* é uma Aplicação Básica Visual (VBA) para *Microsoft Office Excel* que calcula uma medida (M) de estabilidade de expressão para cada gene controle em um dado grupo de amostras, através da conversão dos valores de Cq (ciclo de quantificação – número de ciclos em que o sinal de fluorescência gerado pela amplificação cruza o nível limiar de detecção) em quantidades relativas (Vandesompele *et al.*, 2002). O gene referência com melhor estabilidade é o que possui o menor valor de M. Já o software *BestKeeper* é uma ferramenta do *Microsoft Office Excel* que determina os genes de expressão mais estáveis com base no coeficiente de correlação dos valores de Cq dos candidatos a genes referência (Pfaffl *et al.*, 2004).

Os *primers* selecionados foram os que apresentaram curva de dissociação, valores válidos de Cq e estabilidade adequada.

Quadro 3. Relação dos *primers* para os genes candidatos a controle interno.

Gene	Primer	Ação	Forward/Reverse
RNA 18S ribossomal	<i>18s</i>	Produção da pequena unidade ribossomal citosólica	GGGTCCAACCTCCCACCCGT GGGCCCAACACACAAGCCGT
β -actina	<i>actb</i>	Proteína estrutural do citoesqueleto	AACCTTCTCTCGAAACCCCTCCA GTCGTGTACTGTGAGGTGCATACTT
β -2-microglobulina	<i>b2m</i>	Cadeia beta do complexo de histocompatibilidade de moléculas classe I	GCTATCCAGAAAACCCCTCAA CATGTCTCGATCCCAGTAGACGGT
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>g3p</i>	Oxirredutase da glicólise e gliconeogênese	ACTCAACTGGAGTCTGTCTCG TGACATAGAGGACTCCCAGCA
Fator de transcrição	<i>tf</i>	Liga-se ao DNA permitindo que haja a ligação com a enzima RNA polimerase permitindo a transcrição	ATTGGTCGACAGCTTGGAGG GCCGAGGACCCCAATAACA
Glucuronidase	<i>gus</i>	Catalisa a hidrólise do ácido glucurônico	ATCCACGATCACGTCCGGATG GATAGTCCCCTTCGAGCCTG
Fator de alongamento eucariótico	<i>eef</i>	Fornecimento enzimático de aminoacil tRNA ao ribossomo	TTTACTCTTGGTGTGAAGCAGAT GACTTCTTCACGATTTTCATCGTAA
β -tubulina	<i>tub</i>	Participação no processo de divisão celular	GCTGACCACCTAGCTTTGG AGGGAACCTTAGGCAGCATGT
Ubiquitina 5	<i>ubq</i>	Regulação de proteínas através de marcações em proteínas para serem degradadas	ACCACTTCGACCGCCACTACT ACGCCTAAGCCTGTGGTT
RNA 25S ribossomal	<i>25s</i>	Formação das ligações peptídicas durante a síntese de proteínas	AAGGCCGAAGAGGAGAAAGGT CGTCCCTTAGGATCGGCTTAC
Endonuclease apurínica/apurimidínica	<i>a/a</i>	Reparação de nucleotídeos danificados ou incompatíveis no DNA	AGCACGCCCAATGGAGACA TGCTGTGCATGGACAACCTGTGCA
Fator de iniciação de tradução de eucariotos	<i>ef</i>	Envolvimento no processo de tradução e degradação de mRNA e crescimento celular	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>g3</i>	Oxirredutase da glicólise e gliconeogênese	CGGCTTCGGTTCGTATTGG TGGAGGAGGGGATGATGTT
β -tubulina	<i>tb</i>	Participação no processo de divisão celular	AGCGGTGACAGTACGTTCC ACCCTTGGCCCAGTTGTTAC
Calmodulina	<i>cal</i>	Sinalização de cálcio em células eucarióticas e regulação da atividade de inúmeras proteínas com diversas funções celulares	AGTCGAGGCCACAACAGTCT CGTTGATCATGTCTGCAAC
Adenosina quinase	<i>ak</i>	Metabolismo de purinas que fosforilam a adenosina em AMP através de hidrólise do ATP	CTGGAGGACTCCGTTGACAT TCCCAGAGTGGAAAATCCTG
ATP sintase cadeia gama	<i>atp</i>	Síntese de ATP	AACCTCATTATGCGCCTCAC GGGCTTCTGAAGCTTTTCT
Ribonucleotídeo difosfato redutase	<i>ndp</i>	Atuação na fase S da divisão celular, na qual ocorre a síntese do DNA	ACMTACTCYCTBCTSATTGA TTCTCVAASAAGTTSCT
Glutamato sintase precursor	<i>gt</i>	Síntese de ácido glutâmico	CACGKTATCAACTTCTTCTAC ACCRCGGAAGWAGCAGGTA
Ribonucleotídeo redutase	<i>rnr</i>	Atuação na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos durante a divisão celular	GAGACMTACTCYCTBCTSAT CACCRGCCTTCTGGTAGT
Fator de transcrição PACC	<i>pacc</i>	Liga-se aos promotores de genes expressos em ambientes alcalino para ativar a transcrição, e aos promotores de genes expressos em ambientes ácidos para inibi-los	GCHGATGAYTCGGTSCT TCATTGGDGDARATGRTA
Ubiquitina	<i>ub</i>	Regulação de proteínas através de marcações em proteínas para serem degradadas	CGGTGGTGGAAACTAATGTC CAGGATCGGTTGTTATTTCATTGTAG
β -tubulina	<i>bt</i>	Participação no processo de divisão celular	CAACAACATCCAGACCGC GGGTATTGCTGCCAGATATC

3.10.3.2 Expressão de celulasas, β -glicosidase, xilanase e swolenina

Os *primers* selecionados para o estudo de expressão gênica encontram-se descritos no Quadro 4, sendo que os *primers* para endoglicanase (*egl1*), celobiohidrolase (*cbh1*), β -glicosidase (*bg11*), swolenina (*swol1*), foram desenhados a partir de sequências de cDNA dos respectivos genes

pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília em estudos prévios, enquanto os *primers* para xilanase (*xyl1*) e endoglicanases (*egl2*, *egl3* e *egl4*) foram obtidos a partir de homologias com sequências disponíveis no GenBank – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Quadro 4. Relação dos *primers* utilizados no estudo da expressão gênica na reação de qRT-PCR.

GENE	Primer	Forward	Reverse
Endoglicanase	<i>egl1</i>	5' CGG TTG ATC CCC AAC TCA AT 3'	5' ACC GAG CGA GGT GAT GAA GT 3'
Endoglicanase	<i>egl2</i>	5' TAC GAG ATG CAC CAR TAY CT 3'	5' GGN CCD GCD GCC CAC CA 3'
Endoglicanase	<i>egl3</i>	5' CTA CCA TGC GGC GAA AAT GG 3'	5' GAC GAC GAT GAC GAC GAT GA 3'
Endoglicanase	<i>egl4</i>	5' GGC GGT GGT GTC GGT ATA TT 3'	5' GTA GAG GGC TTC TGA GGC TG 3'
Celobiohidrolase	<i>cbh1</i>	5' CCT TTG GCG ACA CTG ATG ATT T 3'	5' TCA TCC CAG AGA CTC ATG ACC A 3'
β -glicosidase	<i>bgl1</i>	5' GGC TCC GTC ATG TGT TCG TA 3'	5' TCC CTT GAG CAG CTT GTT GA 3'
Xilanase	<i>xyl1</i>	5' TAC GTC AAG CAG CTC AGC AA 3'	5' CAT TTC GCG ATG GCT CTG TG 3'
Swolenina	<i>swol</i>	5' ACG GCC AAC AGA TTG TGA ATG 3'	5' GTG AAC TGC ACT CCC ATG TCA A 3'

O *primer* para o gene denominado *egl2* foi obtido a partir de homologias de endoglicanases gerais entre diversos fungos filamentosos produtores de celulases, enquanto que *egl3* pertence à família glicosil hidrolase 7 (GH 7) sendo definido por alguns autores como *cel7b* ou endoglicanase I (EG 1) (Penttilä *et al.*, 1986). Já o gene *egl4* corresponde ao gene *cel45* ou endoglicanase V, pertencente a família GH 45 (Saloheimo *et al.*, 1994), todos apresentando atividade endoglicanásica (Martinez *et al.*, 2008; <http://www.cazy.org>). Já o gene *xyl1* pertence a família GH 43 correspondendo a uma endo-1,4- β -xilanase (<http://www.cazy.org>).

Inicialmente foi realizado um teste de validação dos *primers* para os genes a serem avaliados. O teste de validação dos *primers* teve como objetivo verificar a eficiência dos *primers*, a formação de dímeros através da análise da curva de calibração e a determinação da diluição ideal dos cDNAs a partir da verificação da curva de calibração. Para tanto, os cDNAs foram diluídos de forma seriada em água tratada com DEPC para 5 concentrações (100, 10, 1, 0,1, 0,01 ng. μ L⁻¹). Cada *primer* foi utilizado na concentração de 2,5 μ mol.L⁻¹. A reação teve um volume final de 10 μ L, sendo composta por: 1 μ L de *primer* Forward, 1 μ L de *primer* Reverse, 5 μ L de Fast EvaGreen® Master Mix (Biotium), 2 μ L de água tratada com DEPC e 1 μ L de cDNA. Foi realizado também o controle negativo correspondente a 9 μ L do mix acrescido de 1 μ L de água tratada com DEPC. A reação passou por um programa de amplificação de 20 s, a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C, por 1 min e 1 min na temperatura ideal da cada *primer*. Ao final verificou-se a curva de dissociação obtida por 15 s nas seguintes temperaturas: 95°C, 65°C e 95°C. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

Para o estudo da expressão dos genes de endoglicanases, celobiohidrolase, β -glicosidase, xilanase e swolenina, as amostras de cDNA de *P. echinulatum* provenientes dos cultivos submersos realizados com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose, foram incorporadas em uma reação com volume final de 10 μ L, sendo composta por: 1 μ L de *primer* F, 1 μ L de *primer* R, 5 μ L de Fast EvaGreen[®] Master Mix (Biotium), 2 μ L de água tratada com DEPC e 1 μ L de cDNA 10 ng. μ L⁻¹. Os componentes da reação foram pipetados em placa de 48 poços Eco[™] plates (Illumina[®]) (20 μ L). A placa com as amostras foi selada com adesivo Eco[™] Adhesive Seals (Illumina[®]), centrifugada a 3000 $\times g$ por 5 min e colocada em Eco[™] Real-Time PCR (Illumina[®]), com a seguinte programação: etapa inicial de incubação a 50°C, por 2 min, ação da polimerase a 95°C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de 95°C, por 1 min e 1 min na temperatura ideal da cada *primer*. Ao final verificou-se a curva de dissociação obtida por 15 s nas seguintes temperaturas: 95°C, 65°C e 95°C. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

A análise dos perfis de expressão dos genes foi feita por quantificação relativa por meio da metodologia $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen, 2001) pelo Eco[™] System Software (Illumina[®]) com o uso de um gene de referência previamente selecionado. De acordo com a metodologia descrita por Livak & Schmittgen (2001) é determinada a quantidade de acúmulo de transcritos através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ considerando as equações 1 e 2:

$$\Delta Cq = Cq \text{ (alvo)} - Cq \text{ (referência)} \quad (1)$$

onde ΔCq corresponde à diferença entre o Cq do gene alvo e o Cq do gene de referência.

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ (amostra)} - \Delta Cq \text{ (calibrador)} \quad (2)$$

onde $\Delta\Delta Cq$ corresponde à diferença entre o ΔCq da amostra de interesse e o ΔCq da amostra calibradora (amostra de 0h).

3.11 Análise estatística

Os resultados das atividades enzimáticas foram avaliados estatisticamente pela análise de variância e pós-teste de Tukey para $p < 0,05$ utilizando o programa Graph Pad Prism 5.01.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado utilizando-se celulose Celufloc E[®] como indutor padrão de celulasas, glicose como padrão repressor e BCA como fonte de lignocelulose por ser uma das biomassas mais amplamente aplicadas em estudos de produção de enzimas lignocelulolíticas e processos de hidrólise.

A partir das análises realizadas com os micélios e os caldos enzimáticos produzidos por meio dos cultivos com celulose Celufloc E[®], BCA ou glicose como única fonte de carbono disponível para o fungo *P. echinulatum* S1M29, são apresentados a seguir os dados de caracterização dos materiais celulósicos utilizados, crescimento micelial, atividades enzimáticas, perfis proteicos e enzimáticos e expressão gênica de celulasas, β -glicosidases, xilanases e swoleninas.

4.1 Caracterização dos materiais celulósicos

Na composição química do bagaço de cana-de-açúcar existem componentes não glicídicos que não estão ligados diretamente à parede celular. Estes metabólitos secundário, denominados compostos extraíveis, são substâncias de baixa massa molar que estão envolvidas em diversas atividades metabólicas da planta, como a defesa contra organismos invasores e a síntese de macromoléculas de função estrutural ou de reserva (D'Almeida, 1988).

Para caracterizar estes metabólitos, foram realizadas extrações com diferentes solventes, sendo que $2,53 \pm 0,06\%$ foi extraído com o uso de diclorometano; $8,10 \pm 1,84\%$ com etanol:tolueno 1:2; com etanol 95% foi possível extrair $6,07 \pm 0,72\%$ e somente $1,80 \pm 0,56\%$ com uso de água, totalizando 18,5% de compostos extraíveis no BCA. A caracterização da celulose Celufloc E[®] revelou um total de compostos extraíveis de 6,3%, sendo $2,3 \pm 0,14\%$ durante a extração com etanol 95% e $4,00 \pm 0,14\%$ com água. Os percentuais totais de compostos extraíveis encontram-se na Tabela 1.

Lignina insolúvel em ácido e cinzas somente foram detectadas no BCA, em pequena quantidade. Já a celulose Celufloc E[®] apresentou uma quantidade mais elevada de lignina solúvel em ácido, evidenciando ainda, maior quantidade de anidroglicose e de anidroxilose (Tabela 1).

Tabela1. Percentual de compostos obtidos na caracterização da celulose Celufloc E[®] e do BCA.

Caracterização	Celulose Celufloc E [®]	BCA
Compostos extraíveis	6,30%	18,50%
Cinzas	ND	1,50 ± 0,88%
Lignina insolúvel em ácido	ND	22,55 ± 3,51%
Lignina solúvel em ácido	11,61 ± 0,86%	2,48 ± 1,14%
Anidroglicose	71,03 ± 7,11%	40,79 ± 1,50%
Anidroxilose	13,19 ± 1,00%	6,57 ± 0,02%

ND – não detectado.

Em estudos anteriores de caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado Ewanick & Bura (2011) relataram a obtenção de 2,9% lignina solúvel, 20,5 % lignina insolúvel, 4,1% de cinza, 41,3% de glucana e 21,8% de xilana. Carrasco *et al.* (2010) obtiveram dados equivalentes, 2,6% lignina solúvel, 20,6% lignina insolúvel, 1,9% de cinza, 43,4% de glucana e 24,3% de xilana. Gámez *et al.* (2006) destacam a obtenção de 23,9% lignina insolúvel, 38,9% glucana, exceto para xilana onde encontraram 20,6%, e além disso, detectaram a presença de 5,56% de arabinana. A comparação entre o bagaço de cana-de-açúcar não tratado e após o tratamento por explosão a vapor revelou uma redução de 54% no teor de xilana, enquanto houve um acréscimo de 17% de glucana e 54% de lignina (Gottschalk *et al.*, 2010).

4.2 Crescimento fúngico

A massa micelial desenvolveu-se de forma homogênea, condição favorecida pela agitação do meio, não havendo a formação de *pellets*, o que segundo Palma *et al.* (1995) tornaria o micélio metabolicamente inativo, além de dificultar o acesso aos indutores.

A determinação do crescimento fúngico foi realizada indiretamente pela hidrólise enzimática da quitina da parede celular. A Figura 10 apresenta estes resultados obtidos a partir dos diferentes meios de cultivo utilizados. É possível verificar que, por ser um monossacarídeo facilmente metabolizado, a glicose proporcionou crescimento mais rápido em relação aos cultivos com celulose Celufloc E[®] ou BCA, alcançando o pico de $5,50 \pm 1,18 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 h de cultivo. Verifica-se, porém que após este pico ocorre uma queda, seguida da manutenção da concentração de biomassa.

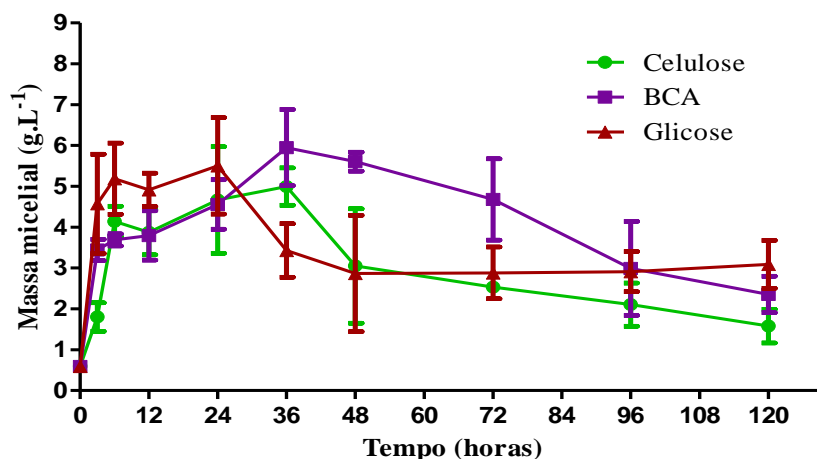


Figura 10. Concentração da massa micelial de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos submersos utilizando diferentes fontes de carbono como substrato, obtida através da hidrólise enzimática da quitina da parede celular.

O aumento micelial no meio elaborado com glicose coincide com a queda no valor do pH do caldo de cultivo (Figura 11). A queda nos valores de pH pode estar relacionada ao aumento do metabolismo celular, como já relatado por Sternberg & Dorval (1979), para *T. reesei*. A redução dos valores do pH nas etapas iniciais ocorre possivelmente 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.

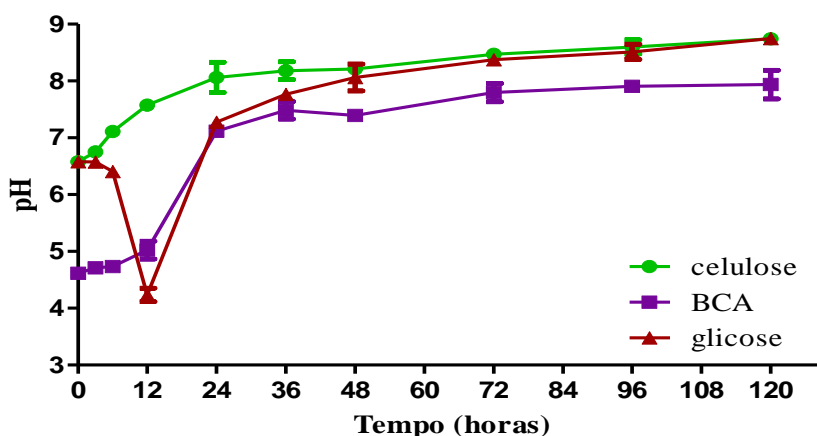


Figura 11. Variação dos valores de pH ao longo do cultivo de *Penicillium echinulatum* S1M29 com diferentes fontes de carbono.

A fim de investigar os possíveis compostos formados que provocaram as alterações nos valores de pH, as amostras dos diferentes meio de cultivo foram analisadas por HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) em coluna HPX-87H. Ao contrário do que foi relatado na

literatura, as variações do pH, nas amostras analisadas, parecem não ser resultado da produção de ácido orgânicos já que os mesmos não foram detectados (Figura 12).

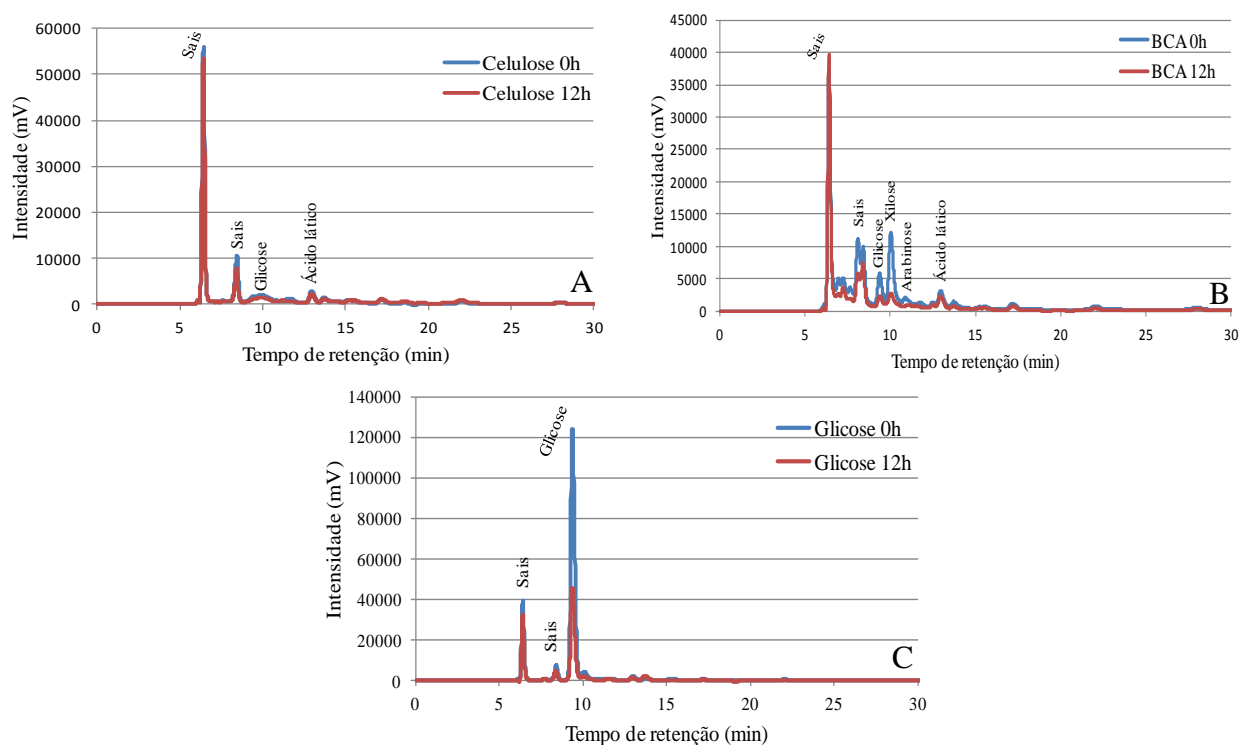


Figura 12. Avaliação das amostras do caldo de cultivo por HPLC, produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 em meios formulados com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose nos tempos 0 e 12 h.

Os cultivos elaborados com celulose Celufloc E[®] e BCA apresentam um perfil de crescimento fúngico semelhante até 24 h, evidenciando, em seguida, uma redução da concentração micelial em meio com celulose Celufloc E[®] em comparação ao comportamento apresentado em BCA. O cultivo que proporcionou um maior crescimento foi o suplementado com BCA, chegando no máximo a $5,94 \pm 0,92 \text{ g.L}^{-1}$ em 36 h de cultivo (Figura 10).

Os caldos de cultivo produzidos por *P. echinulatum* em celulose Celufloc E[®] e BCA apresentaram pH com valores entorno de 8 a partir de 24 h de cultivo, evidenciando que o pH inicial medido foi de 6,5 e 4,6 em meio com celulose Celufloc E[®] e BCA, respectivamente (Figura 10).

O estudo realizado por Reis *et al.* (2013b) apresenta a avaliação do efeito de diferentes valores de pH na secreção de celulases, β -glicosidases e xilanases por *P. echinulatum* S1M29 revelando uma maior atividade de endoglicanases e xilanases em valores de pH na faixa de 5,5 a 7,0. Enquanto que a atividade de β -glicosidases foi favorecida por valores de pH mais reduzidos, na

faixa de 4,0 a 6,0. No presente estudo os diferentes cultivos realizados apresentaram valores de pH elevados a partir de 24 h o que pode favorecer, portanto a secreção de endoglicanases e xilanases.

4.3 Determinação das proteínas solúveis secretadas por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso

Pela análise da Figura 13, verifica-se aparentemente que a concentração de proteínas solúveis no meio formulado com celulose Celufloc E[®] foi superior à do meio com glicose, com pequenos incrementos em 24 e 36 h, respectivamente. O meio formulado com BCA apresentou concentrações de proteínas solúveis significativamente superiores aos demais meios avaliados, possivelmente devido a maior disponibilidade de fonte de carbono assimilável e a diversificação de enzimas produzidas, sendo que o aumento iniciou-se em 24 h mantendo-se em ascensão até 120 h, onde a concentração chegou ao valor de $298,57 \pm 58,19 \text{ mg.L}^{-1}$. Considerando-se que o crescimento fúngico deu-se até 36 h de cultivo em todas as fontes avaliadas, o aumento nos valores detectados de proteínas podem ser resultado da lise celular.

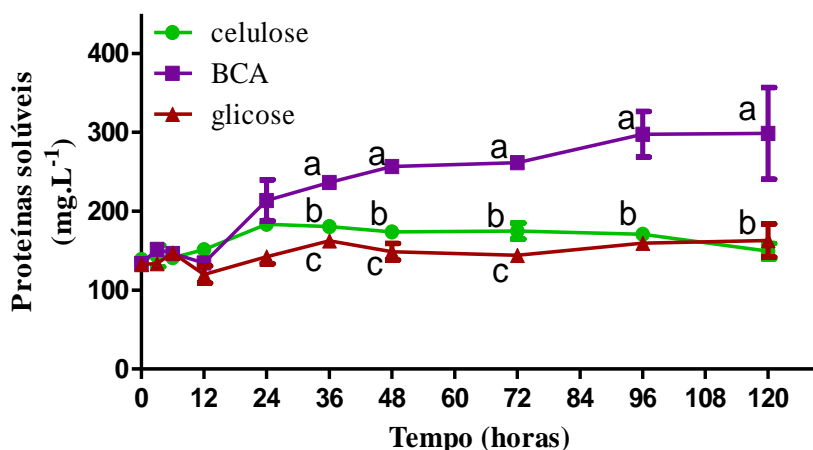


Figura 13. Concentração das proteínas solúveis nos caldos de cultivo produzidos por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos submersos utilizando diferentes fontes de carbono como substrato. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo horário não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4 Atividades enzimáticas de celulases, β -glicosidases e xilanases de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos submersos

Diversas classes de enzimas estão potencialmente envolvidas na degradação da biomassa. A aplicação de enzimas que catalisam a degradação da celulose à glicose e heteroxilana à pentose é considerada a estratégia mais viável para a produção de etanol de segunda geração eficiente em

termos de custos de processos (Himmel *et al.*, 2007). A secreção de celulases, β -glicosidasas e xilanases foi avaliada neste estudo.

