



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUIMICA**

Patricia dos Santos Costa

**AUMENTO DAS ATIVIDADES DAS GLICOHIDROLASES PRODUZIDAS
POR *TRICHODERMA HARZIANUM* POR OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE
CULTURA E MELHORAMENTO GENÉTICO CLÁSSICO VISANDO A
VIABILIDADE DO ETANOL 2G**

Campinas – 2017

Patricia dos Santos Costa

**AUMENTO DAS ATIVIDADES DAS GLICOHIDROLASES PRODUZIDAS
POR *TRICHODERMA HARZIANUM* POR OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE
CULTURA E MELHORAMENTO GENÉTICO CLÁSSICO VISANDO A
VIABILIDADE DO ETANOL 2G**

*Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química,
da Universidade Estadual de Campinas,
como requisito para obtenção do
título de Doutora em Engenharia Química*

Orientadora: Dr. Aline Carvalho da Costa

Co-Orientador: Dr. José Geraldo da Cruz Pradella

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA PATRICIA DOS SANTOS COSTA, E ORIENTADA PELA
PROF(A) DR.(A) ALINE CARVALHO DA COSTA

Campinas – 2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/21821-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

C823a Costa, Patrícia dos Santos, 1988-
Aumento das atividades das glicohidrolases produzidas por *Trichoderma Harzianum* por otimização de meio de cultura e melhoramento genético classico visando a viabilidade do etanol 2G / Patrícia dos Santos Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bagaço de cana. 2. Cana-de-açúcar. 3. Biocombustíveis. 4. Fungos filamentosos. 5. Melhoramento genético. I. Costa, Aline Carvalho, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Increasing activity of glucohydrolases produced by *Trichoderma harzianum* by culture medium optimization and classic genetic improvement aiming the viability of ethanol 2G

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane bagasse

Sugarcane

Biofuels

Filamentous fungi

Genetic improvement

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

Priscila da Silva Delabona

Elaine Crespim

Daniele Farias

Camila Alves de Rezende

Data de defesa: 30-06-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de doutorado em Engenharia Química defendida por Patricia dos Santos Costa e aprovada pela banca examinadora constituída pelas Doutoradas:

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

FEQ/Unicamp

Profa. Dra. Priscila da Silva Delabona

CNPEM/CTBE/Campinas

Profa. Dra. Elaine Crespim

Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA/USP/Piracicaba

Profa. Dra. Daniele Farias

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/Campinas

Profa. Dra. Camila Alves de Rezende

IQ/Unicamp

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela vida e por ter guiado os meus passos pelo caminho do bem.

Aos meus pais, Irene e José, pelos cuidados e ensinamentos ao longo da minha vida.

Aos meus avós pelo carinho e base essenciais na minha vida.

Aos meus irmãos, pelo apoio e pelos momentos de lazer.

Aos orientadores, José Pradella e Aline Costa, pela compreensão, oportunidade, ensinamentos, apoio e amizade.

Ao CTBE pela oportunidade, suporte e fomento à pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por toda a carga de conhecimento indispensáveis para a realização desta pesquisa.

Ao sempre orientador Luciano Gomes Fietto pela confiança, ensinamentos e amizade.

À toda banca que passou pelos momentos de aperfeiçoamento e demonstração do trabalho sendo eles, Priscila, Sônia, Francisco, Sarita, Sônia, Roberto, Daniele, Elaine, Camila, obrigada pela disposição de tempo e por toda ajuda na lapidação desta pesquisa.

Aos amigos de trabalho, Diogo, Carolina, Daniel, Isabelle, Mateus, Deise, Sidnei, Bianca, Priscila, Zaira, Lucas, Daniele e Fernanda, pelos ensinamentos, companheirismo e participação essencial na realização deste trabalho.

À amiga e professora de inglês Raíris, pela paciência, sabedoria e carinho.