Considerando-se que o crescimento micelial em todos os cultivos realizados deu-se em até 36 h de cultivo (Figura 10), a detecção das enzimas avaliadas, após este período, deve-se ao fato da liberação intracelular ou intramembrana ocorrida após a lise celular, justificando alguns picos enzimáticos detectados ao final do cultivo.

As maiores atividades de FPA foram verificadas no meio suplementado com BCA chegando ao pico de secreção máxima de celulases em 96 h de cultivo atingindo o valor de $0,29 \pm 0,03$ UI.mL⁻¹ (Figura 14), o que pode ser fruto de liberação por lise celular, uma vez que a partir de 36 h de cultivo ocorre um decréscimo na concentração micelial. Conforme observado, o meio formulado com celulose Celufloc E[®] apresenta um aumento na atividade de celulases a partir de 24 h de cultivo, com máximo de secreção em 48 h de cultivo correspondendo a $0,1 \pm 0,01$ UI.mL⁻¹. Após, iniciou-se uma queda nesta atividade enzimática. O meio formulado com glicose apresentou concentrações de FPA muito reduzidas. Os resultados mostram um aumento significativo na secreção de FPA no meio formulado com BCA em relação aos demais meios avaliados a partir de 48 h de cultivo, indicando o seu potencial de indutor.

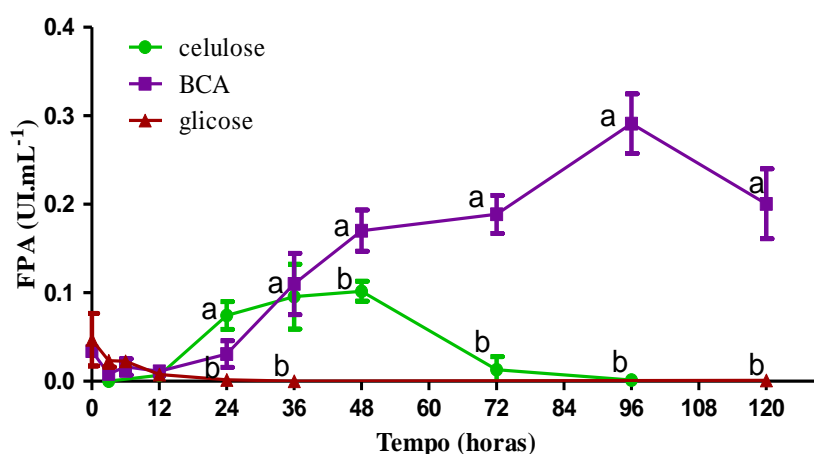


Figura 14. Atividades sobre papel filtro (FPA) determinadas a partir de cultivos submersos de *Penicillium echinulatum* S1M29 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo horário não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores obtidos de FPA podem ser considerados baixos em relação aos verificados em Dillon *et al.* (2011), com esta mesma linhagem, entretanto podem ser explicados em função do meio de cultivo utilizado que continha sacarose e farelo de trigo.

A secreção de endoglicanases mensurada nos diferentes cultivos realizados é apresentada na Figura 15. O meio formulado com BCA apresentou as maiores atividades enzimáticas ($2,42 \pm 0,12$ UI.mL⁻¹ em 120 h), porém estas atividades foram tardias, com produtividade de $0,02$ UI.mL⁻¹h⁻¹. Já o meio formulado com celulose Celufloc E[®], embora tenha apresentado menores atividades ($1,45 \pm 0,37$ UI.mL⁻¹ em 36 h), apresentou maior produtividade ($0,04$ UI.mL⁻¹h⁻¹). Resultado oposto foi observado no estudo de Camassola & Dillon (2012a), onde o cultivo com 1% celulose Celufloc E[®] proporcionou as maiores atividades de endoglicanases exceto no segundo dia quando o meio formulado com 3% bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor apresentou melhor resultando com maior produtividade.

Um estudo comparativo utilizando bagaço de cana-de-açúcar e celulose em cultivo submerso de *P. echinulatum* 9A02S1 resultou em atividade em meio com celulose de $1,25 \pm 0,11$ UI.mL⁻¹ somente no sexto dia de cultivo, sendo que neste mesmo período o meio formulado com bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento apresentou atividade de endoglicanase de $1,62 \pm 0,09$ UI.mL⁻¹ (Camassola & Dillon, 2009).

Como esperado esta atividade enzimática no meio formulado com glicose foi muito reduzida.

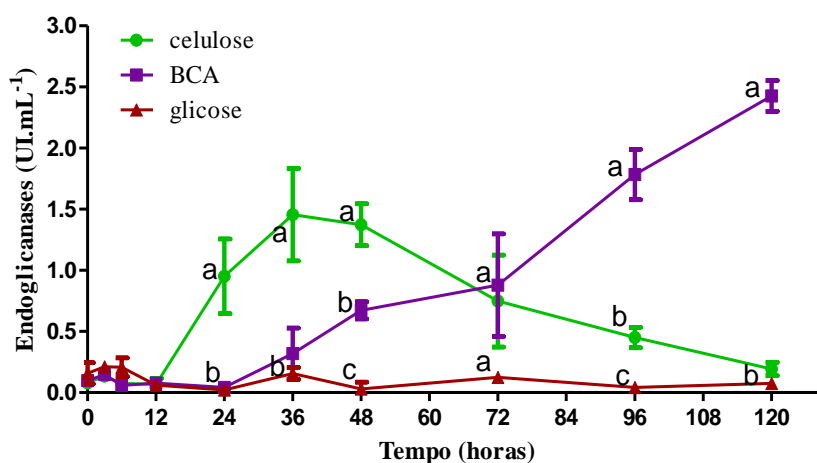


Figura 15. Atividades de endoglicanases determinadas a partir de cultivos submersos de *Penicillium echinulatum* S1M29 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo horário não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade de celobiohidrolases nos meios formulados com BCA e celulose Celufloc E[®] apresenta perfil semelhante à secreção de endoglicanases. O meio com celulose Celufloc E[®] apresentou atividades de $0,229 \pm 0,01$ UI.mL⁻¹ em 96 h de cultivo, sendo a atividade superior mensurada no meio formulado com BCA em 120 h de cultivo correspondendo a $0,59 \pm 0,03$ UI.mL⁻¹ (Figura 16). Nestas duas condições observa-se um pequeno decréscimo da atividade em 72 h de

cultivo e posterior incremento. O BCA proporcionou atividades de celobiohidrolases significativamente superiores aos demais meios a partir de 48 h de cultivo. No meio formulado com glicose detectou-se atividade de celobiohidrolases somente após 48 h de cultivo, chegando ao pico de $0,1 \pm 0,01 \text{ UI.mL}^{-1}$ em 120 h.

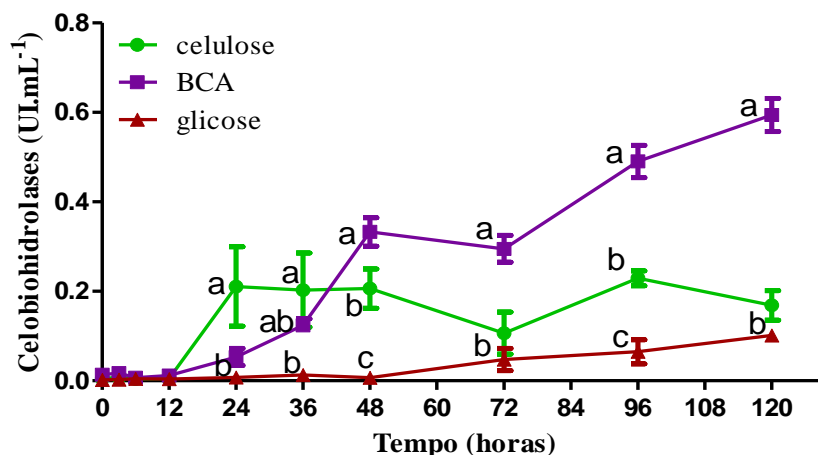


Figura 16. Atividades celobiohidrolases determinadas a partir de cultivos submersos de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo horário não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade de β -glicosidasas é mais evidente ao final do cultivo devido à ação desta enzima juntamente com o complexo de celulases (Figura 17). Os perfis de secreção enzimática nos meios formulados com BCA e glicose são semelhantes e chegam ao final do cultivo com valores de atividade correspondentes a $0,32 \pm 0,03 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $0,36 \pm 0,04 \text{ UI.mL}^{-1}$, respectivamente. No meio formulado com celulose Celufloc E[®], observa-se que a atividade desta enzima permanece constante durante todo o cultivo, em torno de $0,04 \text{ UI.mL}^{-1}$.

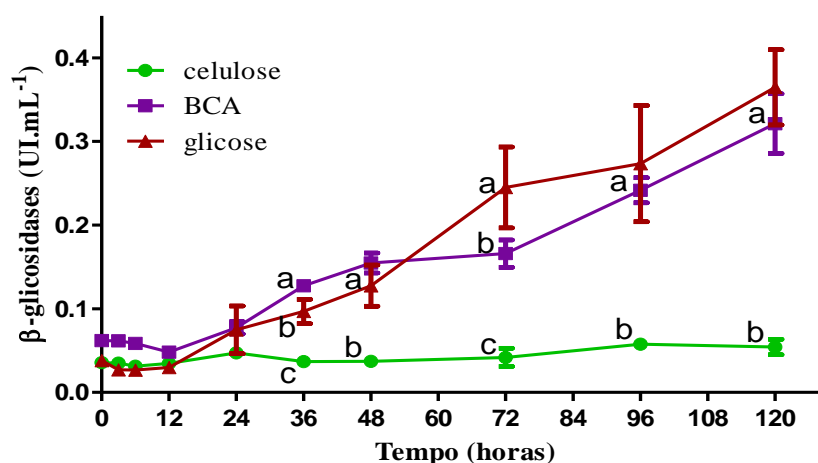


Figura 17. Atividades de β -glicosidasas determinadas a partir de cultivos submersos de *Penicillium echinulatum* S1M29 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo horário não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Durante todo o cultivo, a secreção de xilanases foi significativamente superior no meio formulado com celulose Celufloc E[®] em relação aos demais meios analisados, chegando ao máximo de $11,49 \pm 0,14 \text{ UI.mL}^{-1}$, em 96 h, exceto em 120 h, onde o meio formulado com BCA proporcionou a obtenção de atividade superior, com valor correspondente a $12,63 \pm 0,84 \text{ UI.mL}^{-1}$ (Figura 18). No meio formulado com glicose observam-se oscilações no início do cultivo seguindo com atividade reduzida até o final.

Em estudo realizado por Camassola & Dillon (2012a) verificou-se que a secreção de xilanases por *P. echinulatum* 9A02S1 crescido em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor é tão eficiente quanto a utilização de bagaço de cana-de-açúcar não tratado ou celulose, diferente do que pode ser observado no presente estudo.

O fato da atividade de xilanase ser alta em meio com celulose Celufloc E[®] é importante pensando-se na produção de um complexo constituído de celulasas e xilanases, produzido a partir de uma único composto indutor. Deve-se também levar em consideração a composição da celulose Celufloc E[®] utilizada neste estudo que apresenta 13,19 % de xilose. Além disso, o regulador de celulasas ACE II afeta a regulação de xilanases, sendo que a presença de celulose pode não só induzir celulasas como também xilanases (Aro *et al.*, 2001).

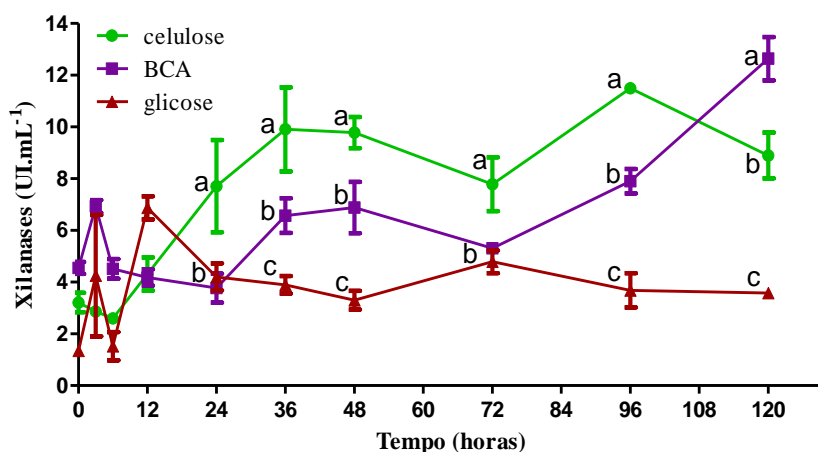


Figura 18. Atividades de xilanases determinadas a partir de cultivos submersos de *Penicillium echinulatum* S1M29 utilizando diferentes fontes de carbono, em frascos sob agitação recíproca. Os valores (médias) com a mesma letra para o mesmo horário não são significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As figuras 19, 20 e 21 apresentam as curvas de crescimento do *P. echinulatum* S1M29 nas diferentes fontes de carbono estudadas - celulose, BCA e glicose - respectivamente, bem como as atividades das diferentes enzimas avaliadas. É possível observar que, no meio formulado com celulose, a produção de FPA e endoglicanas relaciona-se com o crescimento micelial, enquanto

para as demais enzimas observa-se a máxima produção das mesmas após o pico de crescimento que deu-se em 36 h (Figura 19).

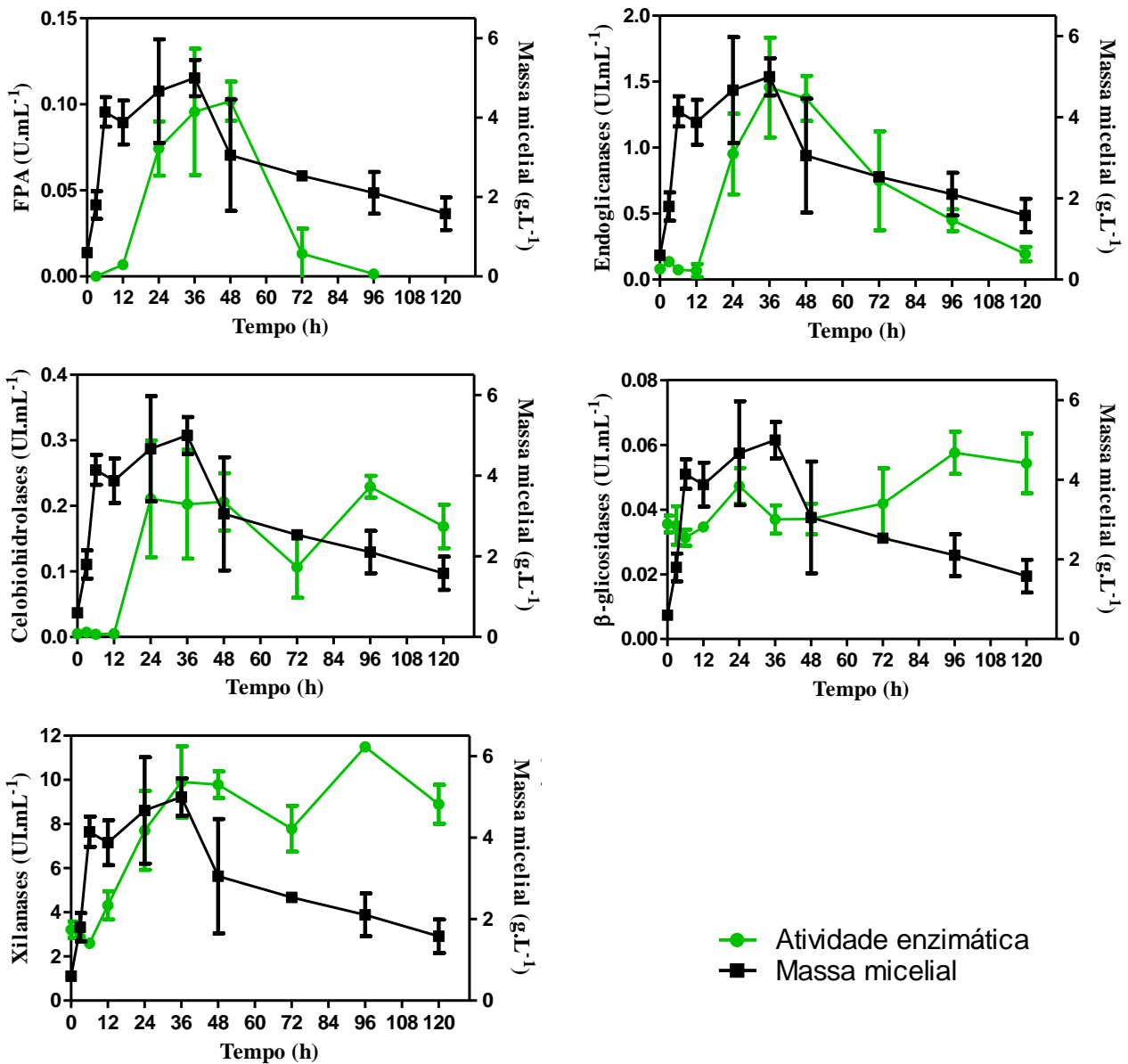


Figura 19. Atividades enzimáticas de FPA, endoglucanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases em relação ao crescimento micelial obtido em cultivos submersos em meios formulados com celulose como fonte de carbono para o desenvolvimento do *Penicillium echinulatum* S1M29.

As secreções enzimáticas obtidas no meio formulado com BCA foram detectadas posteriormente ao pico de crescimento, evidenciando que estas enzimas, neste meio, foram excretadas após a lise celular (Figura 20).

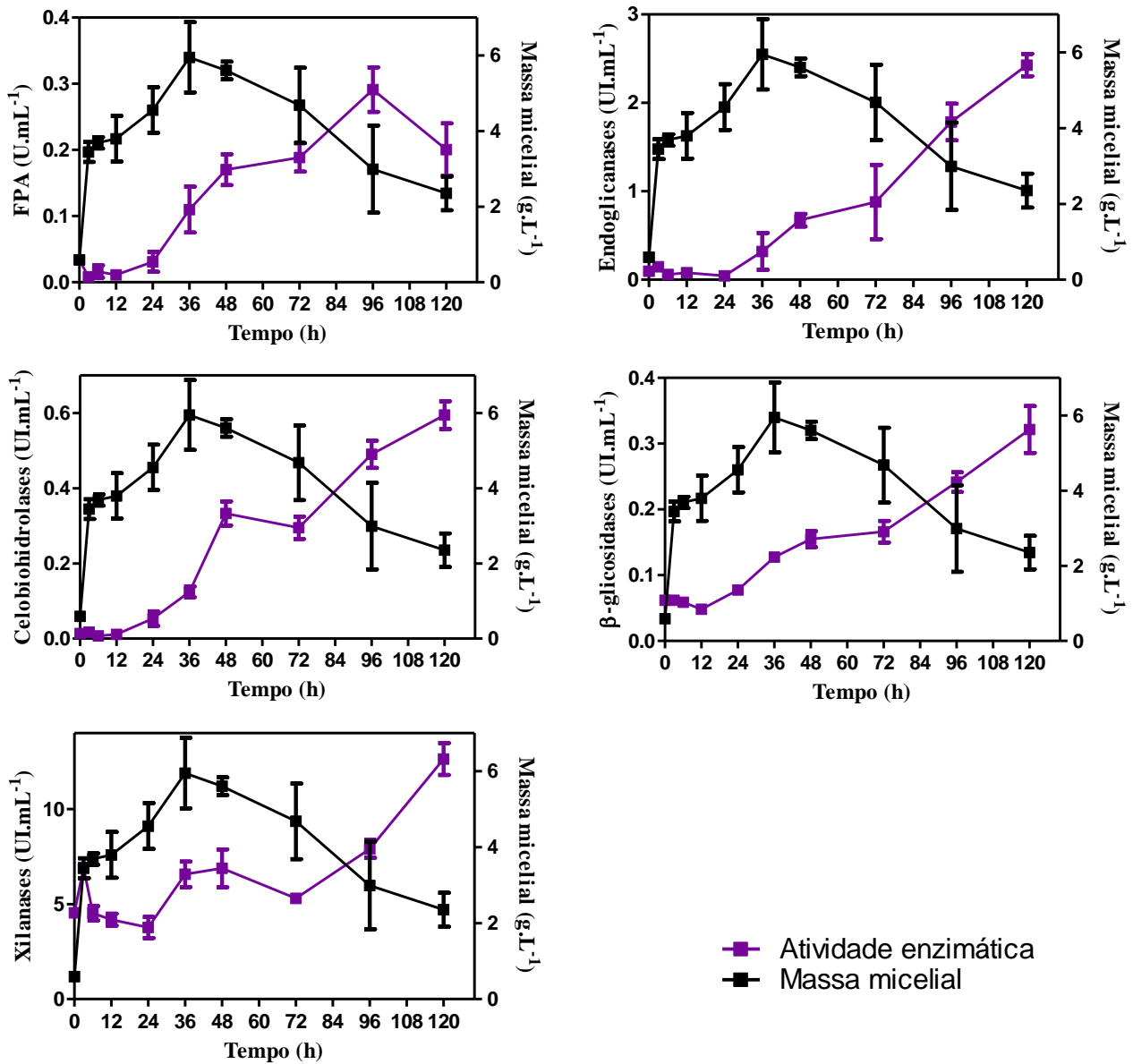


Figura 20 . Atividades enzimáticas de FPA, endoglucanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases em relação ao crescimento micelial obtido em cultivos submersos em meios formulados com BCA como fonte de carbono para o desenvolvimento do *Penicillium echinulatum* S1M29.

Já para o cultivo formulado com glicose, observa-se uma relação entre a produção de FPA, endoglucanases e xilanases com o crescimento micelial (Figura 21). Entretanto, celobiohidrolases e β -glicosidases foram secretadas após a ocorrência do pico de crescimento do *P. echinulatum*.

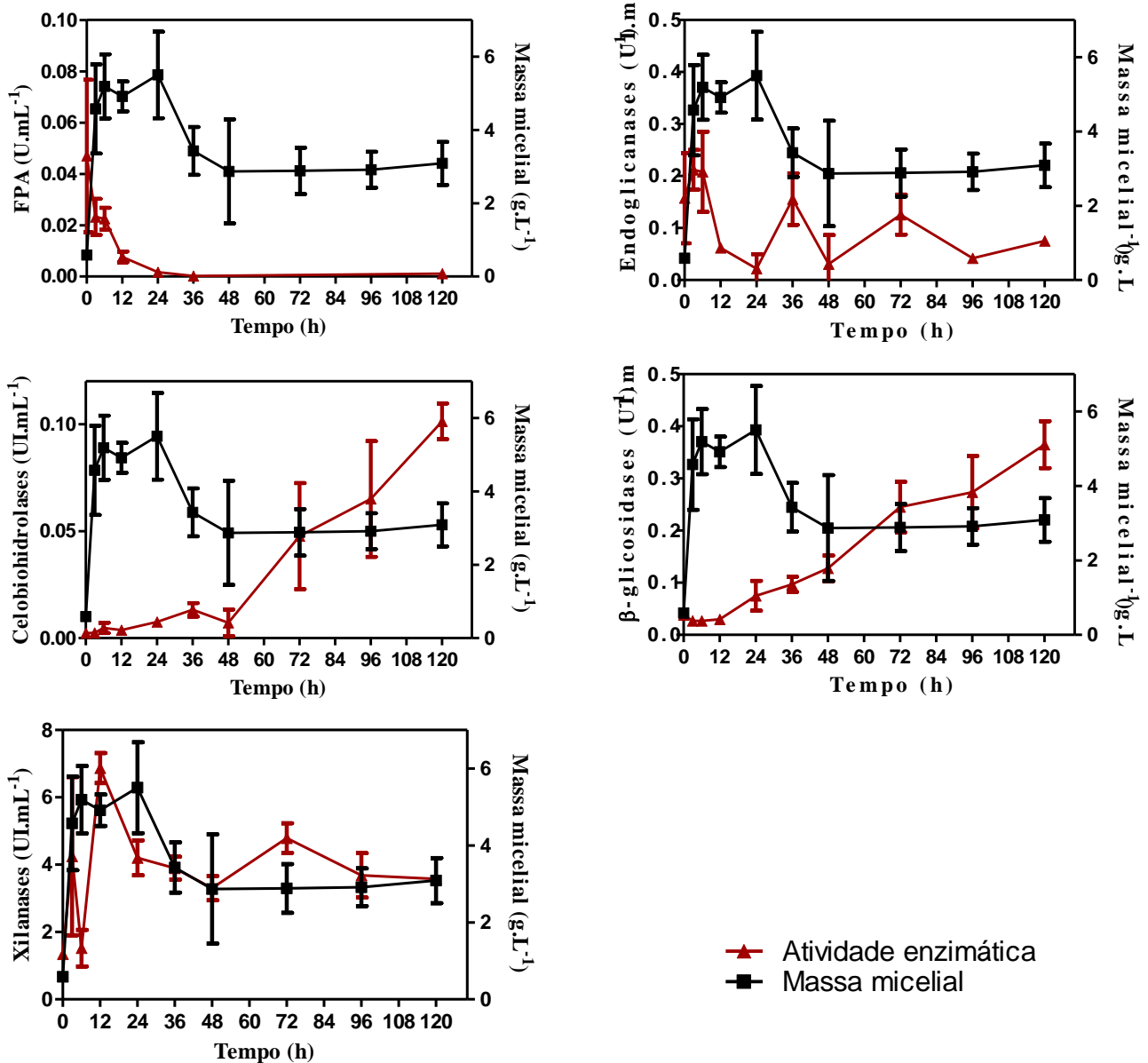


Figura 21. Atividades enzimáticas de FPA, endoglucanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases em relação ao crescimento micelial obtido em cultivos submersos em meios formulados com glicose como fonte de carbono para o desenvolvimento do *Penicillium echinulatum* S1M29.

A Tabela 2 apresenta os valores das atividades específicas de FPA, endoglucanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases dos picos enzimáticos obtidos a partir dos caldos produzidos em meios formulados por celulose Celufloc E[®], BCA ou glicose. O meio formulado com BCA proporcionou a obtenção das maiores atividades específicas para FPA, endoglucanases e celobiohidrolases, enquanto que as maiores atividades específicas de xilanases foram obtidas no meio composto por celulose Celufloc E[®].

Tabela 2. Atividades específicas de FPA, endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases dos pontos de maior secreção enzimática, obtidas a partir dos caldos produzidos em meios formulados por celulose Celufloc E[®], BCA ou glicose.

Fonte de Carbono	Atividade específica (UI.mg ⁻¹)				
	FPA	Endoglicanases	Celobiohidrolases	β -glicosidases	Xilanases
Celulose	0,58 (48 h)	8,06 (36 h)	1,34 (96 h)	0,36 (120 h)	67,35 (96 h)
BCA	0,97 (96 h)	8,12 (120 h)	1,99 (120 h)	1,07 (120 h)	42,33 (120 h)
Glicose	0,17 (3 h)	1,58 (3 h)	0,62 (120 h)	2,23 (120 h)	57,31 (12 h)

Diferente do que foi observado no presente estudo, Camassola & Dillon (2012a) mostraram que o uso de 1% (m/v) de celulose no meio de cultivo proporcionou maiores atividades de FPA, endoglicanase, β -glicosidase e xilanase em comparação ao uso de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor nas concentrações de 1, 2 e 3%. Outro estudo com *P. echinulatum* 9A02S1 utilizou *Pleurotus sajor-caju* PS 2001 para pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar, porém, apesar das diversas vantagens dos pré-tratamentos biológicos o uso deste macrofungo resultou em atividades enzimáticas inferiores aos controles com celulose ou bagaço de cana-de-açúcar não tratado nas análises de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases (Camassola & Dillon, 2009).

4.5 SDS-PAGE das proteínas e zimogramas para endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e xilanases de caldos enzimáticos produzidos por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos submersos

A estimativa da massa molecular das celulasas e de outras proteínas obtidas nos diferentes cultivos foi realizada através de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e, posteriormente, coloração das proteínas com *Coomassie Brilliant Blue*. As Figuras são apresentadas em escala de cinza para melhor visualização.

A quantidade de amostra aplicada nos géis de poliacrilamida foi padronizada pelo volume para observar a variação da produção no decorrer do tempo. Foram adicionados diferentes volumes de caldo enzimático obtido a partir de cada fonte de carbono utilizada para a melhor visualização das bandas de hidrólise nos géis de poliacrilamida. As massas de proteínas utilizadas para a realização de SDS-PAGE encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Quantidade de proteínas utilizadas na realização das eletroforeses em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose.

Tempos de coleta (h)	Quantidade de proteína correspondente ao volume utilizado em SDS-PAGE (µg)		
	Celulose Celufloc E [®]	BCA	Glicose
0	27,79	26,72	39,73
6	28,23	29,32	44,16
12	30,24	26,90	35,97
24	36,70	42,74	42,66
36	36,12	47,27	48,72
48	34,75	51,30	44,57
72	35,00	52,34	43,21
96	34,13	59,51	47,86
120	29,91	59,71	48,87

O perfil de proteínas secretadas no meio formulado com celulose Celufloc E[®] estão apresentadas na Figura 22A, evidenciando a presença de proteínas com massa molecular de aproximadamente 250 kDa e duas bandas em torno de 50 kDa, detectadas a partir de 24 h de cultivo.

No meio formulado com BCA observou-se uma quantidade maior de proteínas distribuídas na faixa de 30 a 50 kDa aproximadamente, também manifestando-se a partir das 24 h de cultivo, como verifica-se na Figura 22B.

O cultivo realizado com glicose no meio proporcionou a secreção de proteínas com massas superiores aos detectados no meio com BCA, correspondendo a 250, 75, 50 e 40 kDa, conforme apresentado na Figura 22C, a partir de 24 h de cultivo.

Pode-se verificar que apesar da secreção proteica ser mais evidente a partir de 24 h de cultivo, houve uma distinção no perfil de bandas de proteínas secretadas nos três meios avaliados, evidenciando as diferenças de suas composições e, conseqüentemente, sua influência no comportamento fúngico.

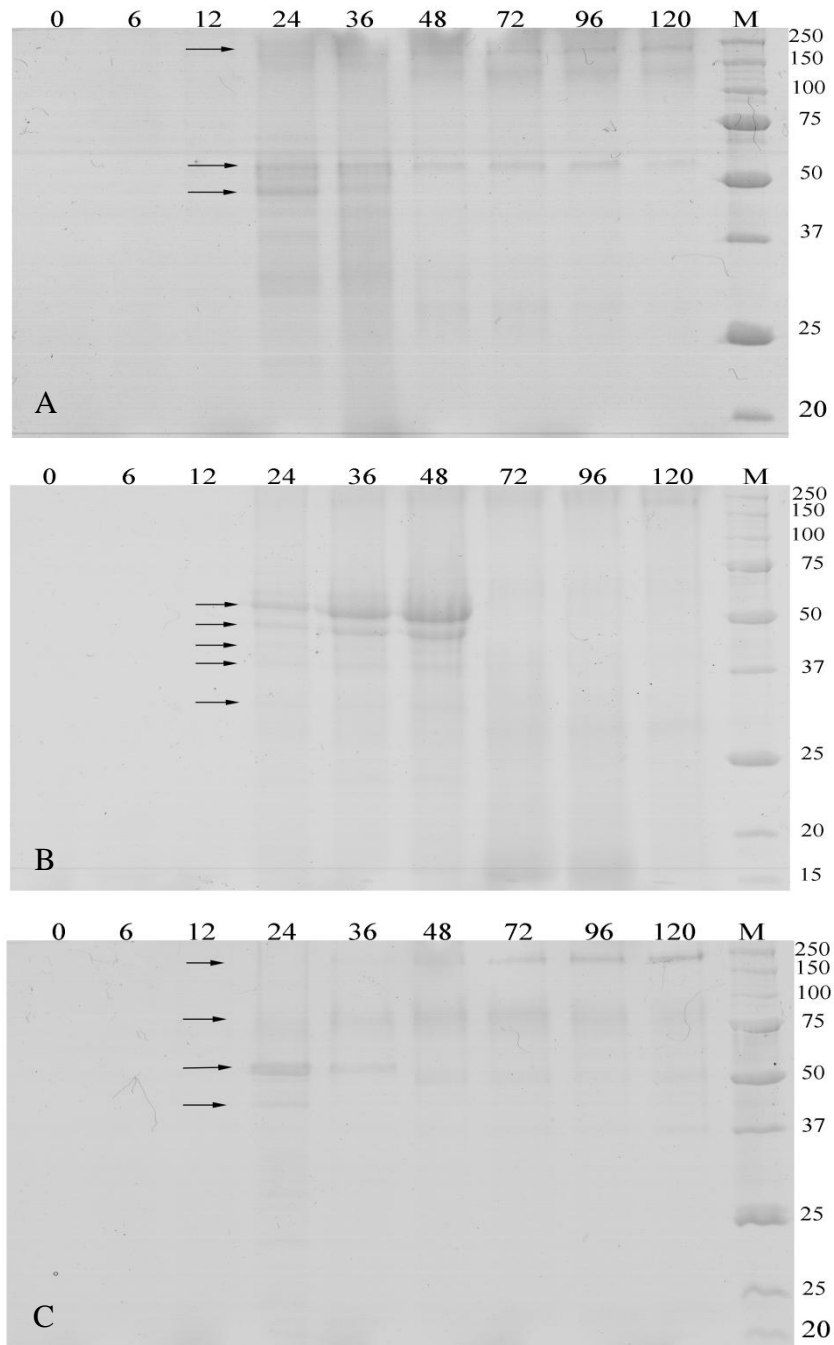


Figura 22. Perfil das proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir do caldo enzimático de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos submersos, utilizando: A - celulose Celufloc E[®] (200 µL), B - BCA (200 µL) e C - glicose (300 µL) como fonte de carbono. As informações na parte superior das figuras relacionam-se ao tempo de cultivo em horas, e M corresponde ao marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular.

A Tabela 4 apresenta as quantidades de proteínas aplicadas nos géis de poliacrilamida para a realização dos zimogramas para atividade de endoglicanases a partir do caldo enzimático produzido em cultivos com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose.

Tabela 4. Quantidades de proteínas utilizadas na realização de zimogramas para atividade de endoglicanases em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose.

Tempos de coleta (h)	Quantidade de proteína correspondente ao volume utilizado no zimograma para endoglicanases (µg)		
	Celulose Celufloc E [®]	BCA	Glicose
0	0,28	0,27	1,32
6	0,28	0,29	1,47
12	0,30	0,27	1,20
24	0,37	0,43	1,42
36	0,36	0,47	1,62
48	0,35	0,51	1,49
72	0,35	0,52	1,44
96	0,34	0,60	1,60
120	0,30	0,60	1,63

O zimograma para endoglicanases obtido a partir da análise do caldo enzimático produzido no meio formulado com celulose Celufloc E[®], evidenciou bandas de atividade desta enzima de massa molecular aproximada de 80 kDa em todos os pontos de coleta. Também é evidente a secreção enzimática a partir de 24 h pela banda de degradação de CMC na posição correspondente à 250 kDa, e após, em 48 h com banda de 150 kDa. Em 36 h de cultivo foi possível verificar a atividade desta enzima em uma banda de aproximadamente 30 kDa (Figura 23A).

Assim como observado no caldo produzido no meio formulado com celulose Celufloc E[®], em todos os pontos de coleta do caldo proveniente do cultivo formulado com BCA, evidenciaram-se bandas de atividade de endoglicanases de cerca de 80 kDa. Este caldo também apresentou bandas de hidrólise a partir de 72 h de cultivo de aproximadamente 75 kDa (Figura 23B).

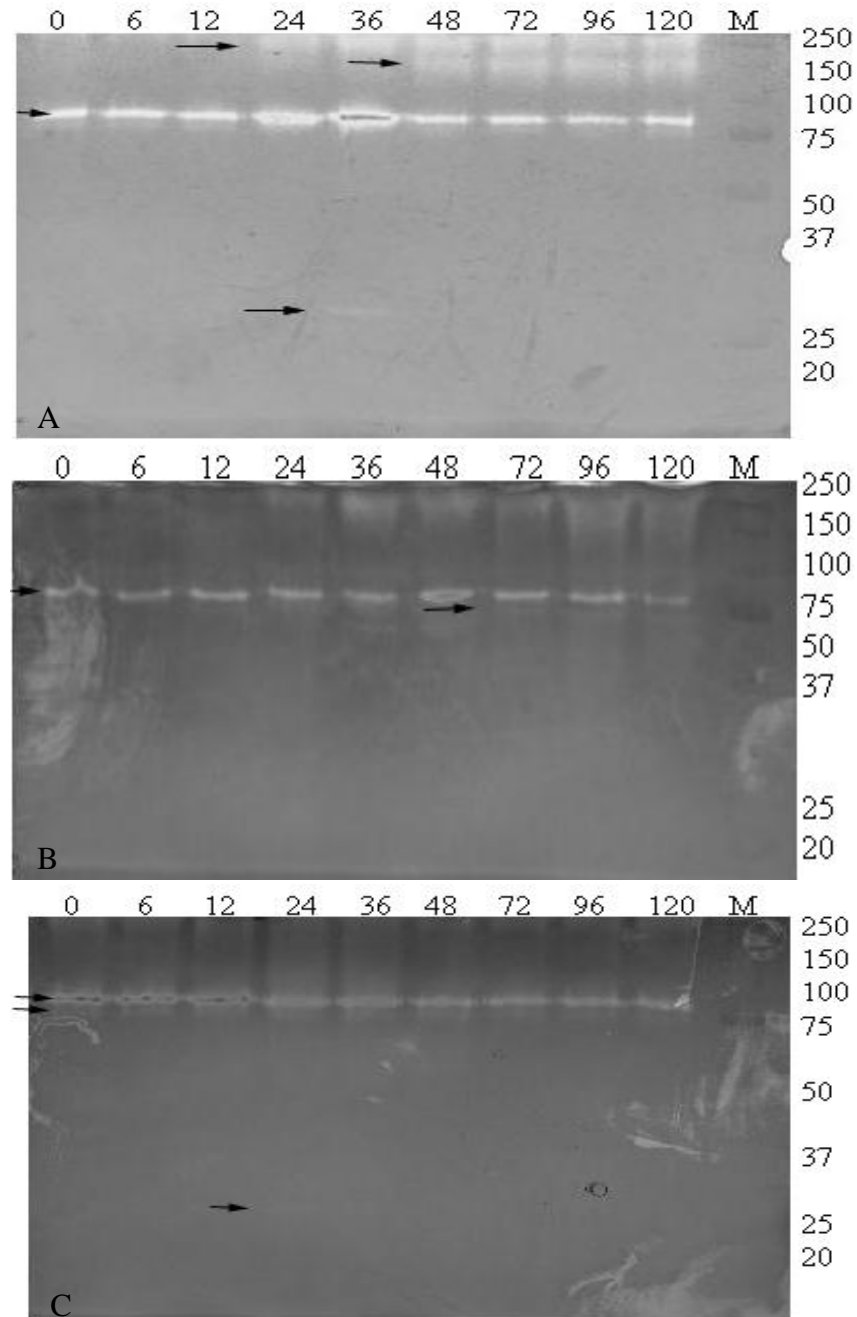


Figura 23. Perfil da atividade de endoglicanases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso, utilizando: A – celulose Celufloc E® (2 μ L), B – BCA (2 μ L) e C – glicose (10 μ L) como fonte de carbono. As informações na parte superior das figuras relacionam-se ao tempo de cultivo em horas, e M corresponde ao marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular.

Bandas de atividade de endoglicanases de aproximadamente 80 kDa também foram detectadas em todos os pontos de coleta no caldo enzimático formulado com glicose. Além desta,

também observou-se bandas de cerca de 75 kDa em todas as coletas como pode-se verificar na Figura 23C.

A partir dos resultados obtidos nos zimogramas para atividade de endoglicanases pode-se indicar a ação de endoglicanases constitutivas, uma vez que bandas de 80 kDa foram visualizadas em todas as condições de cultivo avaliadas desde o início do cultivo. Perfil semelhante já foi observado em *P. echinulatum* 9A02S1 com a presença de banda de atividade de endoglicanases de 76 kDa quando crescido em diferentes fontes de carbono, sugerindo tratar-se de uma endoglicanase constitutiva ou basal (Zampieri *et al.*, 2013).

As quantidades de proteínas aplicadas nos géis de poliacrilamida para a realização dos zimogramas para atividade de celobiohidrolases dos caldos enzimáticos produzidos a partir dos cultivos com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Quantidades de proteínas utilizadas na realização de zimogramas para atividade de celobiohidrolases em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose.

Tempos de coleta (h)	Quantidade de proteína correspondente ao volume utilizado no zimograma para celobiohidrolases (µg)		
	Celulose Celufloc E [®]	BCA	Glicose
0	13,89	13,36	13,24
6	14,12	14,66	14,72
12	15,12	13,45	11,99
24	18,35	21,37	14,22
36	18,06	23,64	16,24
48	17,38	25,65	14,86
72	17,50	26,17	14,40
96	17,06	29,75	15,95
120	14,96	29,86	16,29

A atividade de celobiohidrolase detectada em gel de poliacrilamida pode ser evidenciada por bandas de atividade de cerca de 140 kDa a partir de 24 h de cultivo em meio formulado com celulose Celufloc E[®], com atividade crescente, assim como pode ser visualizado na Figura 24A

através do aumento da intensidade das bandas. Outras bandas de 57 kDa e 23 kDa foram detectadas em 24 e 120 h, respectivamente.

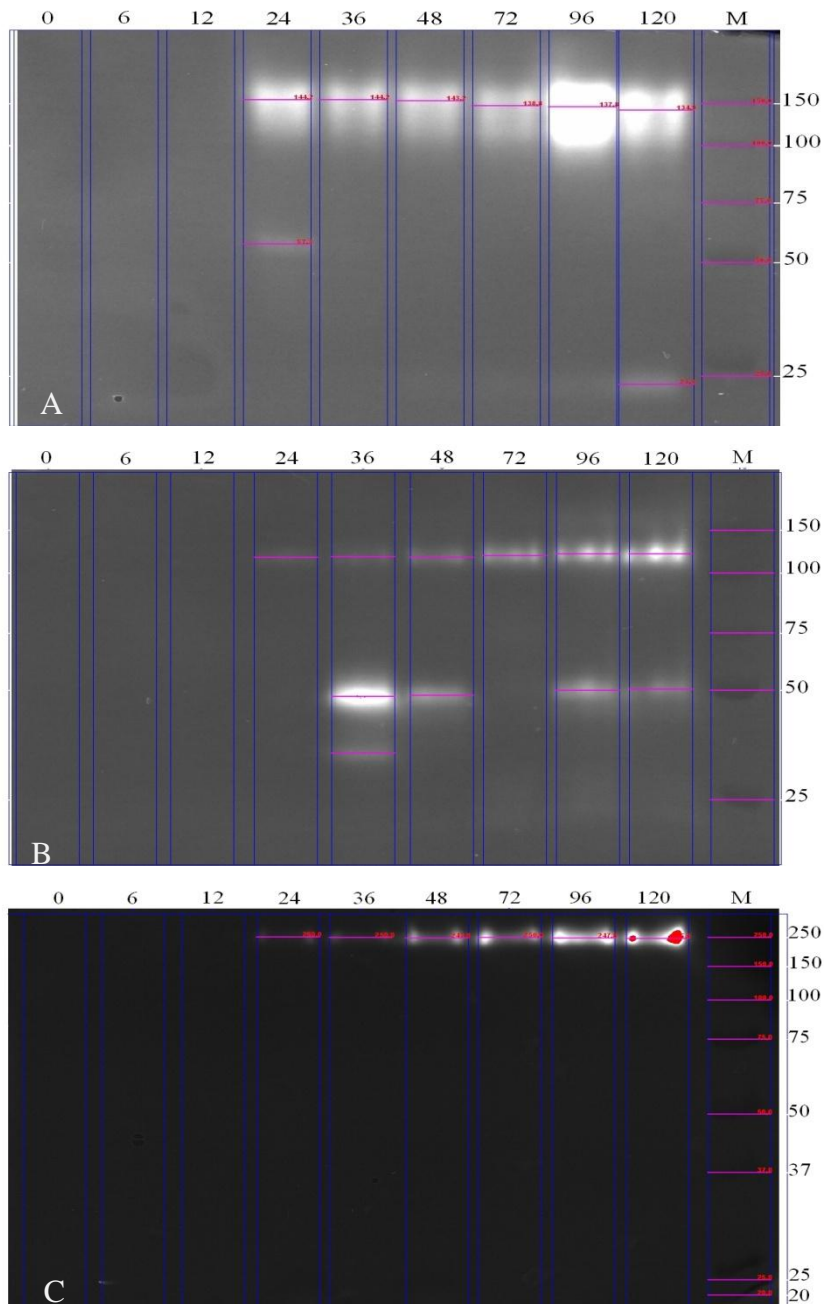


Figura 24. Perfil da atividade de celobiohidrolases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir da precipitação do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso, utilizando: A – celulose Celufloc E[®] (100 μ L), B – BCA (100 μ L) e C – glicose (100 μ L) como fonte de carbono. As informações na parte superior das figuras relacionam-se ao tempo de cultivo em horas, e M corresponde ao marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular.

O perfil das bandas de atividade de celobiohidrolases obtidas a partir do caldo enzimático produzido em meio formulado com BCA apresenta halos de hidrólise de aproximadamente 116 kDa a partir de 24 h de cultivo com aumento de intensidade das bandas sugerindo maior expressão da enzima ao final do cultivo. Além destas, outras bandas de atividade foram visualizadas a partir de 36 h de cultivo de cerca de 50 kDa porém, estas apresentam intensidade decrescente até o final do cultivo. Também foi detectada uma banda de atividade de celobiohidrolases em 36 h de cultivo correspondendo ao valor de 33 kDa (Figura 24B).

A atividade de celobiohidrolase detectada em gel de poliacrilamida pode ser evidenciada por bandas de atividade de cerca de 245 kDa a partir de 24 h de cultivo em meio formulado com glicose, com atividade crescente, assim como pode ser visualizado na Figura 24C através do aumento da intensidade das bandas.

As quantidades de proteínas aplicadas nos géis de poliacrilamida para a realização dos zimogramas para atividade de β -glicosidases dos caldos enzimáticos produzidos a partir dos cultivos com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Quantidades de proteínas utilizadas na realização de zimogramas para atividade de β -glicosidases em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose.

Tempos de coleta (h)	Quantidade de proteína correspondente ao volume utilizado no zimograma para β -glicosidases (μ g)		
	Celulose Celufloc E [®]	BCA	Glicose
0	55,57	26,72	26,48
6	56,47	29,32	29,44
12	60,48	26,90	23,98
24	73,40	42,74	28,44
36	72,25	47,27	32,48
48	69,50	51,30	29,71
72	70,00	52,34	28,81
96	68,26	59,51	31,91
120	59,82	59,71	32,58

Todos os caldos enzimáticos obtidos a partir dos diferentes meios formulados apresentaram bandas de atividade de β -glicosidases a partir de 24 h de cerca de 250 kDa conforme demonstrado

na Figura 25A, B e C com o uso do caldo enzimático produzido com celulose Celufloc E[®], BCA e glicose, respectivamente. Observa-se ainda uma diferença na intensidade das bandas que aumenta com o passar do tempo de cultivo evidenciando o aumento da secreção desta enzima.

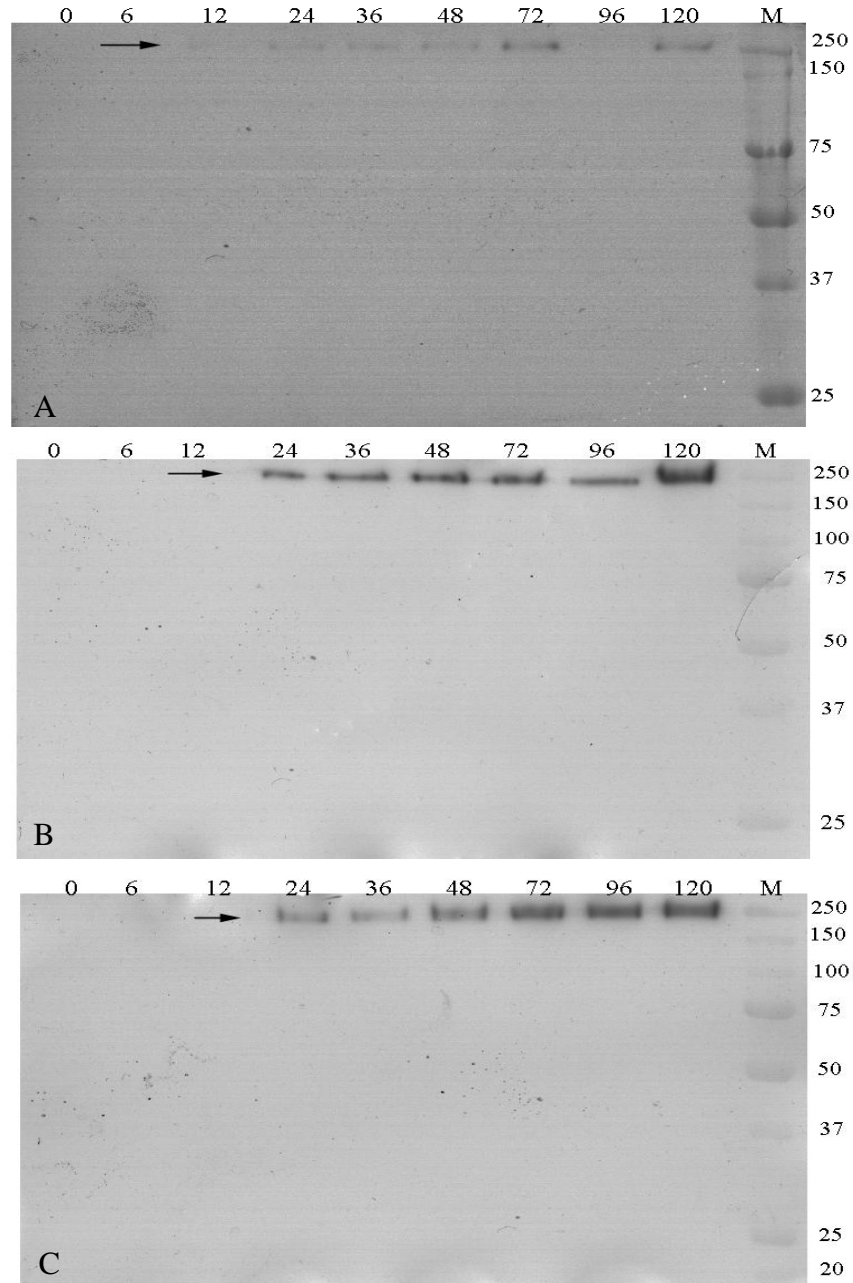


Figura 25. Perfil da atividade de β -glicosidases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir da precipitação do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* SIM29 em cultivo submerso, utilizando: A - celulose Celufloc E[®] (400 μ L), B - BCA (200 μ L), C - glicose (200 μ L) como fonte de carbono. As informações na parte superior das figuras relacionam-se ao tempo de cultivo em horas, e M corresponde ao marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular.

A Tabela 7 apresenta as quantidades de proteínas aplicadas nos géis de poliacrilamida para a realização dos zimogramas para atividade de xilanases dos caldos enzimáticos produzidos a partir dos cultivos com celulose Celufloc E[®] e BCA.

Tabela 7. Quantidades de proteínas utilizadas na realização de zimogramas para atividade de xilanases em géis de poliacrilamida, a partir do caldo enzimático obtido dos cultivos formulados com celulose Celufloc E[®] e BCA.

Tempos de coleta (h)	Quantidade de proteína correspondente ao volume utilizado no zimograma para xilanases (µg)	
	Celulose Celufloc E [®]	BCA
0	6,95	1,34
6	7,06	1,47
12	7,56	1,34
24	9,18	2,14
36	9,03	2,36
48	8,69	2,57
72	8,75	2,62
96	8,53	2,98
120	7,48	2,99

Bandas de hidrólise da xilana foram detectadas no meio formulado com celulose Celufloc E[®] entre 35 a 50 kDa a partir de 24 h. Até 36 h de cultivo foi possível a detecção de uma banda de atividade de aproximadamente 20 kDa (Figura 26A).

A partir do meio formulado com BCA pode-se verificar a presença de bandas de hidrólise enzimática de aproximadamente 20 kDa presentes em todo o cultivo, enquanto que bandas de cerca de 50 a 70 kDa mostraram-se presentes a partir de 24 h de cultivo. Outras bandas de 22 a 25 kDa foram observadas somente em 48 e 72 h de cultivo, conforme demonstra a Figura 26B.

Não foi possível detectar o perfil bandas de xilanases do caldo enzimático produzido no meio formulado com glicose devido à baixa atividade desta enzima neste meio.

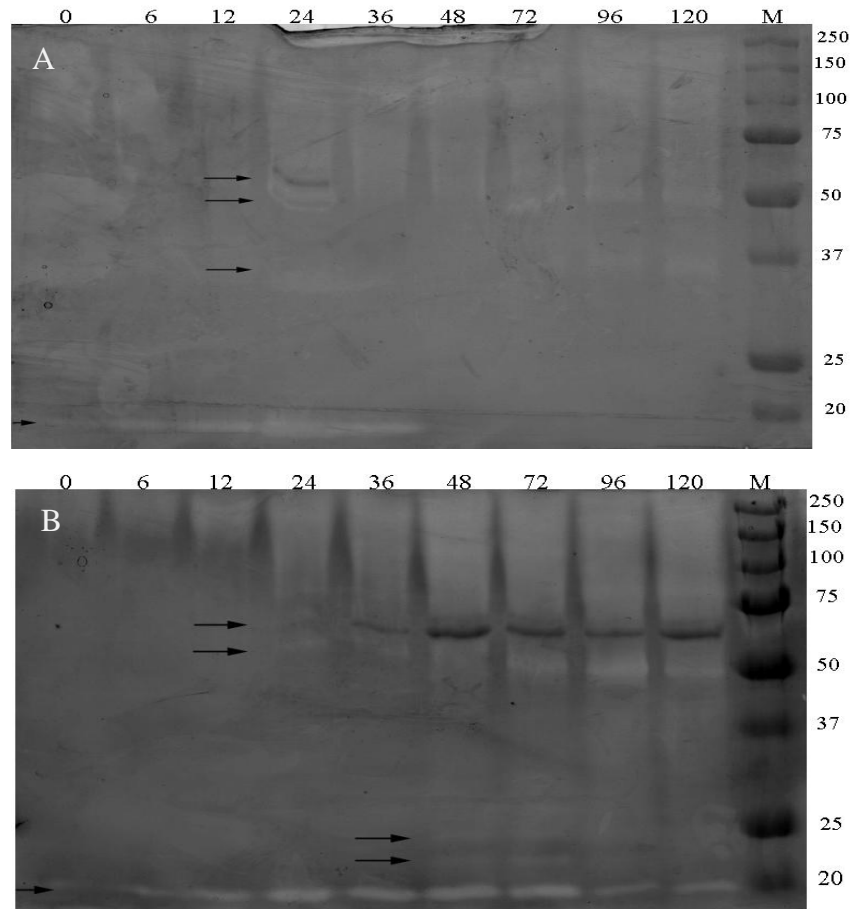


Figura 26. Perfil da atividade de xilanases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir do caldo enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso, utilizando: A - celulose Celufloc E[®] (50 µL) e B – BCA (10 µL) como fonte de carbono. As informações na parte superior das figuras relacionam-se ao tempo de cultivo em horas, e M corresponde ao marcador de massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular.

4.6 qRT-PCR

Os RNAs dos micélios de *P. echinulatum* obtidos em cultivos submersos formulados com diferentes fontes de carbono, foram extraídos a partir da maceração com nitrogênio líquido e posterior aplicação da metodologia com uso de Trizol[®], conforme protocolo do fabricante.

O material extraído foi quantificado em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, para verificação da quantidade e qualidade obtida de RNA. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) foi utilizada para assegurar a extração do RNA bem como sua pureza a partir da visualização de bandas de RNA no gel e a ausência de bandas de DNA. Em seguida, o RNA passou por tratamento com DNase sendo novamente, ao final do processo, quantificado e visualizado em gel de agarose.

Para descartar qualquer contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA tratadas com DNase foram submetidas a uma reação de PCR com o uso do par de *primer* para o gene de actina, sendo o produto da amplificação visualizado em gel de agarose 1,5%.

As amostras de RNA tratadas com DNase foram utilizadas para a formação de cDNA e diluídas na concentração de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para posterior uso na reação de qRT-PCR.

4.6.1 Validação de genes normalizadores

Vinte e três pares de *primers* de genes candidatos a controle interno foram testados para as amostras de cDNA de *P. echinulatum* obtidas nos cultivos submersos com celulose Celufloc E[®], BCA ou glicose. Destes genes, seis não mostraram-se específicos no anelamento na sequência de cDNA de *P. echinulatum*, não apresentando valores de C_q válidos, sendo eliminados do estudo. Os dezessete genes pré-selecionados foram submetidos à avaliação da curva de dissociação (*melt*), que demonstra a formação de um único produto ou produtos inespecíficos na amplificação, como dímeros de *primers*. A partir desta análise, somente quatro genes apresentaram curva de dissociação apropriada sendo, portanto, os demais excluídos do estudo (Figura 27).

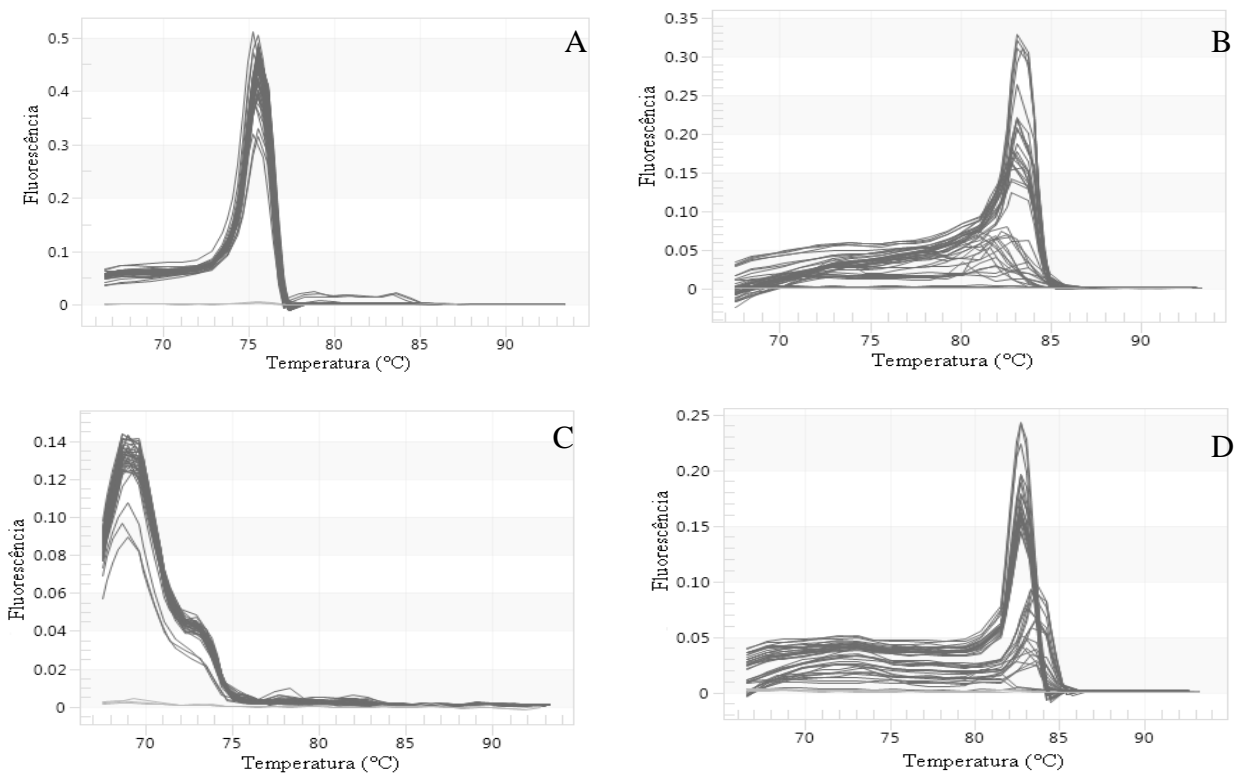


Figura 27. Curvas de dissociação dos *primers* para os genes (A) *actb*, (B) *tf*, (C) *tub* e (D) *g3* obtidas a partir das amostras de micélio cultivado em meio constituído por celulose Celufloc E[®], BCA ou glicose em diferentes tempos de cultivo.

Os quatro genes selecionados com base nos dados obtidos com as curvas de dissociação foram: β -actina (*actb*), fator de transcrição (*tf*), β -tubulina (*tub*) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*g3*) e foram submetidos à etapa seguinte de análise de eficiência e posterior estabilidade. Para tanto, foi construída uma curva de calibração para cada par de *primer* com diluições seriadas da amostra de cDNA (Figura 28).

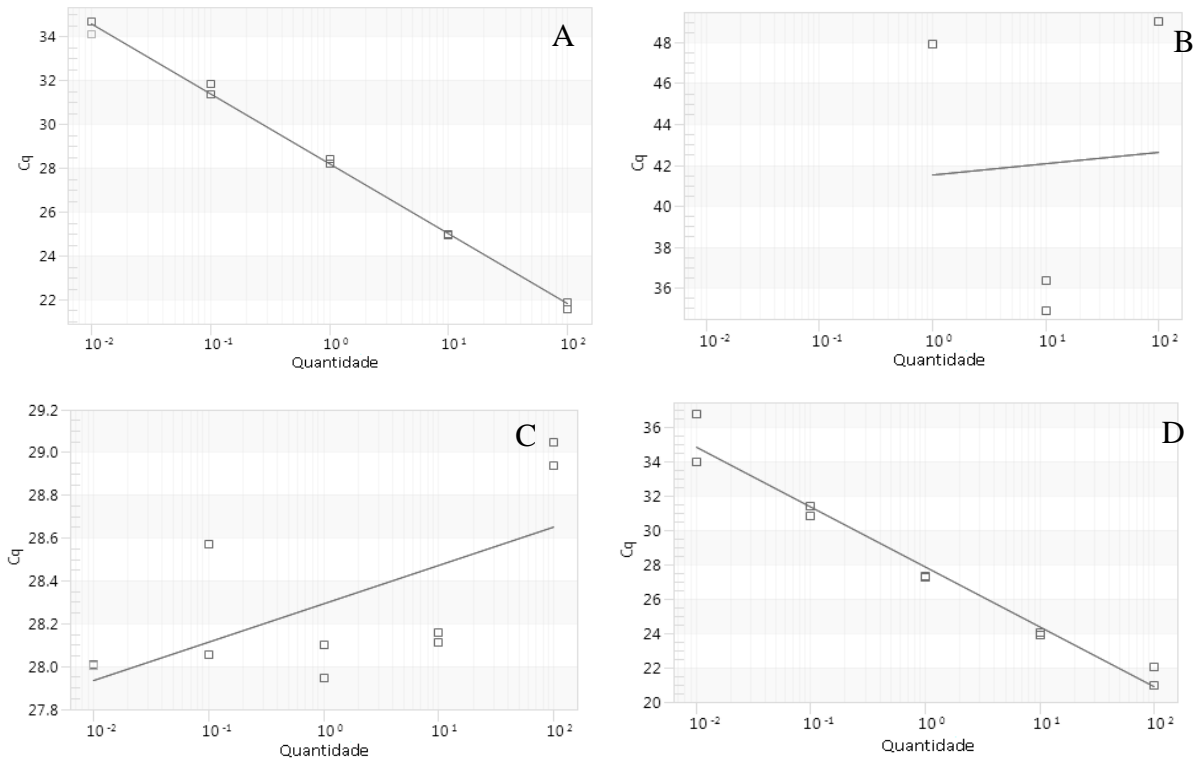


Figura 28. Curva de calibração dos *primers* para os genes: (A) *actb*, (B) *tf*, (C) *tub* e (D) *g3*, obtida a partir de diluição seriada da amostra de cDNA.

Os valores ideais de eficiência devem ser em torno de 2,00. Os resultados obtidos revelaram um valor de eficiência muito baixo para os genes *tf* e *tub* (Tabela 8), sendo assim, a estabilidade foi avaliada somente para os genes *actb* e *g3*.

Tabela 8. Genes candidatos a controle interno e os respectivos valores de eficiência calculados a partir de curva de calibração realizada com diluições seriadas da amostra de cDNA.

Genes	<i>Slope</i>	R ²	Eficiência ($E = 10^{-1/slope}$)
<i>actb</i>	-3,098	0,99	2,10
<i>g3</i>	-3,408	0,98	1,96
<i>tub</i>	0,168	0,427	$1,1 \times 10^{-6}$
<i>tf</i>	1,538	0,035	0,22

Os valores de eficiência foram transferidos ao *software BestKeeper*, assim como as médias dos valores de Cq obtidos. Este *software* executou a correlação dos resultados fornecidos, e indicou o gene de β -actina como o gene mais estável, como pode-se observar nos resultados presentes na Tabela 9, evidenciando um menor valor de desvio padrão entre as amostras e conseqüentemente menor coeficiente de variação. A expressão do gene *actb* apresentou variação de 1,48 enquanto a variação em *g3* foi de 4,28 além de apresentar um elevado coeficiente de regulação (± 24 -fold). Estes resultados indicam β -actina como o gene mais estável, sendo este selecionado como gene normalizador para a quantificação relativa para os genes de endoglicanases, celobiohidrolase, β -glicosidade, xilanase e swolenina por qRT-PCR.

Tabela 9. Estatística descritiva de dois genes candidatos a controle interno com base em seus valores de Cq e resultados obtidos com o uso do *software BestKeeper*.

	<i>actb</i>	<i>g3</i>
Número de amostras	15	15
Média geométrica (Cq)	24,09	27,17
Média aritmética (Cq)	24,15	26,60
Cq mínimo	21,55	18,77
Cq máximo	27,29	36,68
Desvio padrão (Cq)	1,48	4,28
Coeficiente de variação (%Cq)	6,23	15,52
Mín (x-fold)	-6,59	-285,22
Max (x-fold)	10,74	601,20
SD (\pm x-fold)	3,00	24,00

O *software geNorm* calculou a média da estabilidade da expressão fornecendo um valor M, permitindo a exclusão dos genes menos adequados, ou seja, com maiores valores de M. A avaliação dos quatro genes previamente selecionados indicou a seguinte ordem de estabilidade: *actb*, *tub*, *g3* e *tf* (Figura 29).

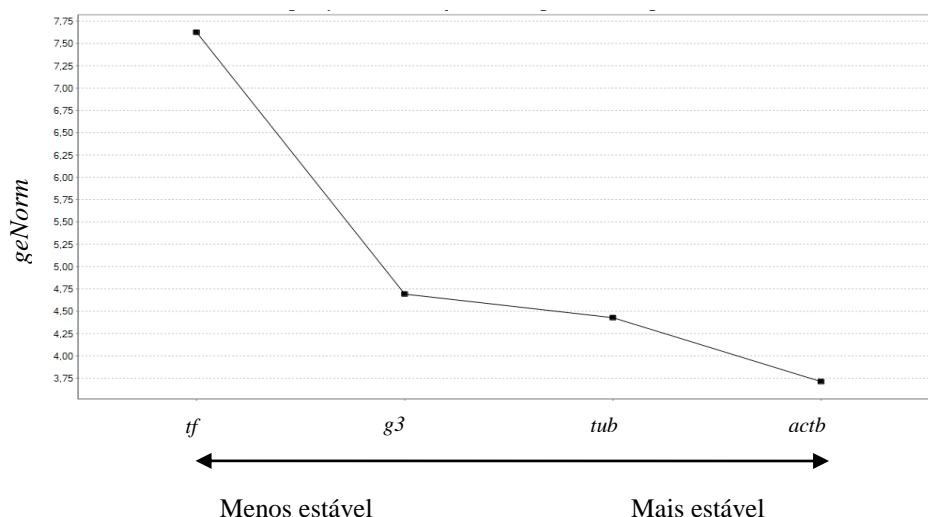


Figura 29. Valores decrescentes de estabilidade dos candidatos a genes referência para o estudo da expressão gênica de *Penicillium echinulatum* estimado pelo software *geNorm*.

Considerando as diferentes condições de cultivos de *P. echinulatum*, entre os genes avaliados o com melhor estabilidade foi *actb* com um valor de M igual a 5,877 e o menos estável foi o *tf* com valor M de 10,556 (Tabela 10).

Tabela 10. Candidatos a genes referência analisados a partir de diferentes cultivos de *Penicillium echinulatum* e ranqueados de acordo com o valor de estabilidade (M) pelo software *geNorm*.

Gene	Valor da estabilidade (M)	Coefficiente de variação (CV)
<i>actb</i>	5,877	1,834
<i>tub</i>	6,017	0,720
<i>g3</i>	8,045	3,598
<i>tf</i>	10,556	3,737

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas pelos dois softwares aplicados revelaram-se semelhantes, evidenciando o gene β -actina como o mais estável por ambos. Este gene já havia sido utilizado como controle interno de expressão gênica para o mesmo fungo em um estudo realizado por Matos (2012), porém sem prévia análise de seleção e validação de outros genes referência.

Paolacci *et al.* (2009) demonstraram que novos genes normalizadores podem ser utilizados em substituição aos tradicionalmente aplicados (α -tubulina, β -tubulina, ubiquitina, β -actina e

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), enfatizando a importância de estudos de seleção e validação de genes controle interno para cada situação.

O gene de β -tubulina já vem sendo utilizado como gene controle interno em estudos de expressão gênica de *Aspergillus fumigatus* (Barker *et al.*, 2012).

Diversos estudos revelaram e utilizaram o gene de β -actina como o gene mais estável para estudos de expressão gênica em *Neurospora crassa* (Mohsenzadeh *et al.*, 1998), *Phytophthora infestans* (Armstrong *et al.*, 2005), *Candida albicans* (Nailis *et al.*, 2006), *Penicillium glabrum* (Nevarez *et al.*, 2008), *Hypocrea jecorina* (Pucher *et al.*, 2011), *Humicola grisea* (Mello-de-Sousa *et al.*, 2011) e *Penicillium decumbens* (Zhang *et al.*, 2012). No entanto, o estudo realizado por Teste *et al.* (2009) não recomenda o uso do gene *act1* como normalizador para estudos de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*.

4.6.2 Expressão de genes de endoglicanases, celobiohidrolase, β -glicosidase, xilanase e swolenina de *Penicillium echinulatum* S1M29 a partir de cultivos submersos

A quantificação do acúmulo de transcritos foi realizada utilizando o gene de β -actina como normalizador interno (Zampieri *et al.*, 2014 – anexo 1). O acúmulo de transcritos da coleta de 0 h de cada condição de cultivo foi utilizado como condição controle (amostra calibradora) para os cálculos de quantificação relativa de transcritos. Os dados são apresentados como média das triplicatas.

Os *primers* dos genes de endoglicanases, celobiohidrolase, β -glicosidade, xilanase e swolenina foram avaliados quanto a curva de dissociação (Figura 30), curva de calibração (Figura 31) e os valores de eficiência (Tabela 11).

A observação de um pico único nas curvas de dissociação comprova a especificidade dos *primers*. A partir da curva de calibração é possível determinar o valor do *slope* de cada par de *primer* permitindo a determinação do valor da eficiência, sendo valores ideais resultados em torno de 2,0.

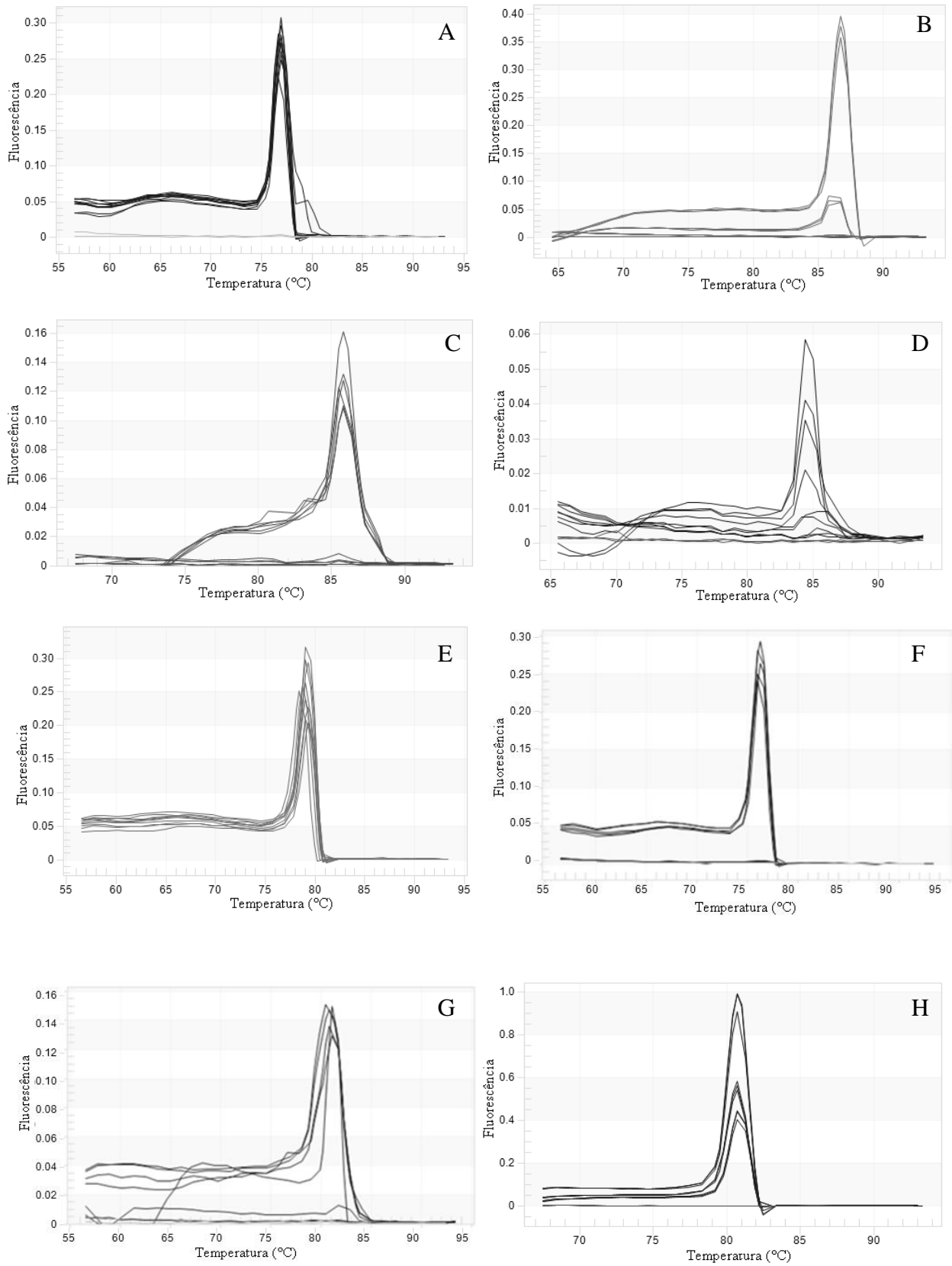


Figura 30. Curvas de dissociação dos *primer* para os genes (A) *egl1*, (B) *egl2*, (C) *egl3*, (D) *egl4*, (E) *cbh1*, (F) *bgl1*, (G) *xyl1* e (H) *swol*.

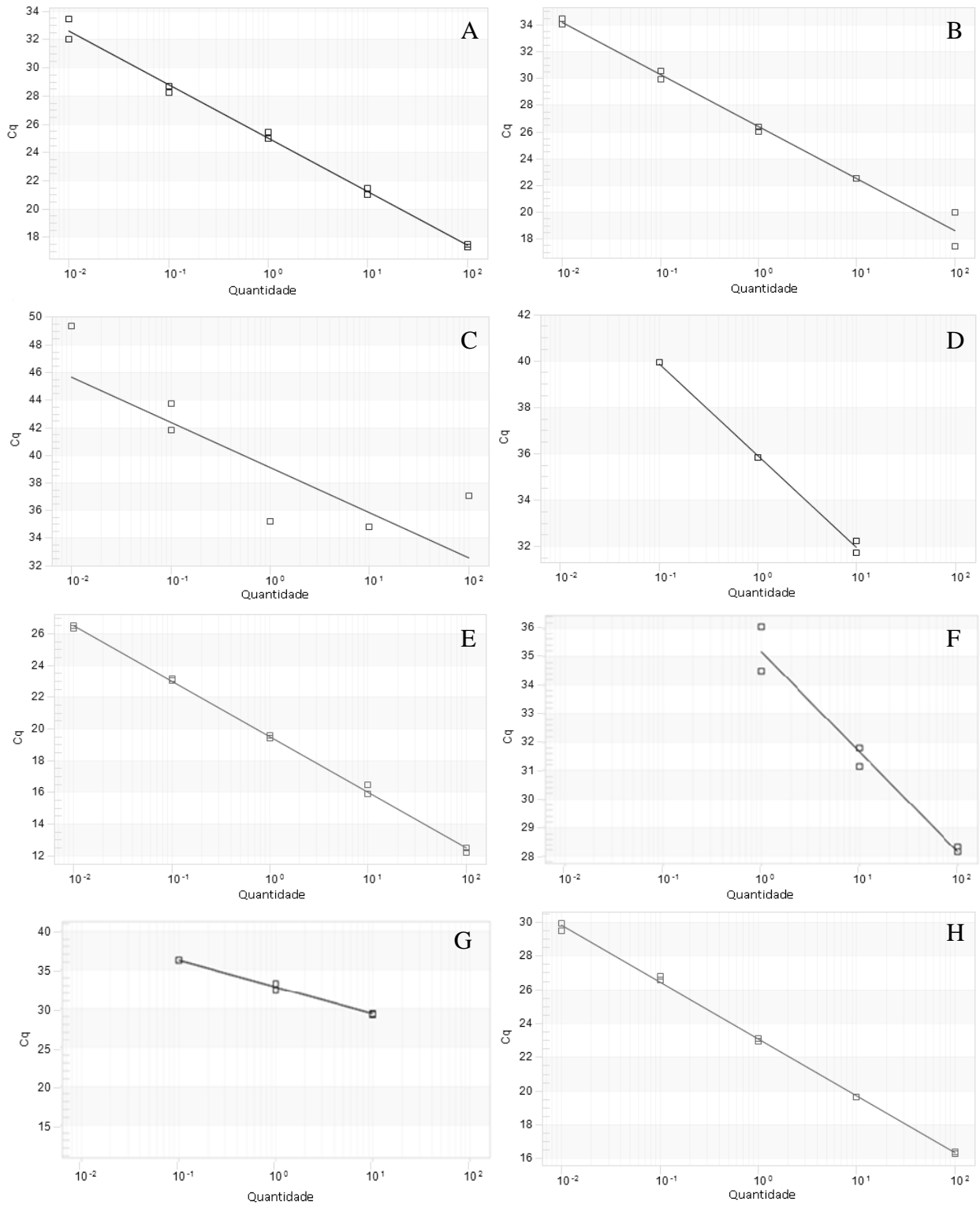


Figura 31. Curva de calibração dos *primers* para os genes: (A) *egl1*, (B) *egl2*, (C) *egl3*, (D) *egl4*, (E) *cbh1*, (F) *bgl1*, (G) *xyl1* e (H) *swo1*, obtida a partir de diluição seriada da amostra de cDNA.

Tabela 11. Valores de eficiência calculados a partir de curva de calibração realizada com diluições seriadas da amostra de cDNA para os genes de endoglicanases, celobiohidrolase, β -glicosidade, xilanase e swolenina.

Genes	Slope	R ²	Eficiência (E = 10 ^{-1/slope})
<i>egl1</i>	-3,83	0,994	1,824
<i>egl2</i>	-3,85	0,987	1,818
<i>egl3</i>	-3,98	0,708	1,783
<i>egl4</i>	-3,78	0,997	1,838
<i>cbh1</i>	-3,52	0,998	1,923
<i>bgl1</i>	-3,58	0,973	1,902
<i>xyl1</i>	-3,45	0,988	1,949
<i>swol</i>	-3,38	0,998	1,976

A expressão de endoglicanases foi avaliada a partir da amplificação do cDNA de *P. echinulatum* utilizando-se os *primers* para os genes *egl1*, *egl2*, *egl3* e *egl4*. A expressão de *egl1* na condição de indução, contendo celulose Celufloc E[®] no meio de cultivo, foi superior ao meio composto por BCA e o meio repressor - glicose - (Figura 32). Observa-se um aumento na expressão deste gene a partir de 12 h de cultivo, sendo o pico máximo em 24 h com acúmulo de transcritos 9779,19 vezes superior à condição controle em 0 h. Após este ponto ocorreu um decréscimo acentuado na expressão do gene, chegando a 72 h com um acúmulo de transcrito em torno de 116 vezes. O pico de expressão deste gene para o meio formulado com BCA também foi em 24 h com acúmulo de transcritos 1257,58 vezes superior, seguindo-se para os tempos posteriores um decréscimo gradual do número de transcritos, chegando a 28,48 ao final do cultivo. O meio formulado com glicose proporcionou um perfil de expressão diferenciado das demais condições e quantidades bem reduzidas para os transcritos do gene *egl1* com pico em 72 h correspondendo a um acúmulo de transcritos somente 39,26 vezes superior ao controle.

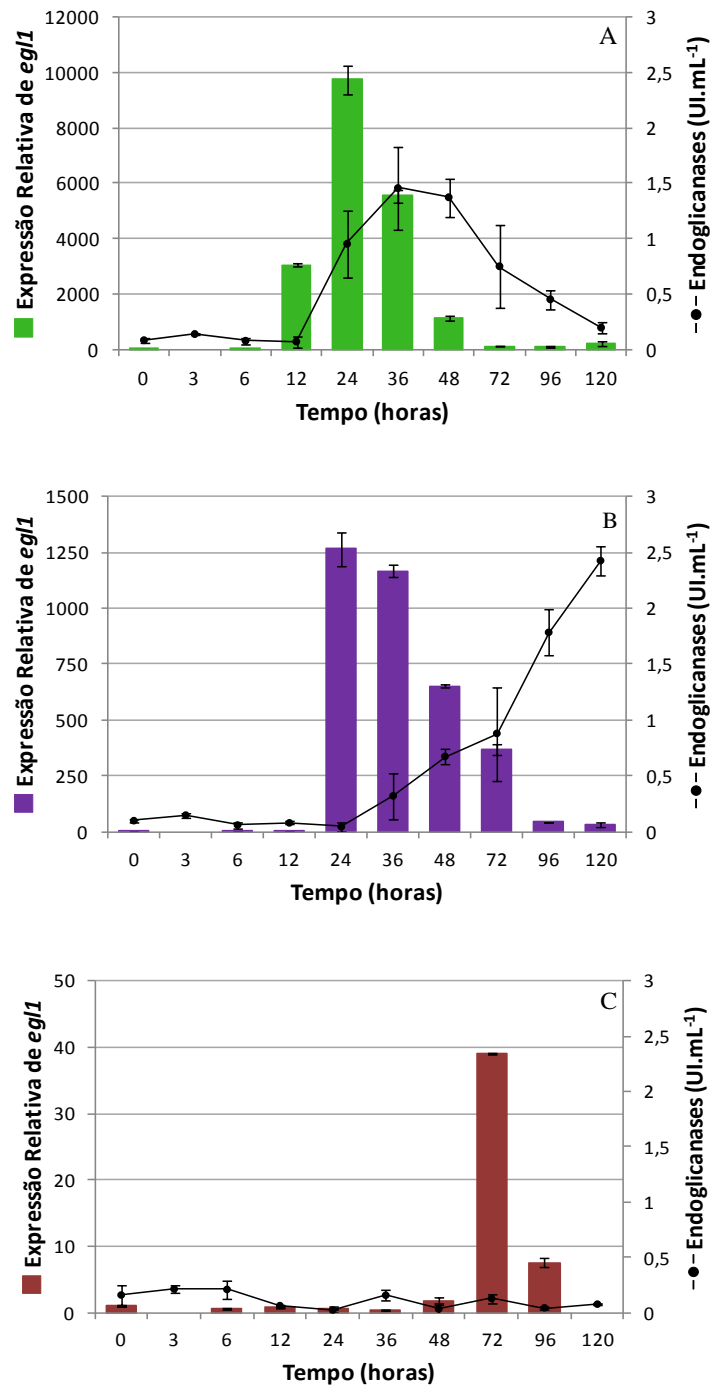


Figura 32. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *egl1* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose, e curva de atividade de endoglucanases.

Matos (2012) observou que o nível de transcritos de *egl1* foi aumentado quando esporos (10^5 esporos.mL⁻¹) de *P. echinulatum* foram cultivados em meio composto por celulose em comparação ao meio repressor (glicose), chegando a uma maior quantidade de transcritos em 48 h na ordem

aproximada de 15000 vezes superior ao controle com glicose em 0 h. Também observou um decréscimo do número de transcritos em 72 h assim como verificado no presente estudo.

É possível observar uma relação entre a expressão do gene *egl1* e a secreção de endoglicanases no cultivo formulado com celulose Celufloc E[®], onde a expressão ocorreu a partir de 12 h refletindo em um aumento de enzima secretada a partir de 24 h. Também é possível verificar que a diminuição na concentração da enzima corresponde ao decréscimo da expressão deste gene.

O perfil de acúmulos de transcritos para o gene *egl2* mostrou-se bastante semelhante ao gene *egl1* ao longo de todo o período nos cultivos formulados com celulose Celufloc E[®] e BCA, porém com quantidades de transcritos acumulados relativamente inferiores, alcançando picos em 24 h correspondentes aos valores 128,52 e 78,01, respectivamente (Figura 33). A expressão deste gene no meio formulado com glicose foi muito reduzida, apresentando somente em 12h de cultivo valores de acúmulo de transcritos de somente 1,06 vezes em relação ao controle. Valores relativos abaixo de 1, como os encontrados no cultivo com glicose, indicam que o gene em questão é reprimido em relação à amostra calibradora (Livak & Schmittgen, 2001).

Assim como para *egl1*, é observada uma relação entre a expressão do gene *egl2* e a secreção de endoglicanases, porém com valores relativamente inferiores. Tanto as expressões destes genes (*egl1* e *egl2*) como a secreção enzimática enquadram-se com a análise do zimograma para endoglicanases (Figura 23), onde novas bandas de hidrólise são visualizadas a partir de 36 h de cultivo, destacando-se o pico de atividade enzimática neste ponto de coleta condizente com uma banda suplementar de hidrólise de baixa massa molecular.

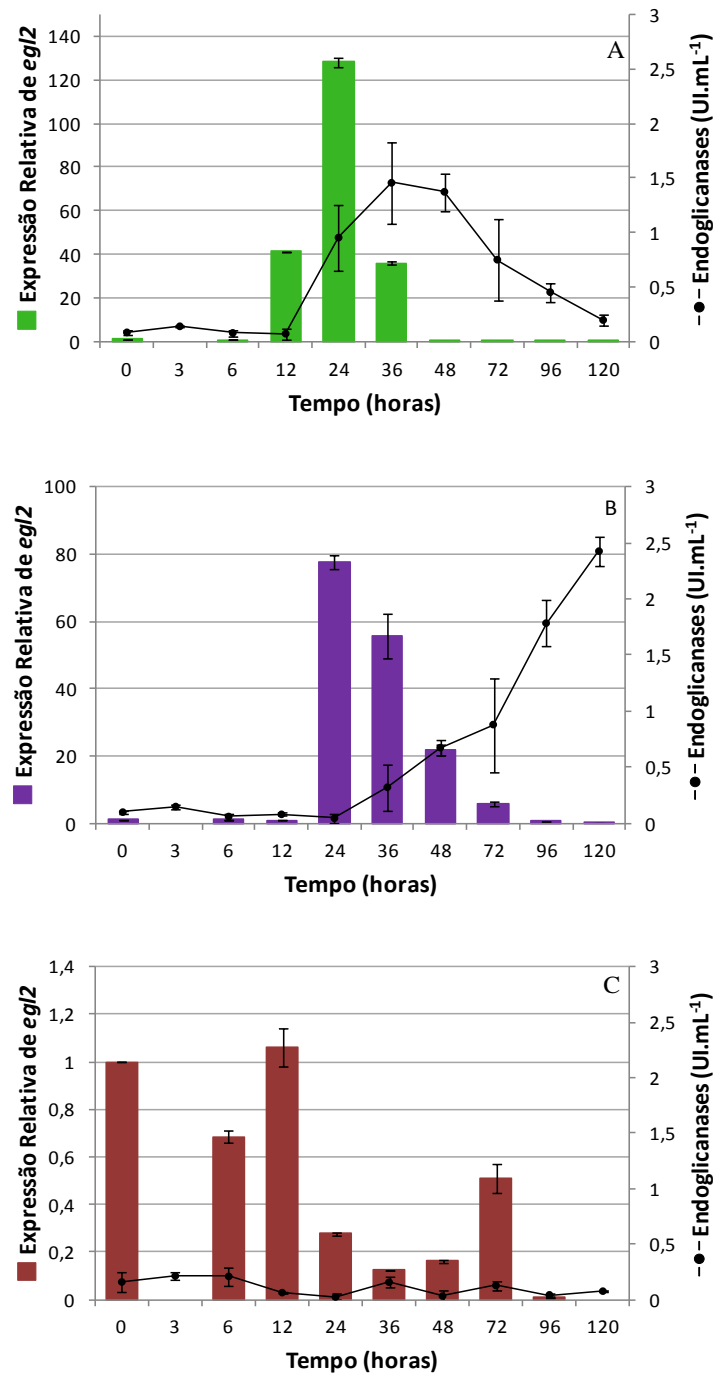


Figura 33. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *egl2* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose, e curva de atividade de endoglucanases.

A expressão do gene *egl3* nos micélios crescidos nas três condições estudadas foi significativamente inferior ao observado para os genes *egl1* e *egl2*, e mostra-se evidente somente ao final do cultivo. O meio formulado com celulose Celufloc E[®] proporcionou acúmulo de transcritos 1,18 e 2,78 vezes superior ao controle, em 96 h e 120 h, respectivamente. Os cultivos com BCA e

glicose somente proporcionaram detecção de acúmulos de transcritos em 72 h, correspondendo a valores 1,64 e 1,42 vezes superiores ao controle, respectivamente (Figura 34).

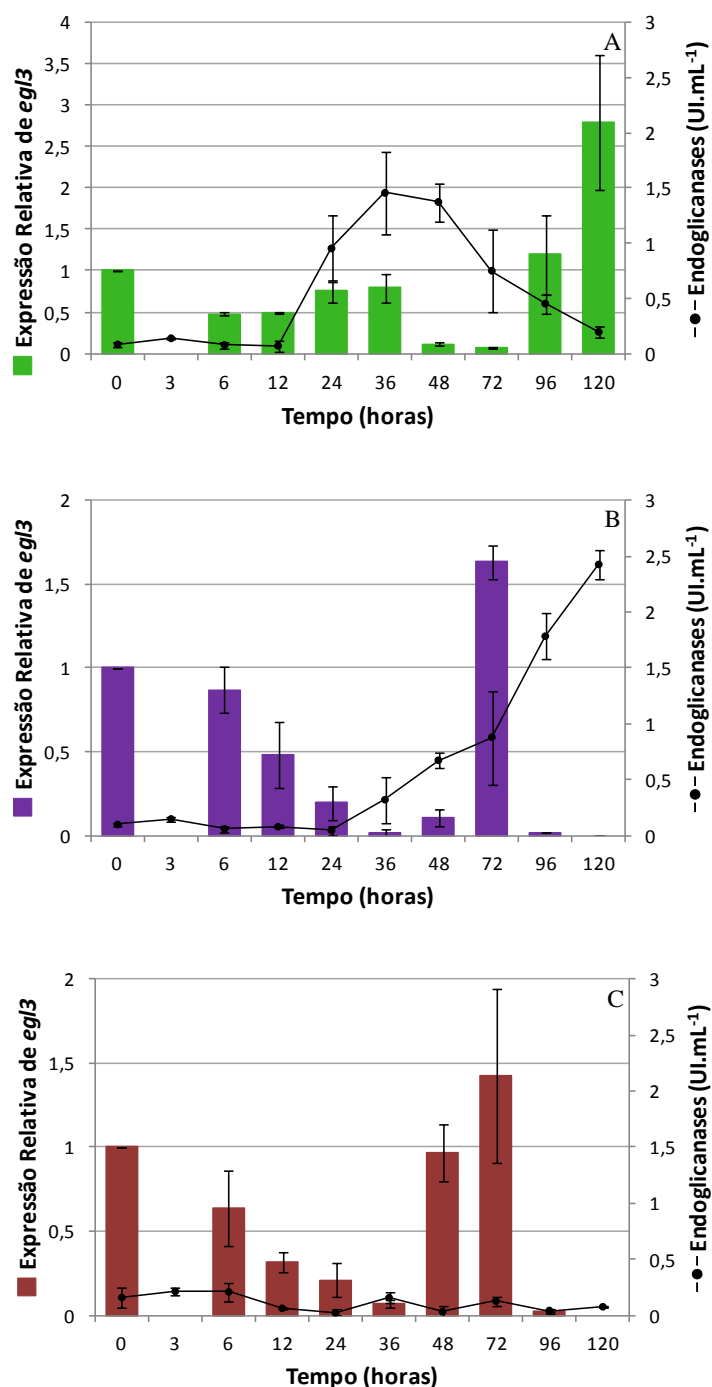


Figura 34. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *egl3* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E®, (B) BCA e (C) glicose, e curva de atividade de endoglicanases.

Assim como para o gene *egl3*, a expressão de *egl4* foi observada somente ao final do cultivo. A Figura 35 apresenta a expressão deste gene em meio formulado com celulose Celufloc

E[®] resultando em acúmulos de transcritos 36,86 vezes superior ao controle em 120 h. Já a expressão em BCA gerou acúmulo de transcritos 6,77 vezes superior ao controle também em 120 h de cultivo. A expressão obtida no meio formulado com glicose também foi reduzida, apresentando pico de acúmulo de transcritos 6,82 vezes superior ao controle em 6 h de cultivo.

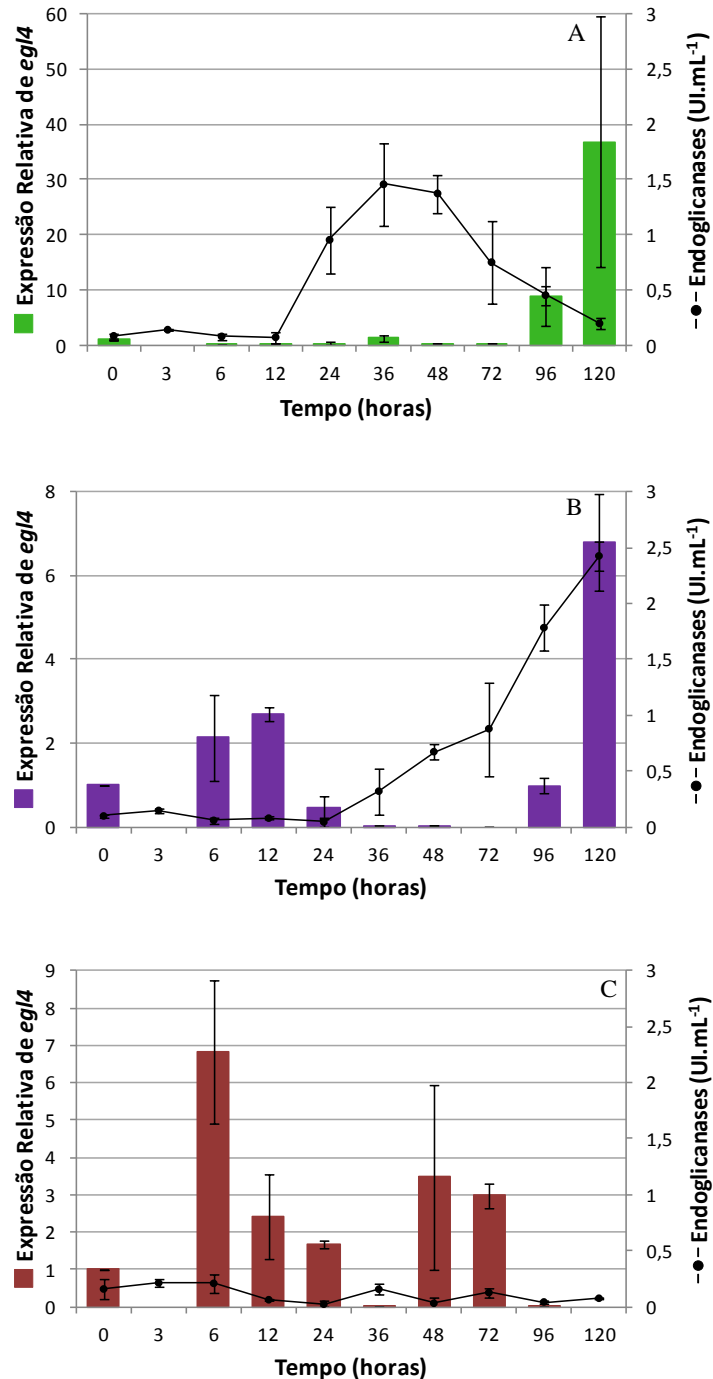


Figura 35. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *egl4* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose, e curva de atividade de endoglicanases.

A expressão obtida a partir do cultivo com BCA também revelou-se semelhante entre os genes *egl1* e *egl2*, corroborando com o início da secreção enzimática, porém, a medida em que ocorre um decréscimo da expressão para estes genes, a concentração enzimática continua aumentando, sugerindo-se a ação de outros genes como responsáveis por esta expressão como mostrado nas figuras 34 e 35 em relação a expressão dos genes *egl3* e *egl4*. Este aumento da concentração enzimática está também comprovado com o aparecimento de novas bandas de hidrólise no zimograma de endoglicanases a partir de 72 h de cultivo (Figura 23B). Assim como as expressões dos genes *egl3* e *egl4* que foram mais tardias, endoglicanases extracelulares de *Chaetomium erraticum* foram mais evidente no 8º dia de cultivo (Soni *et al.*, 1999).

O cultivo formulado com glicose resultou em uma expressão muito reduzida no estudo com os genes *egl1*, *egl2*, *egl3* e *egl4* salientando-se que a concentração endoglicanásica também foi muito restrita, uma vez que trata-se de uma fonte repressora para esta enzima.

O gene *cbh1* apresentou nível de transcritos aumentado quando o *P. echinulatum* foi cultivado em meio composto por BCA em comparação com o cultivo com celulose Celufloc E[®] e glicose, com um aumento do número de transcritos de 6464,49 vezes em 48 h (Figura 36). A expressão deste gene nesta condição iniciou-se em 24 h, mantendo-se ascendente até 48 h, sendo que após ocorreu uma redução no nível de expressão chegando a valores mínimos em 120 h de cultivo. Já o cultivo realizado com celulose Celufloc E[®] proporcionou o pico de expressão deste gene em 24 h correspondendo a um aumento de transcritos de 3093,26 vezes. Este valor permaneceu constante também em 36 h, e posteriormente ocorreu uma queda acentuada de transcritos acumulados, mantendo-se neste padrão até o final do cultivo. O perfil de acúmulo de transcritos obtido a partir do cultivo com glicose apresenta-se diferente dos descritos anteriormente, observa-se a partir de 36 h acúmulo de transcritos 2,85 vezes superior ao controle, sendo que em seguida ocorreu uma queda na quantidade e uma nova elevação correspondendo ao pico para este meio (3,64).

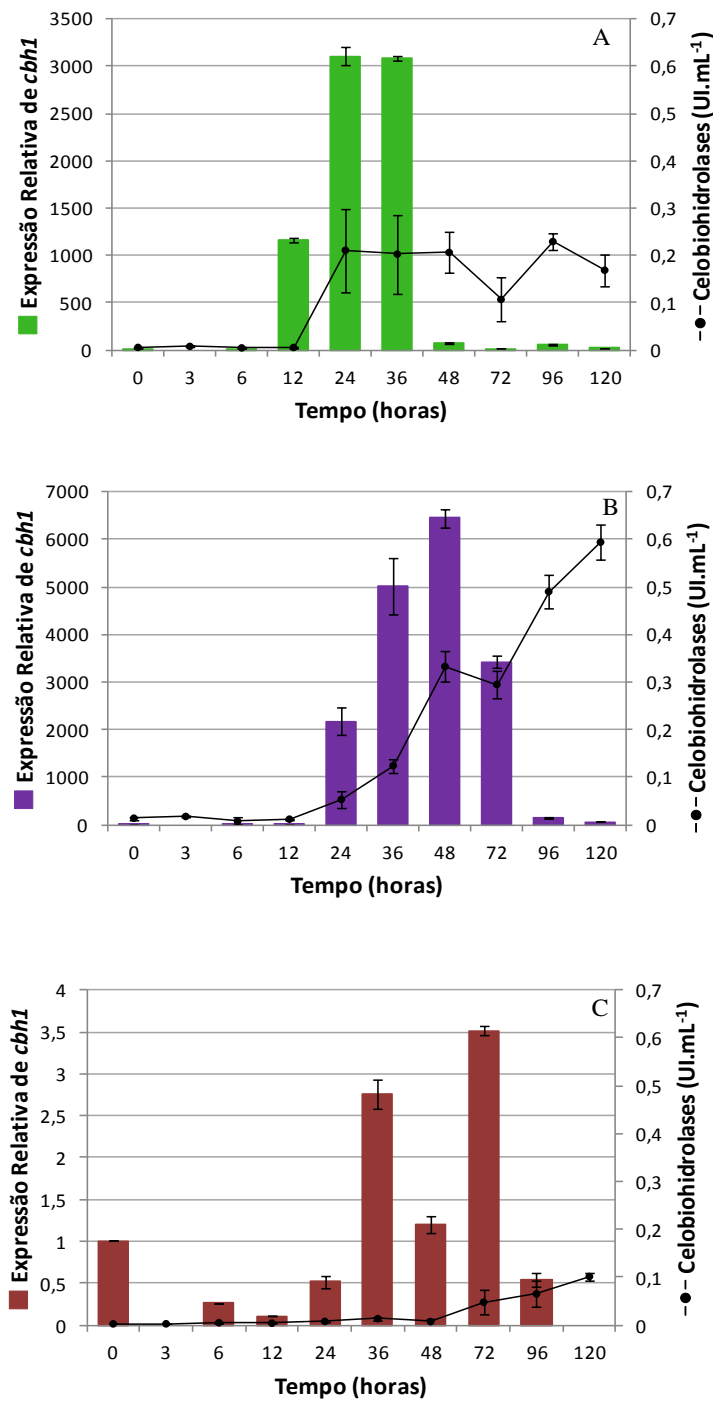


Figura 36. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *cbh1* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose, e curva de atividade de celobiohidrolases.

Em estudo realizado por Matos (2012) observa-se que o nível de transcritos de *cbh* de *P. echinulatum* cultivado em meio composto por celulose foi maior em 48 h, cerca de 15000 vezes superior ao controle de glicose em 0 h, ocorrendo um decréscimo em 72 h, seguido de pequena elevação no número de transcritos em 96 h.

A secreção de celobiohidrolases evidencia dois picos de atividade nos meios formulados com celulose Celufloc E[®] e BCA. O primeiro pico obtido a partir do meio com celulose Celufloc E[®] é coerente com a expressão do gene *cbh1* (Figura 36A) e com o aparecimento de uma banda adicional no zimograma de celobiohidrolases (Figura 24). Em seguida ocorre um novo pico de secreção enzimática correspondendo à ação de outros genes, também sendo destacada uma maior intensidade da banda de hidrólise em 96h.

O meio formulado com BCA apresenta uma secreção enzimática com concentrações crescentes durante todo o cultivo com uma pequena queda em 72 h que condiz ao não aparecimento da banda de hidrólise de 50 kDa no zimograma (Figura 24B), seguida de aumento na atividade enzimática. A expressão de *cbh1* (Figura 36B), que inicia-se em 24 h é refletida com a secreção enzimática, onde o aumento da atividade enzimática dá-se a partir de 36 h. Mesmo com uma queda na expressão de *cbh1* é possível observar a continuidade da secreção de celobiohidrolase provavelmente de responsabilidade de outro gene, assim como foi relatado no estudo de expressão de exoglicanases extracelulares de *C. erraticum* que revelou um aumento no 6^o dia de cultivo em meio formulado com carboximetilcelulose (Soni *et al.*, 1999).

A Figura 37 apresenta os valores de expressão do gene *bgl1* para todas as condições avaliadas, observa-se que a expressão deste gene em meio formulado com BCA foi mais evidente no início do cultivo (12 h) enquanto para celulose Celufloc E[®] a expressão foi mais tardia (120 h). O estudo realizado por Soni *et al.* (1999) também revelou aumento dos níveis de expressão de β -glicosidases de forma mais tardia, no 8^o dia de cultivo. Todavia o meio composto por glicose não expressou o gene *bgl1* com valores superiores à amostra calibradora (amostra em zero hora).

Matos (2012) observou que o nível de acúmulo de transcritos de *bgl* de *P. echinulatum* manteve-se baixo para todos os períodos de cultivo em comparação com os genes *egl*, *cbh* e *swo*, sendo mais significativo em 72 h de cultivo.

O aumento da secreção de β -glicosidases acentua-se a partir de 24 h de cultivo no meio formulado com BCA, corroborando com o aumento da expressão do gene *bgl1* em 12 h (Figura 37B) e o aumento da intensidade das bandas de hidrólise no zimograma (Figura 25B).

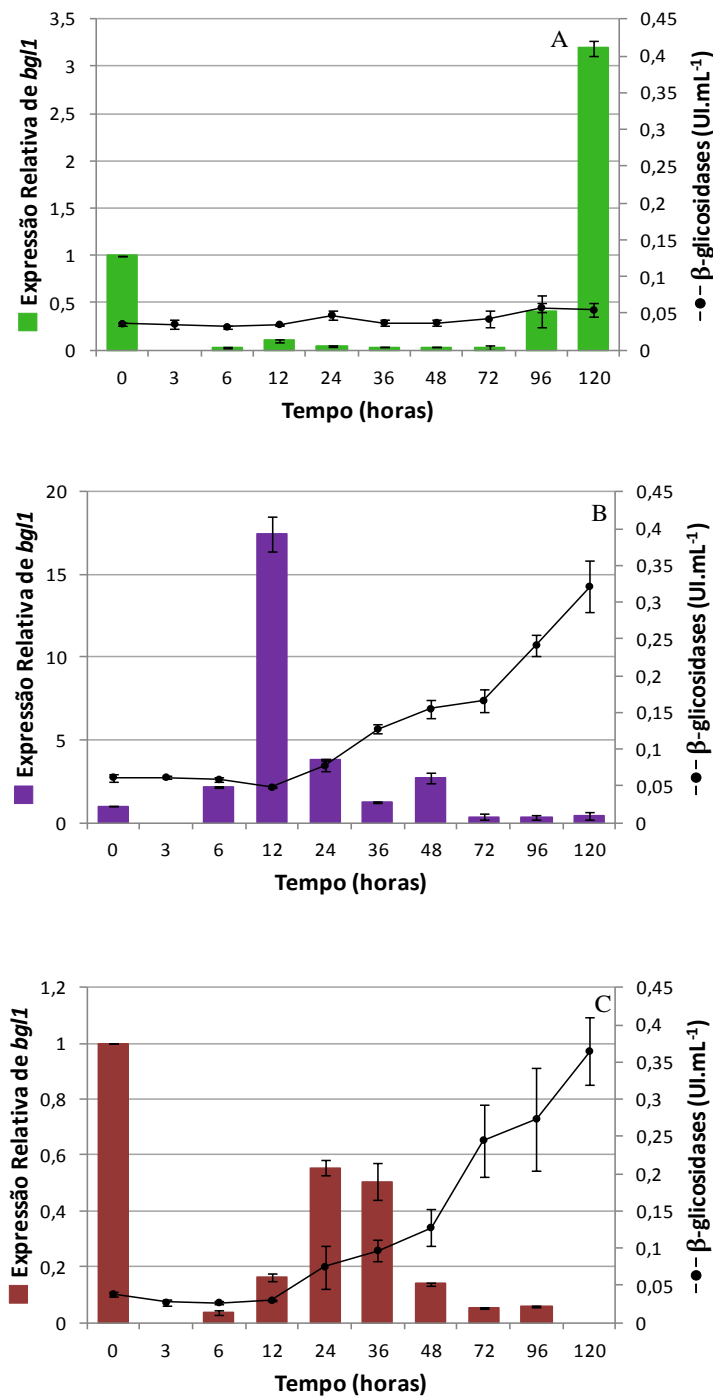


Figura 37. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *bgl1* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®], (B) BCA e (C) glicose, e curva de atividade de β-glicosidases.

As atividades determinadas neste estudo são somente de β-glicosidases extracelulares. Alguns microrganismos também apresentam atividade intracelular, como o *P. purpurogenum*, onde os dois tipos de β-glicosidases podem desempenhar funções diferentes no sistema de indução. A β-glicosidase extracelular pode hidrolisar celo-oligossacarídeos à glicose, enquanto alguns celo-

oligossacarídeos não sujeitos à hidrólise poderiam entrar na célula onde seriam convertidos à gentiobiose pela β -glicosidase intracelular (Suto & Tomita, 2001). Algo semelhante parece ocorrer em *Trichoderma reesei* quando sofrorose entra na célula (Inglin *et al.*, 1980). A deleção de BGLII que codifica a uma β -glicosidase intracelular em *P. decumbens* provocou uma redução de cerca de 70% da atividade desta enzima em comparação à linhagem selvagem, porém resultou em um incremento nas atividades extracelulares de FPA, celobiohidrolases, endoglicanases e xilanases em cultivo com celulose (Chen *et al.*, 2013).

A expressão de genes que codificam enzimas do complexo celulasas geralmente ocorre de forma constitutiva em níveis basais, sendo a repressão catabólica um dos mecanismos de regulação da transcrição, comum entre fungos cultivados em fontes de carbono facilmente assimiláveis (Suto & Tomita, 2001). O crescimento de fungos do gênero *Penicillium* em meio contendo glicose reprimiu a produção de enzimas e somente após a exaustão da glicose esses microrganismos iniciaram a produção de β -glicosidases (Jørgensen *et al.*, 2004). De acordo com o descrito, a Figura 33C demonstra que o *P. echinulatum* produz nível constitutivo de β -glicosidases na presença de glicose, e que o aumento na produção desta enzima inicia-se após o consumo da glicose do meio de cultivo, apesar do gene *bglI* não parecer ser o responsável por esta expressão.

Os resultados obtidos para expressão de celulasas revelam o efeito indutor da celulose em relação à glicose. Estudo de expressão gênica por *Slot blot* mostrou resultados negativos quando os cultivos foram realizados com glicose como fonte de carbono para os genes *cbh1*, *cbh2* e *eglI* de *T. reesei*. Ao contrário, níveis elevados de expressão para estes genes foram observados no cultivo contendo celulose (Ilmén *et al.*, 1997). Os genes que codificam para celobiohidrolase I e endoglicanase I de *T. reesei* são expressos em baixos níveis na ausência de um indutor. Porém, quando a celulose é adicionada ao meio, a expressão destes genes é aumentada significativamente (Carle-Urioste *et al.*, 1997).

Os perfis do gene *xylI* nos cultivos com celulose Celufloc E[®] e BCA são bastante distintos. Enquanto no meio formulado com celulose Celufloc E[®] o maior acúmulo de transcritos ocorreu em 120 h (185,94), em BCA deu-se em 6 h (2,68) (Figura 38).

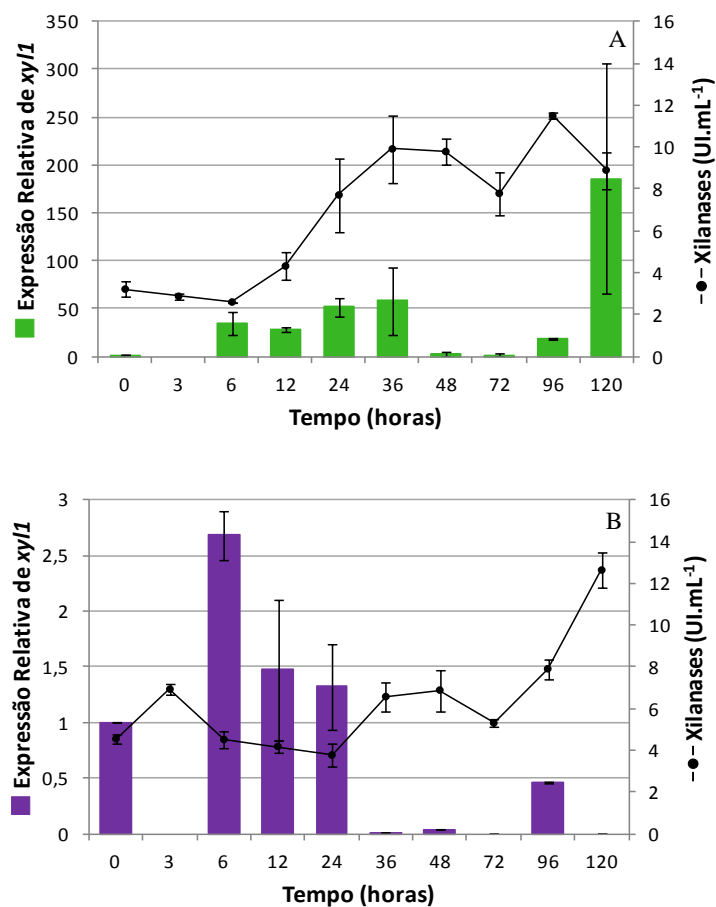


Figura 38. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *xylI* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E[®] e (B) BCA, e curva de atividade de xilanases.

A secreção de xilanases corrobora com os resultados obtidos para a expressão do gene *xylI* no meio formulado com celulose Celufloc E[®], relação essa, que não é possível de se estabelecer ao avaliar os resultados obtidos dos meios formulados com BCA. O gene *xylI* não expressou-se quando o meio foi elaborado com glicose.

Além das enzimas lignocelulolíticas, outras proteínas podem também contribuir para a degradação da lignocelulose de forma ainda não claramente entendida, tal como a família glicosil hidrolase 61, e as proteínas expansinas e swoleninas (Van Dyk & Pletschke, 2012).

As swoleninas são proteínas com ação de afrouxamento da fibra de celulose, pela diminuição das ligações de hidrogênio, o que pode facilitar o acesso das enzimas ao substrato (Saloheimo *et al.*, 2002b). A partir das análises realizadas observou-se uma significativa expressão desta proteína no micélio da linhagem S1M29 de *P. echinulatum*. A expressão do gene *swol1* nas diferentes condições avaliadas pode ser observada na Figura 39, onde evidencia-se o início da detecção de transcritos em 12 h quando o *P. echinulatum* foi crescido em celulose Celufloc E[®]. Esta quantidade foi aumentada

em 24 h (2116,90) e 36 h (2415,60), sendo que após ocorreu um decréscimo chegando ao acúmulo de transcritos na ordem de 286,65 vezes em 48 h.

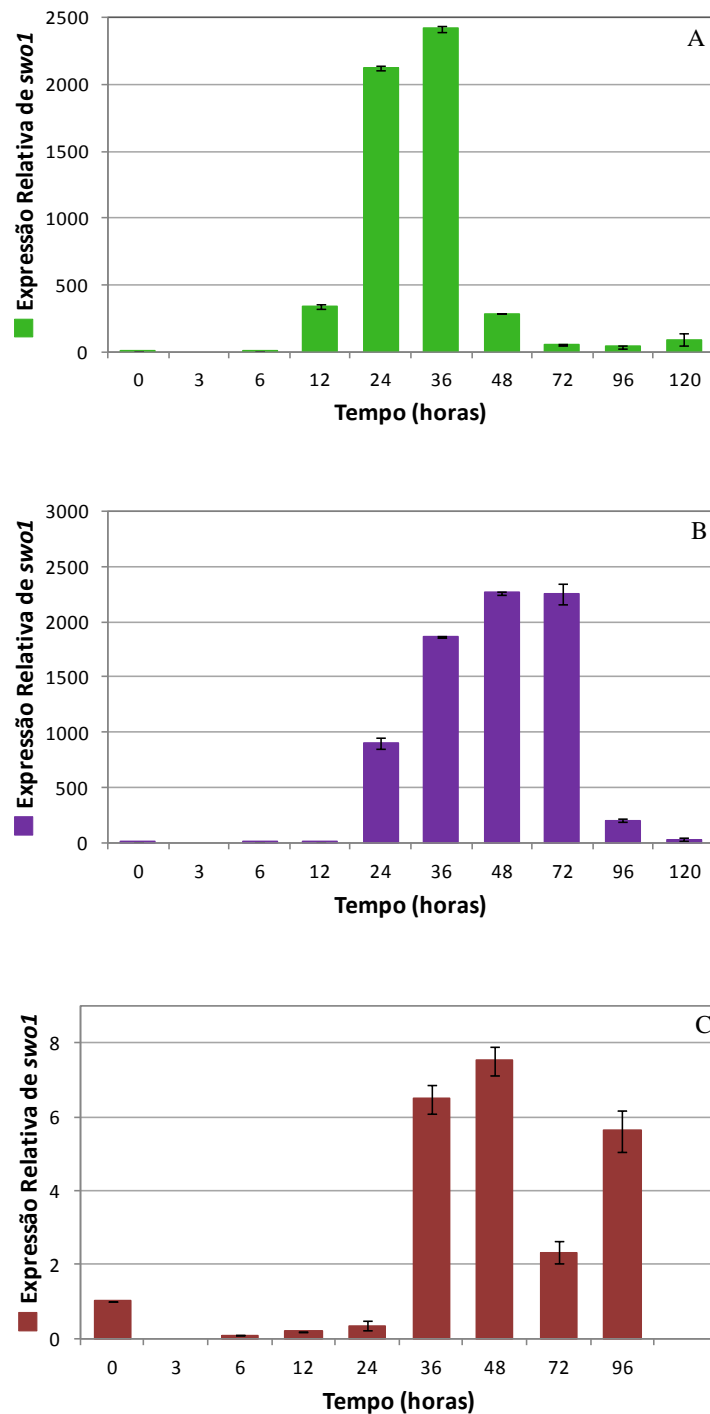


Figura 39. Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *swo1* de *Penicillium echinulatum* por qRT-PCR cultivado em meio formulado com (A) celulose Celufloc E®, (B) BCA e (C) glicose.

A expressão do gene *swol1* em meio formulado com BCA apresenta no pico, em 48 h de cultivo, acúmulo de transcritos 2264,32 vezes superior ao controle, apresentando também nos períodos anteriores e posteriores níveis significativos de expressão (Figura 39B). A expressão de swolenina em meio com glicose foi mais reduzida em comparação aos demais meios avaliados, apresentando pico de acúmulo de transcritos 7,75 vezes superior ao controle em 48 h de cultivo.

O gene de swolenina no estudo de Matos (2012) apresentou padrão de acúmulo de transcritos muito semelhante ao dos genes *egl* e *cbh*, com maior nível em 48 h, seguido de decréscimo gradual da quantidade de transcritos atingindo o patamar mínimo em 120 h de cultivo.

Estudo com diversos indutores revelou a sofrose e a celulose *Solka-Floc*[®] com os melhores resultados de expressão para genes de celobiohidrolase, endoglicanases, β -glicosidases e swolenina em *T. reesei*. O meio formulado com celulose proporcionou a obtenção de quantidades relativas de mRNA de 80 a 100 vezes aumentadas para os genes *egl4*, *bgl1*, *egl1* e *cbh1*. A expressão destes genes mostrou-se estritamente correlacionada e possivelmente sejam induzidos pelo fator de transcrição XYR1 (Verbeke *et al.*, 2009).

A expressão do gene da swolenina é regulada por fontes de carbono assim como ocorre para celulasas e hemicelulasas, podendo ter outros genes que codificam para proteínas similares a expansinas em *T. reesei* (Saloheimo *et al.*, 2002b; Verbeke *et al.*, 2009). Estudos indicam o sinergismo das swoleninas com celulasas no processo de degradação de biomassa (Wang *et al.*, 2010), assim como pode ser observado na semelhança do perfil de expressão entre *swol1*, *cbh1* e *egl1*.

Considera-se geralmente que os genes de celulasas são coordenadamente expressos, tendo diferenças em relação aos indutores (Foreman *et al.*, 2003). Isso pode ser novamente comprovado no presente estudo, observando-se os picos de expressão dos genes *egl1*, *egl2* e *cbh1* em 24 h, seguidos do gene *swol1* em 36 h e por fim a ação de *bgl1*, *egl3*, *egl4* e *xyll* em 120 h de cultivo no meio formulado com celulose Celufloc E[®] (Figura 40).

Neste mesmo meio também se evidencia uma maior quantidade de acúmulo de transcritos de *egl1*, seguido do gene *cbh1* e *swol1*. Os demais genes apresentam uma menor quantidade de transcritos acumulados e isso ocorre geralmente de forma mais tardia (Figura 40).

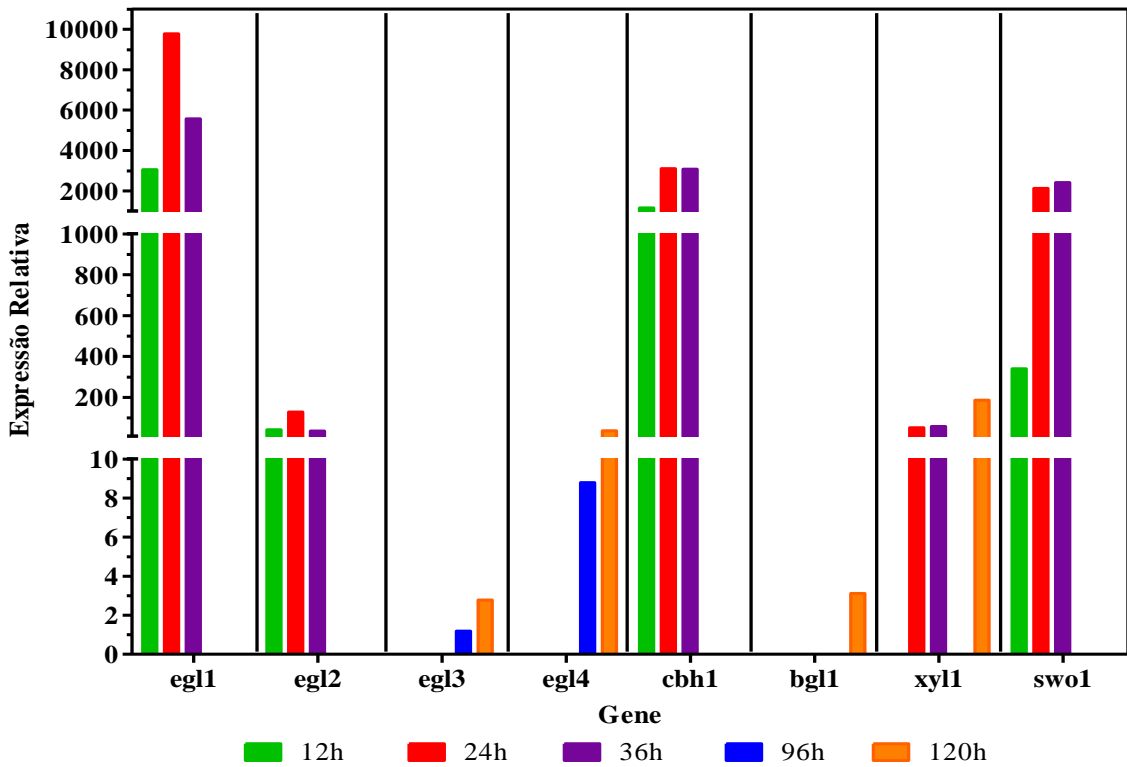


Figura 40. Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes de *Penicillium echinulatum* estudados por qRT-PCR obtidos a partir de cultivos em meio formulado com celulose Celufloc E® em diferentes tempos de indução.

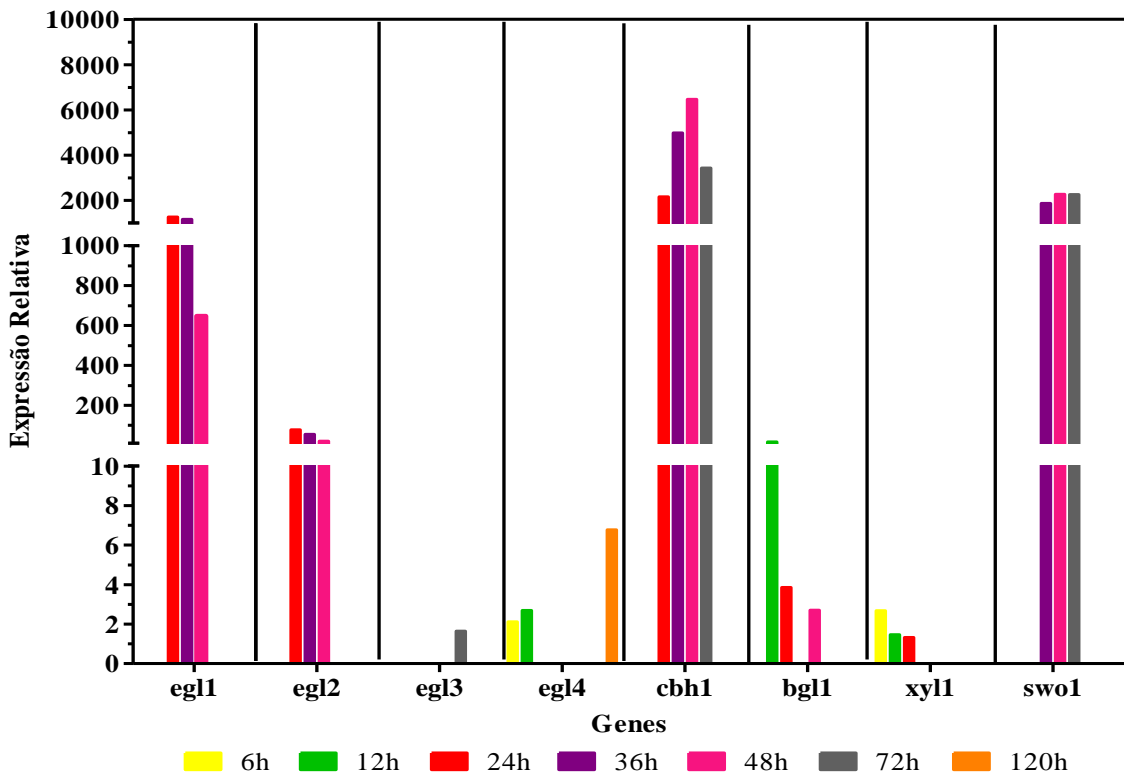


Figura 41. Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes de *Penicillium echinulatum* estudados por qRT-PCR obtidos a partir de cultivos em meio formulado com BCA em diferentes tempos de indução.

A expressão coordenada destes genes também é verificada no meio de cultivo formulado com BCA, onde observa-se inicialmente os picos dos genes *egl1* e *egl2* em 24 h, seguidos dos genes *cbh1* e *swo1* em 48 h (Figura 41). A maior quantidade de transcritos acumulados é observada durante o período de 24 à 48 h para os genes *cbh1*, *swo1* e *egl1*. Os demais genes apresentam menor quantidade de transcritos acumulados que se expressam de forma mais tardia.

O meio formulado com BCA proporciona que o *P. echinulatum* expresse os genes celulolíticos posteriormente em relação ao observado no cultivo elaborado com celulose Celufloc E[®], o que pode ser avaliado a partir da análise das Figuras 40 e 41 que apresentam os picos de expressão de cada gene estudado utilizando-se estes dois meios de cultivo.

Expressão relativamente reduzida é observada quando *P. echinulatum* foi cultivado em meio com glicose. A maior quantidade de transcritos acumulados foi de cerca de 39 vezes superior à amostra calibradora, em 72 h de cultivo, para o gene *egl1*. Os demais genes apresentam número de transcritos acumulados inferior à 8 vezes relativo à amostra calibradora (Figura 42).

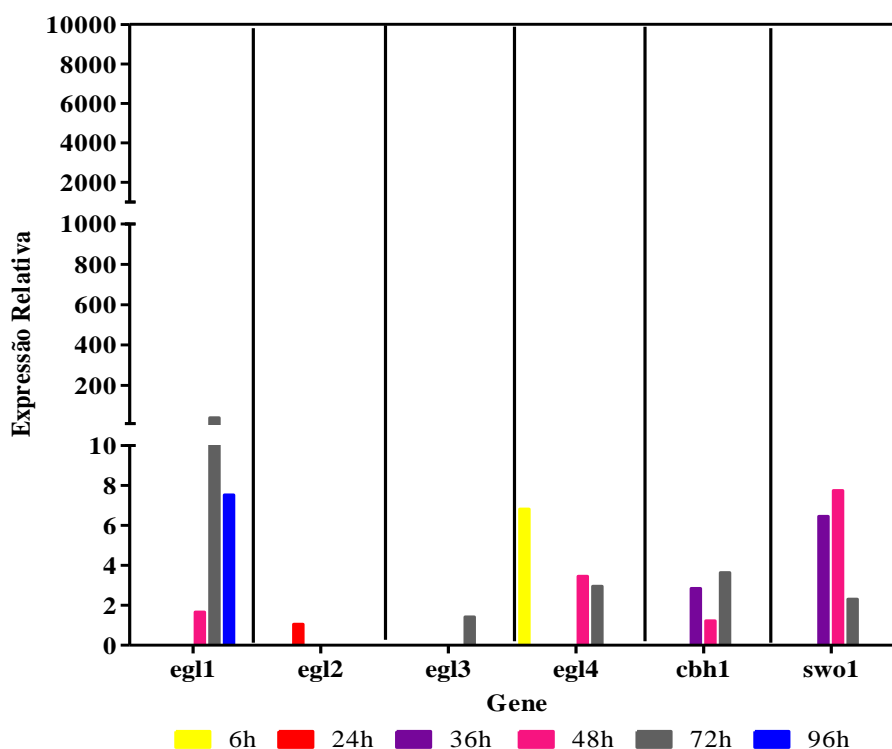


Figura 42. Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes de *Penicillium echinulatum* estudados por qRT-PCR obtidos a partir de cultivos em meio formulado com glicose em diferentes tempos.

Diante disso, verifica-se uma maior expressão de endoglicanase, celobiohidrolase e swollenina por *P. echinulatum*, e que estes genes expressos diferenciam-se em número de transcritos

de acordo com a fonte de carbono fornecida ao fungo no meio de cultivo. Estes resultados também comprovam a eficácia do uso de biomassa lignocelulósicas para a produção destas enzimas.

O presente trabalho trata-se do primeiro estudo de expressão de genes de celulases, hemicelulase e swolenina por *P. echinulatum* S1M29. Os resultados demonstram ação indutora da celulose Celufloc E[®] e do BCA e a ausência de indução por glicose. Ainda, a presença de swolenina é um importante acesso para auxiliar a ação de endoglicanases e celobiohidrolases em processos de hidrólise enzimática.

A análise da expressão de diferentes genes, sua ação em diferentes condições de cultivo e na degradação de materiais lignocelulósicos são importantes fatores para o entendimento da expressão gênica de *P. echinulatum*, fornecendo informações para a otimização dos processos de cultivo e conseqüentemente, incremento na produção de enzimas, objetivando a obtenção de produtos com interesse biotecnológico, como o etanol de segunda geração.

5. CONCLUSÕES

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

a) Quanto às atividades enzimáticas:

A linhagem S1M29 de *P. echinulatum* apresenta atividade enzimática sobre papel filtro em condições de indução, alcançando, com BCA, atividade 2,9 vezes superior do que com celulose Celufloc E[®], sendo que o BCA também proporciona maiores secreções de endoglicanases e celobiohidrolases em relação às demais fontes de carbono estudadas, porém quando cultivado em celulose Celufloc E[®], o fungo secreta estas enzimas precocemente e, ainda, proporciona maior secreção de xilanases. As maiores atividades de β -glicosidases são observadas nos meios formulados com BCA e glicose.

b) Quanto aos perfis de proteínas secretadas e zimogramas:

Os perfis de bandas de proteínas secretadas pelo fungo são diferenciados nas três fontes de carbono avaliadas. *P. echinulatum* produz endoglicanases e β -glicosidases constitutivas com massas moleculares correspondente a 80 kDa e 250 kDa, respectivamente. Diferentes formas de celobiohidrolases são secretadas pelo fungo e os perfis de bandas de atividade de xilanases são semelhantes nos meios formulados com celulose Celufloc E[®] e BCA.

c) Quanto à seleção de gene normalizador para estudos de expressão:

β -actina é o gene mais estável para ser utilizado como controle interno em estudos de expressão gênica de *P. echinulatum*.

d) Quanto às expressões de genes para celulases, β -glicosidase, xilanase e swolenina:

P. echinulatum apresenta, pelo menos, quatro genes para endoglicanases com padrões de expressão distintos. Observou-se a expressão de mRNA de swolenina, uma importante proteína acessória para a hidrólise de lignocelulósicos, em todas as fontes de carbono avaliadas, indicando sua produção pelo *P. echinulatum*. Os genes para endoglicanases (*egl1*, *egl2*, *egl3* e *egl4*), xilanase (*xy11*) e swolenina (*swol1*) são mais expressos em condição de indução, com valores mais elevados obtidos a partir do cultivo formulado com celulose Celufloc E[®], e a expressão dos genes para celobiohidrolase (*cbh1*) e β -glicosidase (*bg11*) é maior quando o cultivo é realizado com BCA, contudo, a presença de glicose no meio de cultivo não favorece a expressão de genes para celulases, xilanase e swolenina. Também é possível verificar uma expressão coordenada dos genes para endoglicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e swoleninas em *P. echinulatum*.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas relacionadas a este trabalho, sugere-se:

- o sequenciamento e a anotação do genoma do *P. echinulatum* visando a obtenção de *primers* específicos para outros genes;
- realização de análises de RNA-seq obtidos de micélios crescidos em diferentes fontes de carbono;
- a avaliação de outros genes de enzimas e proteínas para hidrólise de lignocelulósicos expressas pelo *P. echinulatum*;
- a investigação de outras fontes de carbono incluindo outras formas de biomassa lignocelulósica;
- o estudo de condições de cultivo que influenciam a expressão gênica neste fungo;
- a avaliação da expressão gênica a partir de condições de cultivo otimizadas em maiores escalas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidoo, K.E., Hendry, R., Wood., B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 12:6-9.
- Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research.** 64:5245-5250.
- Anish, R.; Suto, M.; Tomida, F. (2007). Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims. **Biotechnol. Bioeng.** 96:48-56.
- Arantes, V.; Saddler, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol. Biofuels.** 3:4. doi:10.1186/1754-6834-3-4
- Arantes, V.; Saddler, J.N. (2011). Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Biofuels.** 4:3.
- Armstrong, M.R.; Whisson, S.C.; Pritchard, L.; Bos, J.I.B.; Venter, E.; Avrova, A.O.; Rehmany, A.P.; Böhme, U.; Brooks, K.; Cherevach, I.; Hamlin, N.; White, B.; Fraser, A.; Lord, A.; Quail, M.A.; Churcher, C.; Hall, N.; Berriman, M.; Huang, S.; Kamoun, S.; Beynon, J.L.; Birch, P.R.J. (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. **PNAS.** 102:7766-7771.
- Aro, N.; Ilmen, M.; Saloheimo, A.; Penttilä, M. (2003). ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. **Appl. Environ. Microbiol.** 69:56–65.
- Aro, N.; Pakula, T.; Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.** 29:719-739.
- 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: 24309-24014.
- Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23: 257-270.
- Balanço Energético Nacional 2013 – Ano base 2012: Relatório síntese. Rio de Janeiro. **EPE.** 2013. 55p. **Disponível (online)** <https://ben.epe.gov.br/default.aspx> (Março de 2014).

- 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> (Janeiro de 2011).
- Banco Mundial (2013). O que está impedindo a América Latina de se tornar uma grande potência no setor de alimentos? **Disponível (online)** <http://blogs.worldbank.org/latinamerica/pt/o-que-est-impedindo-am-rica-latina-de-se-tornar-uma-grande-pot-ncia-no-setor-de-alimentos> (Abril de 2015).
- Bar, T.; Ståhlberg, A.; Muszta, A.; Kubista, M. (2003). Kinetic outlier detection (KOD) in real-time PCR. **Nucl. Acids Res.** 31(17):105.
- Barker, B.; Kroll, K.; Vödisch, M.; Mazurie, A.; Kniemeyer, O.; Cramer, R.A. (2012). Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using a nitrogen-controlled fermenter. **BMC Genomics.** 13:62. doi: 10.1186/1471-2164-13-62.
- Basso, V.; Machado, J.C.; Lédo, F.J.S.; Carneiro, J.C.; Fontana, R.C.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2014). Different elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions as substrates for enzyme production for the hydrolysis of lignocellulosic materials. **Biomass Bioenergy.** 71:155-161.
- Bazzolli, D.M.S.; Ribon, A.O.B.; Reis, K.C.P.; de Queiroz, M.V.; de Araújo, E.F. (2008). Differential expression of *plg* genes from *Penicillium griseoroseum*: *plg1* a pectinolytic gene is expressed in sucrose and yeast extract. **J. Appl. Microbiol.** 105:1595–1603.
- Beeson, W.T.; Phillips, C.M.; Cate, J.H.D.; Marletta, M.A. (2012). Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. **J. Am. Chem. Soc.** 134: 890–892.
- 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.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol Adv.** 18: 355-383.
- Bhatia, P.; Taylor, W.R.; Greenberg, A.H.; Wright, J.A. (1994). Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. **Anal. Biochem.** 216:223-226.

- Bittencourt, L.R., Silveira, M.M., Dillon, A.J.P. (2002). In: VII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Brazil: Resumos, pp. 209.
- 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.
- Brotman, Y.; Briff, E.; Viterbo, A.; *et al* (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. **Plant Physiol** 147:779–789
- Byrne, K.A.; Lehnert, S.A.; Johnson, S.E.; Moore, S.S. (1999). Isolation of a cDNA encoding a putative cellulase in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Gene.** 239:317–324.
- Camassola, M.; Bittencourt, L.R.; Shenem, N.T.; Andreaus, J.; Dillon, A.J.P. (2004). Characterization of the cellulose complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransf.** 22: 391-396.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007a). 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.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007b). Effect of methylxanthines on production of cellulases by *Penicillium echinulatum*. **J. Appl. Microbiol.** 102: 478-485.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2009). Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Ind. Crop. Prod.** 29:642-647.
- 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. (2012a). Steam-exploded sugar cane bagasse for one-site production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Energy Fuels.** 26:5316-5320.

- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2012b). Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. **J. Anal. Bioanal. Techniq.** 1:125. doi:10.4172/scientificreports.125.
- Carbohydrate Active Enzymes. **Disponível (online)**. www.cazy.org (Março de 2014).
- Carle-Urioste, J.C.; Escobar-Vera, J.; El-Gogary, S.; Henrique-Silva, F.; Torigoi, E.; Crivellaro, O.; Herrera-Estrella, A.; El-Dorry, H. (1997). Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **J. Biol. Chem.** 272:10169-10174.
- Carrasco, C.; Baudel, H.M.; Sendelius, J.; Modig, T.; Roslander, M.; Galbe, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Zacchi, G.; Lidén, G. (2010). SO₂-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme Microb. Tech.** 46:64-73.
- 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.
- Chávez, R.; Bull, P.; Eyzaguirre, J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **J. Biotechnol.** 123: 413–433.
- Chen, M.; Qin, Y.; Cao, Q.; Liu, G.; Li, J.; Li, Z.; Zhao, J.; Qu, Y. (2013). Promotion of extracellular lignocellololytic enzymes production by restraining the intracellular β -glucosidase in *Penicillium decumbens*. **Bioresour. Technol.** 137:33–40.
- Chen, M.; Zhao, J; Xia, L.M. (2008). Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. **Carbohydr. Polym.** 71:411–415.
- Chahal, D.S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 205-10.
- Choi, J.K.; Holtzer, S.; Chacko, S.A.; Lin, Z.X.; Hoffman, R.K, Holtzer, H. (1991). Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. **Mol. Cell. Biol.** 11(9):4473-4482.
- 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.
- Cosgrove, D.J. (2000a). Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature.** 407:321-326.
- Cosgrove, D.J. (2000b). New genes and new biological roles for expansins. **Curr. Opin, Plant Biol.** 3:73-78.

- 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.
- Cuomo, C. *et al.* (2007). The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. **Science.** 317:1400–1402.
- Czechowski, T.; Stitt, M.; Altmann, T.; Udvardi, M.K.; Scheible, W.R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 139:5-17.
- D’Almeida, M.L. (1988). Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: Celulose e papel – Tecnologia da fabricação de pasta celulósica. 2ª ed., v. 1, **Instituto de Pesquisa do Estado de São Paulo**, São Paulo.
- Damaso, M.C.T.; Andrade, C.M.M.C.; Pereira Jr, N. (2002). Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* 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.
- Dashtban, M.; Schraft, H.; Qun, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. **Int. J. Biol. Sci.** 5(6):578-595.
- De Vries, R.P.; Visser, J.; de Graaff, L.H. (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. **Res. Microbiol.** 150:281-285.
- Dence, C.W. (1992). The determination of lignin. In: Methods in lignin chemistry. Lin, S.Y.; Dence, C.W. New York: **Springer Verlag.** 33-61
- Deshpande, M.V.; Eriksson, K.E.; Pettersson, L.G. (1984). An assay for selective determination of exo-1,4-B-glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. **Anal. Biochem.** 238:481-487.
- Dillon, A.J.P. (2004). Celulases. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Editado por Said, S.; Pietro, R.C.L.R. **Editora Legis Summa.** Ribeirão Preto. 243-269.
- Dillon, A.J.P.; Bettio, M.; Pozza, F.G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111:48-53.
- Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2014). Celulases. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Editado por Said, S.; Pietro, R.C.L.R. 2ª edição. **Editora Legis Summa.** Ribeirão Preto. 101-132.

- Dillon, A.J.P.; Camassola, M.; Henriques, J.; Fungaro, M.; Azevedo, A.; Velho, T.; Laguna, S. (2008). Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microbial. Technol.** 43: 403-409.
- Dillon, A.J.P.; Paesi-Toresan, S.O. and Barp, L.B. (1992). Isolation of cellulase producing mutants from *Penicillium* sp. strains denominated 3MUV3424. **Rev. Bras. Genet.** 15: 491-498.
- 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 β -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 740-746.
- 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.
- Esteghlalian, A.; Hashimoto, A.G.; Fenske, J.J.; Penner, M.H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. **Bioresour. Technol.** 59:129–136.
- Ewanick, K.S.; Bura, R. (2011). The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.** 102:2651-2658.
- 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.
- Fleige, S.; Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Mol. Aspec. Med.** 27:126–139.
- Foreman, P.K.; Brown, D.; Dankmeyer, L.; Dean, R.; Diener, S.; Dunn-Coleman, N. S.; Goedegebuur, F.; Houfek, T.D.; England, G. J.; Kelley, A.S.; Meerman, H.J.; Mitchell, T.; Mitchinson, C.; Olivares, H.A.; Teunissen, P.; Yao, J.; Ward, M. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.** 278:31988-31997.
- Fowler, T. (1993). Deletion of the *Trichoderma reesei* b-glucosidase gene, bglII. In: Esen, A. (Ed.), β -Glucosidase, Biochemistry, and Molecular Biology. **American Chemical Society**, Washington, DC, USA. 56-65.
- Galagan, J. *et al.* (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature.** 422:859–868.

- Gámez, S.; González-Cabriales, J.J.; Ramirez, J.A.; Garrote, G.; Vázquez, M. (2006). Study or the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **J. Food Eng.** 74:78-88.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** 59:257-268.
- Gírio, F.M.; Fonseca, C.; Carneiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** 101:4775-4800.
- Gomide, J.L.; Demuner, B.J. (1986). Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método klason modificado. **O Papel.** 47:36-38.
- Gottschalk, L.M.F.; Oliveira, R.A.; Bon, E.P.S. (2010). Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochem. Eng. J.** 51:72-78.
- Gusakov, A.V. (2011). Alternatives *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends Biotechnol.** 29(9):419-425.
- 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.
- Hall, M.; Bansal, P.; Lee, J.H.; Realff, M.J. (2010). Bommarius AS: Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **FEBS J.** 277:1571-1582.
- Harris, P.V.; Welner, D.; McFarland, K.C.; Re, E.; Navarro Poulsen, J.C.; Brown, K.; Salbo, R.; Ding, H.; Vlasenko, E.; Merino, S.; Xu, F.; Cherry, J.; Larsen, S.; Lo Leggio L. (2010). Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of large, enigmatic family. **Biochem.** 49:3305-3316.
- 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. Biophys. Res. Commun.** 228: 229-237.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 280:309-316.
- Henrissat, B.; Callebaut, I.; Fabrega, S.; Lehn, P.; Mornon, J.P.; Davies, G. (1996). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93:5674.

- Himmel, M.E.; Ding, S.-Y.; Johnson, D.K.; Adney, W.S.; Nimlos, M.R.; Brady, J.W.; Foust, T.D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**. 315:804-807. Doi: 10.1126/science.1137016.
- Himmel, M.E.; Ruth, M.F.; Wyman, C.E. (1999). Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 358-64.
- Horn, S.J.; Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Eijsink, V.G.H. (2012). Novel enzyme for the degradation of cellulose. **Biotechnol. Biofuels**. 5:45
- 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.; Penttilä, M.E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1298-1306.
- Ilmén, M.; Thrane, C.; Penttilä, 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.
- Imbeaud, S.; Graudens, E.; Boulanger, V.; Barlet, X.; Zaborski, P.; Eveno, E.; Mueller, O.; Schroeder, A.; Auffray, C. (2005). Toward standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucl. Acids Res.** 33: (6) 56.
- Inglin, M.; Feinberg, B.A.; Loewenberg, J.R. (1980). Partial purification and characterization of a new intracellular β -glucosidase of *Trichoderma reesei*. **Biochem. J.** 185:515-519.
- Jørgensen, H.; Mørkeberg, A.; Krogh, K.B.R.; Olsson, L. (2004). Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. **J. Biotechnol.** 109: 295-299.
- Jurgen, A. A aplicação das celulases em processos de desbotamento. (2001). **Química Têxtil**. 64:5-17.
- Kapoor, M.; Kapoor, R.K.; Kuhad, R.C. (2007). Differential and synergistic effects of xylanase and laccase mediator system (LMS) in bleaching of soda and waste pulps. **J. Appl. Microbiol.** 103(2): 305-317.
- Kapoor, M.; Kuhad, R.C. (2007). Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 145: 125-138.

- Kim, S., Holtzapple, M.T. (2006). Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. **Bioresour. Technol.** 97: 778–785.
- 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.
- Kovács, K.; Szakacs, G.; Zacchi, G. (2009). Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Bioresour. Technol.** 100:1350–1357.
- 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.
- Kubicek, C.P.; Mikus, M.; Schuster, A.; Schmoll, M.; Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnol. Biofuels.** 2:19.
- Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews.** 23: 411–456.
- Kumar, R.; Wyman, C.E. (2009). Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnol. Prog.** 25:302–314.
- Kwon, K-S.; Lee, J.; Kang, H.G.; Hah, Y.C. (1994). Detection of b-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. **Appl. Environ. Microbiol** 60:4584–4586.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. **Nature.** 227: 680–685.
- 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.
- Li, X.; Beeson, W.T.; Phillips C.M.; Marletta, M.A.; Cate, J.H. (2012). Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. **Structure.** 20(6): 1051–1061.
- Ling, M.; Qin, Y.; Li, N.; Liang, Z. (2009). Binding of two transcriptional factors, *Xyr1* and ACEI, in the promoter region of cellulase *cbh1* gene. **Biotechnol. Lett.** 31:227–231.
- Liu, G.; Qin, Y.; Li, Z.; Qu, Y. (2013). Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. **Biotechnol Adv.** 31: 962–975

- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods**. 25: 402-408.
- 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 Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 66:506–577.
- Mach, R.L.; Zeilinger, S. (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60:515–522.
- 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.; Anderotti, R.; Roche, C. (1976). Measurements of saccharifying cellulase. **Biotechnol. Bioengenh. Symp.** 6: 21-23.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1956). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-78.
- Martinez, D. Berka, R.M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Balek, S.E.; Chapman, J.; Chertkov, O.; Coutinho, P.M.; Cullen, D.; Danchin, E.G.; Grigoriev, I.V.; Harris, P.; Jackson, M.; Kubicek, C.P.; Han, C.S.; Ho, I.; Larrondo, L.F.; de Leon A.L.; Magnuson, A.L.; Merino, S.; Misra, M.; Nelson, B.; Putnam, N.; Robbertse, B.; Slamov, A.A.; Schmoll, M.; Terry, A.; Thayer, N.; Westerrholm-Parvinen, A.; Schoch, C.L.; Yao, J.; Barabote, R.; Nelson, M.A.; Detter, C.; Bruce, D.; Kuske, C.R.; Xie, G.; Richardson, P.; Rokhsar, D.S.; Lucas, S.M.; Rubin, E.M.; Dunn-Coleman, N.; Ward, M.; Brettin, T.S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nat. Biotechnol.** 26(5):555-560.
- Martín, C.; Klinke, H.B.; Thomsen, A.B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 426-432.
- Martins, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.** 99: 1417-1424.

- Matos, R.W.M. (2012). O sistema celulolítico de *Penicillium echinulatum*: análise da ultraestrutura miceliana e influência de moduladores epigenéticos. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, DF, Brasil.
- McDonald, P.; Henderson, A.R.; Heron, S.J.E. (1991). The biochemistry of silage. 2 ed. Marlow: **Chalcomb Publications**. 340p.
- Mello-de-Sousa T.M.; Silva-Pereira I.; Poças-Fonseca, M.J. (2011). Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulose genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.** 48:19-26.
- Menegol, D.; Scholl, A.L.; Fontana, R.C.; Dilloj, A.J.P.; Camassola, M. (2014). Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energy Convers. Manage.** doi.org/10.1016/j.enconman.2014.02.071
- Mes-Hartree, M.; Dale, B.E.; Craig, W.K. (1988). Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 29:462–468
- 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. Espoo. VTT Publications 550. 96 p.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Mohsenzadeh, S.; Saupe-Thies, W.; Steier, G.; Schroeder, T.; Fracella, F.; Ruoff, P.; Rensing, L. (1998). Temperature adaptation of house keeping and heat shock gene expression in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.** 25:31–43.
- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R. (2005a). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresour. Technol.** 96:1986–1993.
- National Center for Biotechnology Information – GenBank. **Disponível (online)**. www.ncbi.nlm.nih.gov (Fevereiro de 2012).
- Nailis, H.; Coenye, T.; Van Nieuwerburgh, F.; Deforce, D.; Nelis, H.J. (2006). Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. **BMC Mol. Biol.** 7:25. doi:10.1186/1471-2199-7-25.
- Nakari-Setälä, T.; Paloheimo, M.; Kallio, J.; Vehmaanperä, J.; Penttilä, M.; Saloheimo, M. (2009). Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. **Appl. Environ. Microbiol.** 75:4853–4860.

- Nevarez, L.; Vasseur, V.; Le Dréan, G.; Tanguy, A.; Guisle-Marsollier, I.; Houlgatte, R.; Barbier, G. (2008). Isolation and analysis of differentially expressed genes in *Penicillium glabrum* subjected to thermal stress. **Microbiol.** 154:3752–3765.
- Ninawe, S.; Kuhad, R.C. (2006). Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoalkalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresour. Technol.** 97: 2291–2295.
- Ohnishi, Y.; Nagase, M.; Ichihyanagi, T.; Kitamoto, Y.; Aimi, T. (2007). Transcriptional regulation of two cellobiohydrolase encoding genes (*cel1* and *cel2*) from the wood-degrading basidiomycete *Polyporus arcularius*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 76:1069–78.
- Palma, M.B.; Milagres, A.M.F.; Prata, A.M.R.; Mancilha, I.M. (1995). Influence of Aeration and Agitation Rate on the Xylanase Activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochem.** 31 (2): 141-145.
- Paolacci, A.R.; Tanzarella, O.R.; Porceddu, E.; Ciaffi, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Mol. Biol.** 10:11. doi:10.1186/1471-2199-10-11.
- Penttilä, M.; Lehtovaara, P.; Nevalainen, H.; Bhikhabhai, R.; Knowles, J. (1986). Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. **Gene.** 45:235-263.
- Pereira, B.M.P.; Alvarez, T.M.; Delabona, P.S.; Dillon, A.J.P.; Squina, F.M.; Pradella, J.G.C. (2013). Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. **Bioenerg. Res.** 6:1052–1062.
- 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.
- Pfaffl, M.W., Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. **Biotechnol. Lett.** 23:275-282.
- Pfaffl, M.W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol. Lett.** 26:509-515.
- Phillips, C.M.; Beeson, W.T.IV.; Cate, J.H.; Marletta, M.A. (2011). Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenases potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chem. Biol.** 6:1399-1406.

- Pozzan, F.G. (2011). Efeito de potenciais indutores na expressão de endoglicanases em *Penicillium echinulatum*. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS.
- Pucher, M.E.; Steiger, M.G.; Mach, R.L.; Mach-Aigner, A.R. (2011). A modified expression of the major hydrolase activator in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) changes enzymatic catalysis of biopolymer degradation. **Catal. Today**. 167:122-128.
- 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.
- Ramos, L.P. (2003) The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Quím. Nova**. 26:863-871.
- Reis, L.; Fontana, R.C.; Delabona, P.S.; Lima, D.J.S.; Camassola, A.; Pradella, J.G.C.; Dillon, A.J.P. (2013a). Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresour. Technol.** 146:597–603.
- Reis, L.; Schneider, W.D.H.; Fontana, R.C.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2013b). Cellulase and xylanase expression in response to different pH levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. **Bioenerg. Res.** DOI 10.1007/s12155-013-9345-0.
- Ribeiro, D.A.; Cota, J.; Alvarez, T.M.; Brüchli, F.; Bragato, J.; Pereira, B.M.P.; Pauleti, B.A.; Jackson, G.; Pimenta, M.T.B.; Murakami, M.T.; Camassola, M.; Ruller, R.; Dillon, A.J.P.; Pradella, J.G.C.; Lema, A.F.P.; Squina, F.M. (2012). The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. **PLOS ONE** 7(2):e50571.
- Rollin, J.A.; Zhu, Z.; Sathitsuksanoh, N.; Zhang, Y.H.P. (2011). Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnol. Bioeng.** 108:22-30.
- Rubini, M.R.; Dillon, A.J.P.; Kyaw, C.M.; Faria, F.P.; Poças-Fonseca, M.J.; Silva-Pereira, I. (2010). Cloning, characterization and heterologous expression of the first *Penicillium echinulatum* cellulase gene. **J. Appl. Microbiol.** 108:1187-1198.
- Ruiz, E.; Cara, C.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Castro, E. (2008). Evaluation of steam explosion pré-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalk. **Enzyme Microb. Technol.** 42:160-166.

- Saloheimo, A.; Henrissat, B.; Hoffren, A.M.; Teleman, O.; Penttilä, M. (1994). A novel, small endoglucanases gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. **Mol. Microbiol.** 13:219-228.
- Saloheimo, A.; Aro, N.; Ilmén, M.; Penttilä, M. (2000). Isolation of *acel* 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. (2002a). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -Glucosidase BGLII (CellA). **Appl. Environ. Microbiol.** 68:4546-4563.
- Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; Nyysönen, E.; Bhatia, A.; Ward, M.; Penttilä, M. (2002b). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **Eur J Biochem** 269:4202–4211.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Adv.** 27:185-194.
- 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.
- Sa-Pereira, P., Sofia, A., Carvalho Costa-Ferreira, L.M. (2004). Thermostabilization of *Bacillus subtilis* CCMI. **Enzyme Microb. Technol.** 34: 278-282.
- Saranraj, P.; Stella, D.; Reetha, D. (2012). Microbial cellulases and applications: a review. **Int. J. Biochem. Biotechnol. Science.** 1:2-12.
- 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.
- Schneider, W.D.H. (2014). Secretômica e atividades enzimáticas da linhagem selvagem 2HH e do mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- Schneider, W.D.H.; Reis, L.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2014). Morphogenesis and production of enzymes by *Penicillium echinulatum* in response to different carbon sources. **BioMed Research International**. Doi.org/10.1155/2014/254863
- Scholl, A.L.; Menegol, D.; Pitarelo, A.P.; Fontana, R.C.; Zandoná Filho, A.; Ramos, L.P.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2015). Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via

- steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. **Ind. Crop. Prod.** 70:280-291.
- Schulein, M. (1998). Kinetics of fungal cellulases. **Biochem Soc Trans.** 26:164-167.
- Schwarz, W.H.; Bronnenmeier, K.; Grabnitz, F.; Staudenbauer, W. (1987). Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glucans. **Anal. Biochem.** 164:72-77.
- Sehnem, N.T.; Bittencourt, L.R.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 163-167.
- Seiboth, B.; Herold, S.; Kubicek, C.P. (2013). Metabolic engineering of inducer formation for cellulose and hemicellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Subcell. Biochem.** 64:367-390.
- Sheehan, J.; Himmel, M.E. (1999). Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and Development activities for ethanol. **Biotechnol. Prog.** 15:817-27.
- Silva, V.F.N (2009). Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. **Dissertação de mestrado**. Escola de Engenharia de Lorena de São Paulo, Lorena, SP.
- Sipos, B.; Benkő, Z.; Dienes, D.; Réczey, K.; Viikari, L.; Siika-aho, M. (2010). Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-walldegrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 161:347-364.
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008a). Determination of ash in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. NREL/TP-510-42622. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.
- Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008b). Determination of extractives in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. NREL/TP-510-42619. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.
- Sluiter, A.; Hames, b.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. (2011). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **National Renewable Energy Laboratory** - NREL/TP-510-42618. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.

- Smits, J.P.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Van Sonsbeek, H.M.; Knol, 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.
- Soni, R.; Sandhu, D.K.; Soni, S.K. (1999). Localisation and optimisation of cellulase production in *Chaetomium erraticum*. **J. Biotechnol.** 73:43-51.
- Sternberg, D.; Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.
- Strauss, J.; Mach, R.L.; Zeilinger, S.; Hartler, G.; Stöffler, G.; Wolschek, M.; Kubicek, C.P. (1995). Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. **FEBS Lett.** 376: 103-107.
- Stricker, A. R.; Mach, R.L.; de Graaff, L.H. (2008). Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 78:211–220.
- Stricker, A.R.; Grosstessner-Hain, K.; Wurleitner, E.; Mach, R.L. (2006). Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryot. Cell.** 5:2128–2137.
- Suchita, N., Mukesh, K. Ramesh, C.K. (2007). Purification and characterization of extracellular xylanases from *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresour. Technol.** 99(5): 1252-1258.
- Sun, X.; Liu, Z.; Zheng, K.; Song, X.; Qu, Y. (2008). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. **Enzyme Microb. Technol.** 42: 560-567.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.** 83:1-11.
- Suto, M.; Tomita, F. (2001). Induction and catabolite repression mechanisms of cellulases in fungi. **J. Biosci. Bioeng.** 92:305-311.
- Szengyel, Z. (2000). Ethanol from wood cellulase enzyme production. PhD Tesis. **Lund University.** Sweden 54p.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Mol. Sci.** 9:1621–1651.
- Teeri, T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Tibtech.** 15:160-167.

- Teste, M.A.; Duquenne, M.; François, J.M.; Parrou, J.L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Mol. Biol.** 10:99. doi:10.1186/1471-2199-10-99.
- 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.; Vaheri, M.E.O.; Kauppinen, V.S. (1997). Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 8:73-80.
- Van Dyk, J.S.; Pletschke, B.I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotech. Adv.** 30:1458-1480.
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. (2002). Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 3:1-11.
- Verbeke, J.; Coutinho, P.; Mathis, H.; Quenot, A.; Record, E.; Asther, M.; Heiss-Blanquet, S. (2009). Transcriptional profiling of cellulase and expansin-related genes in a hypercellulolytic *Trichoderma reesei*. **Biotechnol. Lett.** 31: 1399-1405.
- Wang, M.; Cai, J.; Huang, L.; Lv, Z.; Zhang, Y.; Xu, Z. (2010) High-level expression and efficient purification of bioactive swollenin in *Aspergillus oryzae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162:2027-2036.
- Wang, S.L., Yen, Y.H., Shih, I.L., Chang, A.C. (2003). Production of xylanases from Rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 917-925.
- 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.
- 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.

- Yang, B.; Wyman, C.E. (2004). Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 86:88–95.
- Yao, Q.; Sun, T.T.; Liu, W.F.; *et al* (2008). Gene cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase, swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72:2799–2805.
- Zaldivar, J.; Nielsen, J.; Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56:17–34.
- Zampieri, D.; Guerra, L.; Camassola, M.; Dillon, AJP. (2013). Secretion of endoglucanases and β -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. **Ind. Crop. Prod.** 50:882-886.
- Zampieri, D.; Nora, L.C.; Basso, V.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2014). Validation of reference genes in *Penicillium echinulatum* to enable gene expression study using real-time quantitative RT-PCR. **Curr. Genet.** 60:231-236. DOI 10.1007/s00294-014-0421-6.
- Zeilinger, S.; Schmoll, M.; Pail, M.; Mach, R.L.; Kubicek, C.P. (2003). Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulose promoter *cbh2* associated with cellulase induction. **Mol. Genet. Genomics.** 270:46–55.
- Zhang, Y.; Zhang, J.; Xiao, P.; Wang, T.; Qu, Y. (2012). Improved cellulase production via disruption of PDE01641 in cellulolytic fungus *Penicillium decumbens*. **Bioresour. Technol.** 123:733–737.
- Zheng, Y.Z.; Lin, H.M., Tsao, G.T. (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnol. Prog.** 14:890–6.

ANEXO 1
Artigo publicado

Validation of reference genes in *Penicillium echinulatum* to enable gene expression study using real-time quantitative RT-PCR

Denise Zampieri · Luísa C. Nora · Vanessa Basso ·
Marli Camassola · Aldo J. P. Dillon

Received: 29 November 2013 / Revised: 16 January 2014 / Accepted: 24 January 2014 / Published online: 8 February 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) is a methodology that facilitates the quantification of mRNA expression in a given sample. Analysis of relative gene expression by qRT-PCR requires normalization of the data using a reference gene that is expressed at a similar level in all evaluated conditions. Determining an internal control gene is essential for gene expression studies. Gene expression studies in filamentous fungi frequently use the β -actin gene (*actb*), β -tubulin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as reference genes because they are known to have consistent expression levels. Until now, no study has been performed to select an internal control gene for the filamentous fungal species *Penicillium echinulatum*. The aim of this study was to evaluate and validate internal control genes to enable the study of gene expression in *P. echinulatum* using qRT-PCR. *P. echinulatum* strain S1M29 was grown in conditions to either induce (cellulose and sugar cane bagasse) or repress (glucose) gene expression to analyze 23 candidate normalization genes for stable expression. Two software programs, *BestKeeper* and *geNorm*, were used to assess the expression of the candidate normalization genes. The results indicate

that the *actb* reference gene is more stably expressed in *P. echinulatum*. This is the first report in the literature that determines a normalization gene for this fungus. From the results obtained, we recommend the use of the *P. echinulatum actb* gene as an endogenous control for gene expression studies of cellulases and hemicellulases by qRT-PCR.

Keywords qRT-PCR · Housekeeping genes · β -Actin · *Penicillium echinulatum*

Introduction

Penicillium echinulatum is an important filamentous fungus owing to its effective production of cellulases and hemicellulases. The *P. echinulatum* variant S1M29 is currently the best cellulolytic mutant of this species (Dillon et al. 1992, 2005, 2011; Martins et al. 2008). Analysis of the product of transcription, mRNA, is the basis for understanding the regulatory mechanisms that control gene expression. A powerful tool to measure the mRNA content of a sample is the quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The main advantages of this method are its high sensitivity, specificity, and accurate quantification (Huggett et al. 2005). Quantification of mRNA by qRT-PCR requires a series of standardizations, i.e., normalization of various parameters such as initial quantity of sample, integrity and quantity of RNA, enzymatic efficiency synthesis of cDNA, PCR amplification, and, most importantly, the use of suitable normalization genes (Bustin 2002; Ginzinger 2002).

Gene expression can be measured by two methods: absolute or relative. In absolute quantification, the absolute number of copies of mRNA is determined by comparison to a standard curve (Pfaffl and Hageleit 2001). In relative

Communicated by Stefan Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00294-014-0421-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Zampieri (✉) · L. C. Nora · V. Basso · M. Camassola ·
A. J. P. Dillon
Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, P.O. Box
1352, Caxias do Sul, RS 95070-560, Brazil
e-mail: denisezampi@hotmail.com

A. J. P. Dillon
e-mail: ajpdillo@ucs.br

quantification, the level of gene expression is determined using the relative expression of the target gene compared with a normalization gene. Efficient quantification, however, is strongly dependent on the normalization gene and methods used (Pfaffl 2001). This standardization requires a gene expressed in a stable way by the target organism, often called a reference gene, internal control, or house-keeping gene. Selecting the appropriate normalization gene is important to prevent the improper quantification of the target gene. Commonly used normalization genes typically encode proteins responsible for the maintenance of basic cellular structures and metabolism, such as tubulin, actin, the 18S and 28S ribosomal proteins, ubiquitin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Choi et al. 1991; Bhatia et al. 1994; Bustin 2002; Czechowski et al. 2005). The expression of normalization genes should not vary in different cells or tissues, during changes in culture conditions, or under different treatments used in an experiment. However, the stable expression of these genes may vary considerably, and there are several studies aiming at determining the appropriate normalization gene to use for a given experiment (Vandesompele et al. 2002; Czechowski et al. 2005; Cruz et al. 2009).

It is important to select an internal control gene to undertake studies of gene expression. In the present study, the expression levels of 23 candidate normalization genes from the organism *P. echinulatum* were evaluated by qRT-PCR, using the *BestKeeper* and *geNorm* software programs. The candidate genes were evaluated in different growth conditions to evaluate their potential as normalization genes in gene expression studies of cellulase- and hemicellulase-encoding genes.

Materials and methods

Penicillium echinulatum strain S1M29, obtained by hydrogen peroxide mutagenesis employing hydrogen peroxide followed by the selection of mutants in medium supplemented with 2-Deoxyglucose (Dillon et al. 2011), was grown in submerged culture in one of two conditions: induction conditions, which use a medium supplemented with cellulose or sugar cane bagasse pre-treated by steam explosion (SCB), or repression conditions, which use a medium supplemented with glucose.

Submerged culture was carried out in 500-mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of medium containing 10 % (v/v) of a mineral solution comprised of (in g L⁻¹ w/v) KH₂PO₄, 20; (NH₄)₂SO₄, 13; CO(NH₂)₂, 3; MgSO₄·7H₂O, 3; CaCl₂, 3; FeSO₄·7H₂O, 0.050; MnSO₄·H₂O, 0.0156; ZnSO₄·7H₂O, 0.014; and CoCl₂, 0.0020; with 0.1 % (v/v) Tween 80, 0.1 % (w/v) peptone, and with 1 % (w/v) of either cellulose or glucose. SCB was used 2.3 % (w/v) to

obtain 1 % (m/v) of cellulose in the medium. The flasks were inoculated with sufficient conidial suspension to give a final concentration of 1 × 10⁵ conidia per mL and shaken at 28 °C, 180 rpm for 6 days. Samples were removed every 24 h and centrifuged at 2,800g for 10 min. The supernatant was analyzed for extracellular enzyme activity. Total RNA was extracted from the mycelium. No pH testing was performed during the culture period. Experiments were carried out in triplicate.

The SCB was kindly provided by the sugar and ethanol group, Usina Vale do Rosário (Santa Elisa Vale Conglomerate), located in Morro Agudo, São Paulo State, Brazil. This plant processes 250 t of bagasse per day, during the harvest season, for use as cattle feed. The pretreatment is done using around 1 t of dry bagasse into a 5,000-L stainless steel reactor (Caldema Equipamentos Industriais, Sertãozinho, São Paulo, Brazil). The reactor is hermetically sealed, and steam is injected up to a pressure of approximately 1.53 MPa (equivalent to 200 °C is achieved). After 7 min of pressurization, the reactor is suddenly depressurized by an operator standing at a safe distance, and the steam-exploded slurry is discharged into an 8,000-L cyclone, and then collected in a cylindrical container. By centrifuging the slurry at 1,100 rpm (542.1 g) for 10 min in a 100-L semi-industrial centrifuge (Grisanti Máquinas Industriais Ltda, Ribeirão Pires, São Paulo, Brazil), the solid fraction is separated from the liquid fraction. In the laboratory, the bagasse (solid fraction) was dried for 48 h at room temperature.

Samples of mycelium were collected daily by filtration and immediately frozen at -80 °C. The extraction of total RNA was performed from the maceration of the frozen mycelium (100 mg) using liquid nitrogen and Trizol[®] reagent (Invitrogen, United States) according to the protocol of the manufacturer. The samples were then quantified by spectrophotometer, and the quality of the extracted material was verified using 1 % agarose gel electrophoresis. The RNA samples were subsequently treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega, United States). All treated RNA samples were subjected to a polymerase chain reaction using primers to amplify the β-actin gene to dismiss any contamination with genomic DNA. After the assessment of the purity of the extracted RNA, samples were processed to obtain cDNA with the use of the SuperScript III kit/RNase mix (Invitrogen, United States).

A total of 23 genes were selected as candidates for internal control (Table 1). Primers were constructed for these genes using their DNA sequences obtained from the NCBI web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). To test the candidate genes, reactions were carried out with a final volume of 10 μL composed of: 1 μL of primer F, 1 μL of primer R, 5 μL of SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, United States), 2 μL of DEPC-water, and 1 μL of

Table 1 Relation of primers for the candidate genes to internal control

Gene	Primer	Action	Forward/reverse
18S ribosomal RNA	<i>18S</i>	Production of small cytosolic protein ribosomal unit	GGGTCCAACCTCCCACCCGT GGGCCAACACACAAGCCGT
β -Actin	<i>actb</i>	Structural protein of the cytoskeleton	AACTTCTCCTCGAAACCCTCCA GTCGTGTACTGTGAGGTG CAT ACT T
Beta-2-microglobulin	<i>b2m</i>	Beta chain of the histocompatibility complex class I molecules	GCTATCCAGAAAACCCCTCAA CATGTCTCGATCCCAGTAGACGGT
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>g3p</i>	Oxirredutase glycolysis and gluconeogenesis	ACTCAACTGGAGTGTGTCG TGACATAGAGGACTCCCACA
Transcription factor	<i>tf</i>	Connects to DNA by allowing that there is a connection with the enzyme RNA polymerase allowing the transcription	ATTGGTCGACAGCTTGGAGG GCCGAGGACCCCAAATAACA
Glucuronidase	<i>gus</i>	Catalyzes the hydrolysis of glucuronic acid	ATCCACGATCAGTCGGATG GATAGTCCCGTTCGAGCCTG
Elongation factor chloroplasts	<i>eef</i>	Supply of enzyme is necessary for aminoacyl tRNA to the ribosome	TTCCTACTTGGTGTGAAGCAGAT GACTTCCTTACGATTTTCATCGTAA
β -Tubulin	<i>tub</i>	Participation in the process of cell division	GCTGACCACCTAGCTTTGG AGGGAACCTTAGGCAGCATGT
Ubiquitin 5	<i>ubq</i>	Adjustment of proteins using tags in proteins to be degraded	ACCACTTCGACCCCACTACT ACGCCTAAGCCTGCTGGTT
25S ribosomal RNA	<i>25S</i>	Formation of connections peptide during the synthesis of proteins	AAGGCCGAAGAGGAGAAAGGT CGTCCCTTAGGATCGGCTTAC
Endonuclease apurinic/apurimidinic	<i>aa</i>	Repair of nucleotides were damaged or incompatible DNA	AGCACGCCGAATGGAGACA TGCTGTGCATGGACAACCTGTGCA
Factor for initiation of translation in eukaryotes	<i>eif</i>	Involvement in the process of translation and degradation of mRNA and cell growth	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>g3</i>	Oxirredutase glycolysis and gluconeogenesis	CGGCTTCGGTCGTATTGG TGGAGGAGGGGATGATGTT
β -Tubulin	<i>tb</i>	Participation in the process of cell division	AGCGGTGACAAGTACGTTCC ACCCTTGGCCAGTTGTTAC
Calmodulin	<i>cal</i>	Calcium signaling in eukaryotic cells and regulating the activity of many proteins with diverse cellular functions	AGTCGAGGCCACAACAGTCT CGTTGATCATGTCCTGCAAC
Adenosine kinase	<i>ak</i>	Metabolism of purines that phosphorylate adenosine in AMP through hydrolysis of ATP	CTGGAGGACTCCGTTGACAT TCCCAGAGTGGAAAATCCTG
ATP synthase gamma chain	<i>atp</i>	ATP synthesis	AACCTCATTATGCGCCTCAC GGGCTTCCTGAAGCTTTTCT
Ribonucleotide diphosphate reductase	<i>ndp</i>	Activity in the S-phase of cell division, in which occurs the synthesis of DNA	ACMTACTCYCTBCTSATTGA TTCTCVAASAAGTTSCT
Glutamate synthase precursor	<i>gt</i>	Synthesis of glutamic acid	CACGTKATCAACTTCTTCTAC ACCRCGGAAGWAGCAGGTA
Ribonucleotide reductase	<i>rnr</i>	Actuation in conversion of ribonucleotide in desoxirribonucleotides during cell division	GAGACMTACTCYCTBCTSAT CACCRGCCTTCTGGTAGT
Transcription factor PACC	<i>pacc</i>	It connects to the promoters of genes expressed in alkaline environments to activate transcription, and the promoters of genes expressed in environments acids to inhibit them	GCHGATGAYTCGGTSCT TCATTGGDGDARATGRTA
Ubiquitin	<i>ub</i>	Adjustment of proteins using tags in proteins to be degraded	CGGTGGTGGAAACTAATGTC CAGGATCGGTTGTTATTCATTGTAG
β -Tubulin	<i>bt</i>	Participation in the process of cell division	CAACAACATCCAGACCGC GGGTATTGCTGCCAGATATC

cDNA at 10 ng μL^{-1} . Negative control reactions contained 9 μL of mix plus 1 μL of DEPC-water. Reactions underwent an amplification program of 20 s at 95 °C, followed by 40 cycles of 95 °C for 1 min, then 1 min ideal annealing temperature for each primer pair. The dissociation curve (melting curve) was obtained by 15 s at the following temperatures: 95, 65, and 95 °C. All reactions were performed in triplicate.

The 23 potential normalization genes were evaluated based on the analysis of the Cq values and the dissociation curves for each unique primer pair. The most stable gene under the different conditions was assessed, then, that gene was used as the endogenous control to evaluate gene expression of cellulase- and hemicellulase-encoding genes. The selected gene passed the evaluation criteria of efficient amplification and stable expression under different conditions. The primer efficiency was calculated using a standard curve with serial dilutions of the cDNA sample (100, 10, 1, 0.1, and 0.01 ng μL^{-1}) and the formula $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. The stability of candidate gene expression was evaluated using *BestKeeper* (Pfaffl 2001) and *geNorm* (Vandesompele et al. 2002) software programs. The normalization genes selected had good dissociation curves, valid values of Cq, and good expression stability.

Results

Among the 23 internal control candidate genes tested, six showed unspecific annealing and did not yield Cq values, so they were eliminated from the study. The 17 remaining genes were subjected to evaluation of their dissociation curves (Fig. S1). From the analysis of the dissociation curves, we observed that several genes showed curves with numerous peaks, which may indicate non-specific annealing or the presence of primer dimers. The test reactions for these genes were therefore repeated to optimize the annealing temperature and obtain accurate results.

Only four candidate genes were selected for the next step in our analysis, which was running a calibration curve with each primer pair and serial dilutions of the cDNA sample to determine efficiency of amplification and stability of expression. The four genes selected were as follows: actin, transcription factor (*tf*), β -tubulin (*tub*), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*g3*) (Figure S2). The results obtained revealed very low efficiency values for the genes *tf* and *tub* (Table 2), so stability was evaluated only for the genes *actb* and *g3*.

The efficiency values were transferred to the *BestKeeper* software program, as well as the averages of the Cq values obtained. This software performed the correlation of data from the two genes with 15 samples each, and computed

Table 2 Candidate genes to internal control and the respective values of efficiency calculated from the calibration curve performed with serial dilutions of the sample of cDNA

	Slope	R^2	Efficiency ($E = 10^{-1/\text{slope}}$)
<i>actb</i>	−3,098	0.99	2.10
<i>g3</i>	−3,408	0.98	1.96
<i>tub</i>	0.168	0.427	0.0000011
<i>tf</i>	1.538	0.035	0.22

Table 3 Descriptive statistics of two candidate genes to internal control based on their values of Cq and results provided by software *BestKeeper*

	<i>actb</i>	<i>g3</i>
Number of samples	15	15
Geometric mean (Cq)	24.09	27.17
Arithmetic mean (Cq)	24.15	26.60
Cq minimum	21.55	18.77
Cq maximum	27.29	36.68
Standard deviation (Cq)	1.48	4.28
Coefficient of variation (% Cq)	6.23	15.52
Min (x-fold)	−6.59	−285.22
Max (x-fold)	10.74	601.20
\pm SD (x-fold)	3.00	24.00

the following descriptive statistics: arithmetic and geometric mean of Cq, Cq minimum and maximum, standard deviation, and coefficient of variation (Table 3). From the descriptive analysis observed for the *actb* and *g3* genes, it took into consideration the most stable expression, and the gene with smaller values for standard deviation and coefficient of variation. The results provided by *BestKeeper* indicated the *actb* gene as the most stable gene, with a lower standard deviation value between the samples and, consequently, a lower coefficient of variation. The expression of *actb* changed by 1.48-fold, while the expression of *g3* changed by 4.28-fold; *g3* also showed a high coefficient of regulation (± 24 -fold).

The software *geNorm* calculates the average stability of expression by providing a value M, allowing the exclusion of less suitable genes, i.e., with higher values of M. The evaluation of the four selected genes with *geNorm* indicated the following order of stability: *actb*, *tub*, *g3*, and *tf* (Fig. 1). Considering the cultivation of *P. echinulatum* S1M29 in three different culture conditions (cellulose, SCB, and glucose), the gene with the best stability was *actb*, with an M-value of 5.877, and the gene with the worst stability was *tf*, with an M-value of 10.556 (Table 4).

Fig. 1 Decreasing stability values for candidate reference genes for gene expression studies in *P. echinulatum* S1M29, as estimated by *geNorm*

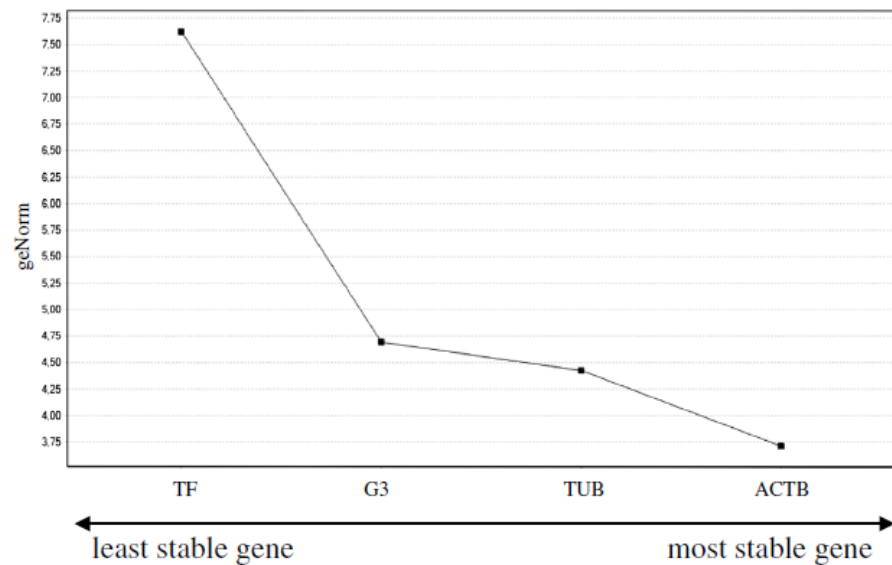


Table 4 Candidate reference genes analyzed from different cultures of *P. echinulatum* S1M29 and ranked according to the value of stability (*M*) by software *geNorm*

Gene	Value of stability (<i>M</i>)	Coefficient of variation (CV)
<i>actb</i>	5.877	1.834
<i>tub</i>	6.017	0.720
<i>g3</i>	8.045	3.598
<i>tf</i>	10.556	3.737

Discussion

Studies of *P. echinulatum* reveal the potential of its enzymes for applications in the textile industry, and in the hydrolysis of cellulose for production of second-generation ethanol. *P. echinulatum* enzymes are especially promising owing to the good thermal stability of the cellulolytic complex (Camassola et al. 2004) and high secretion of β -glucosidases (Martins et al. 2008). This is the first study characterizing and validating normalization genes that can be used for gene expression studies in *P. echinulatum*, allowing future work to search for a better understanding of this complex, cellulolytic fungus.

The results obtained from the two software programs, *BestKeeper* and *geNorm*, proved to be similar, indicating the *actb* gene as the most stable among four candidate genes. This actin gene had already been used as an internal control of gene expression for the same fungus in a study conducted by Matos (2012), but without prior analysis of selection and validation of other reference genes.

Paolacci et al. (2009) demonstrated that new normalization genes might be used in lieu of the traditionally applied

normalization genes (β -tubulin, ubiquitin, β -actin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), emphasizing the importance of studies to select and validate internal control genes for each experimental situation.

The gene for β -tubulin is already being used as an internal control gene in studies of gene expression of *Aspergillus fumigatus* (Barker et al. 2012). Several studies have also used the β -actin gene as an internal control gene for studies of gene expression in *Neurospora crassa* (Mohsenzadeh et al. 1998), *Phytophthora infestans* (Armstrong et al. 2005), *Candida albicans* (Nailis et al. 2006), *Penicillium glabrum* (Nevarez et al. 2008), *Hypocrea jecorina* (Pucher et al. 2011), *Humicola grisea* (Mello-de-Sousa et al. 2011), and *Penicillium decumbens* (Zhang et al. 2012). The study carried out by Teste et al. (2009) does not recommend the use of gene ACT1 as a normalization gene for expression studies in yeast.

Gene expression studies require a correct normalization to highlight the reliability of the results. This work constitutes the first study aimed at the validation of genes as internal controls for the quantification of transcripts in *P. echinulatum* in different culture conditions. From the results obtained here, we conclude that the β -actin gene (*actb*) has the most stable expression. Therefore, we recommend this gene for use as an endogenous control for the quantification of relative gene expression of endoglucanases, cellobiohydrolase, β -glucosidases, xylanases, and swollenin by qRT-PCR in *P. echinulatum*. Our experiments here validate this housekeeping gene for use as a normalization gene, as has been shown for other fungal species.

Acknowledgments Financial support for these studies came from CNPq and UCS. The authors are grateful for the financial support of

CNPq, D. Z., L. C. N., and V. B. are also grateful to CNPq for granting them scholarships to accomplish these studies.

References

- Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JIB, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Böhme U, Brooks K, Cherevach I, Hamlin N, White B, Fraser A, Lord A, Quail MA, Churcher C, Hall N, Berriman M, Huang S, Kamoun S, Beynon JL, Birch PRJ (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *PNAS* 102:7766–7771
- Barker B, Kroll K, Vödisch M, Mazurie A, Kniemeyer O, Cramer RA (2012) Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. *BMC Genome* 13:62. doi:10.1186/1471-2164-13-62
- Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA (1994) Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem* 216:223–226
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23–39
- Camassola M, Bittencourt LR, Sehnem NT, Andreas J, Dillon AJP (2004) Characterization of the cellulose complex of *Penicillium echinulatum*. *Biocatal Biotransform* 22:391–396
- Choi JK, Holtzer S, Chacko SA, Lin ZX, Hoffman RK, Holtzer H (1991) Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. *Mol Cell Biol* 11:4473–4482
- Cruz F, Kalaoun S, Nobile P, Colombo C, Almeida J, Barros LMG, Romano E, Grossi-de-As MF, Vaslin M, Alves-Ferreira M (2009) Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Mol Breed* 23:607–616
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139:5–17
- Dillon AJP, Paesi-Toresan S, Barp LB (1992) Isolation of cellulase producing mutants from *Penicillium* sp. strains denominated 3MUV3424. *Rev Bras Genet* 15:491–498
- Dillon AJP, Zörgi C, Camassola M, Henriques JAP (2005) Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -Glucosidase activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:740–746
- Dillon AJP, Bettio M, Pozzan FG, Andrighetti T, Camassola M (2011) A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *J Appl Microbiol* 111:48–53
- Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30:503–512
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279–284
- Martins LF, Kolling D, Camassola M, Dillon AJP, Ramos LP (2008) Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour Technol* 99:1417–1424
- Matos RWM (2012) O sistema celulolítico de *Penicillium echinulatum*: análise da ultraestrutura miceliana e influência de moduladores epigenéticos. Dissertation. Department of Molecular Pathology, Faculty of Medicine, University of Brasilia. Brasilia
- Mello-de-Sousa TM, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ (2011) Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *Enzyme Microb Tech* 48:19–26
- Mohsenzadeh S, Saupe-Thies W, Steier G, Schroeder T, Fracella F, Ruoff P, Rensing L (1998) Temperature adaptation of house keeping and heat shock gene expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 25:31–43
- Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ (2006) Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 7:25. doi:10.1186/1471-2199-7-25
- Nevarez L, Vasseur V, Le Dréan G, Tanguy A, Guisile-Marsollier I, Houllgate R, Barbier G (2008) Isolation and analysis of differentially expressed genes in *Penicillium glabrum* subjected to thermal stress. *Microbiol* 154:3752–3765
- Paolacci AR, Tanzarella OR, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biol* 10:11. doi:10.1186/1471-2199-10-11
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002–2007
- Pfaffl MW, Hageleit M (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 23:275–282
- Pucher ME, Steiger MG, Mach RL, Mach-Aigner AR (2011) A modified expression of the major hydrolase activator in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) changes enzymatic catalysis of biopolymer degradation. *Catal Today* 167:122–128
- Teste MA, Duquenne M, François JM, Parrou JL (2009) Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol* 10:99. doi:10.1186/1471-2199-10-99
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):research0034
- Zhang Y, Zhang J, Xiao P, Wang T, Qu Y (2012) Improved cellulase production via disruption of PDE01641 in cellulolytic fungus *Penicillium decumbens*. *Bioresour Technol* 123:733–737