Às amigas da Republica do Baralho pelo acolhimento, companheirismo, amizade, lazer e compreensão, fundamentais para uma permanência excelente em Campinas.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Uma das etapas críticas no processo de produção de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana-de-açúcar é a produção das enzimas de forma eficiente e com baixo custo. Neste contexto, o objetivo desta tese foi estudar formas de aumentar a atividade das glicohidrolases produzidas por *Trichoderma harzianum* P49P11 pela otimização do meio de cultura e pelo melhoramento genético clássico, bem como desenvolver as metodologias necessárias para atingir este objetivo. Desenvolveu-se uma metodologia para otimizar meios de cultura em pequena escala, utilizando frascos agitados, sendo o pH controlado pelo tampão biftalato de potássio. Esta metodologia permitiu vários estudos que ajudaram a compreender melhor o sistema fisiológico de indução das enzimas pelos diferentes meios de cultura estudados. Também foi desenvolvida uma metodologia para medida da atividade das glicohidrolases utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato de uma hidrólise realizada em mini escala a 50 °C, sendo a liberação de açúcares redutores em 2 h de reação uma estimativa da atividade das enzimas. Para obter os mutantes utilizados ao longo do trabalho, foram realizadas cinco mutações cumulativas utilizando o reagente químico EMS. No final do processo de melhoramento genético, selecionou-se a cepa 5PCE15, que apresentou características vantajosas para o processo, tais como não produzir espuma no seu ambiente de cultivo e apresentar uma maior produção de glicohidrolases em um meio contendo 2 % de glicose.

Palavras Chave: Glicohidrolases; Bagaço de Cana-de-açúcar; Biocombustíveis; Fungos Filamentosos; Melhoramento Genético Clássico.

ABSTRACT

One of the critical steps in the production of second generation ethanol from sugarcane bagasse is the production of enzymes efficiently and inexpensively. In this context, the objective of this project was to study ways to increase the activity of the glycohydrolases produced by *Trichoderma harzianu* P49P11 by optimization of the culture medium and by classical genetic improvement, , as well as to develop the necessary methodologies to reach this objective. A methodology was developed to optimize small-scale culture media using stirred flasks with pH controlled by potassium biftalate buffer. This methodology allowed several studies that helped to better understand the system of induction of the enzymes by the different culture media studied. It was also developed a methodology to measure the activity of glycohydrolases using sugar cane bagasse as substrate of a hydrolysis carried out in mini scale at 50 °C, and the release of reducing sugars in 2 h of reaction was used as an estimate of the activity of the enzymes. In order to obtain the mutants used throughout the work, five cumulative mutations were performed using the EMS chemical reagent. At the end of the genetic improvement process, strain 5PCE15 was selected, which presented advantageous characteristics for the process, such as not producing foam in its culture environment and presenting a higher production of glycohydrolases in a medium containing 2 % glucose.

Keywords: Glycohydrolases; Sugarcane bagasse; Biofuels; Filamentous fungi; Classic Genetic Improvement.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1: Faixa de concentração dos componentes estudados nos diferentes ensaios, para os dois fungos em estudo.....47

Tabela 3.2: Análise para os diferentes designs dos experimentos testados. Influência que cada faixa de concentração, dos diferentes componentes de meio exerce para a variação do pH para o cultivo do *P. echinulatum* S1M29. DFF e DCCR1 pH inicial foi de 5,9; DCCR2 pH inicial foi de 4,9. Cinzento claro: componente que tem o efeito de aumentar o pH do meio de cultura, em cultivo submerso; cinzento escuro: componente que tem o efeito de baixar o pH do meio de cultura, em cultivo submerso (valor de $p < 0,05$ representa efeito significativo no nível de confiança de 95,0 %) 53

Tabela 3.3: Análise para os diferentes designs dos experimentos testados. Influência que cada faixa de concentração, dos diferentes componentes de meio, exerce para a variação do pH do cultivo do *T. harzianum* P1P49. O pH inicial foi de 5,0. Cinzento claro: componente que tem o efeito de aumentar o pH do meio de cultura, em cultivo submerso; cinzento escuro: componente que tem o efeito de baixar o pH do meio de cultura, em cultivo submerso (valor de $p < 0,05$ representa efeito significativo ao nível de confiança de 95 %).....57

Tabela 3.4: Análise da influência de cada componente de meio de cultura na atividade de FPase em 96 horas de cultivo de *T. harzianum* P41P11 em cultivo submerso. O pH inicial foi de 5,0. Cinza claro: componente que exerce uma influência significativa e positiva a 95 % de confiança, na atividade de FPase (p -valor $< 0,05$ representa efeito significativo no nível de confiança de 95,0 %).....61

ANEXO A

Tabela 3.1.A: Efeitos e coeficientes do modelo a 95 % de confiança **antes** “*backward elimination*” para 96 horas de cultivo de *T. harzianum* selvagem para a atividade de FPase para o DCCR2. Em vermelho estão os fatores significativos utilizando limite de confiança de 95 %.....64

Tabela 3.2.A: Efeitos e coeficientes do modelo a 95 % de confiança **após** “*backward elimination*” para 72 horas de cultivo de *T. harzianum* selvagem para a atividade de FPase para o DCCR utilizando farelo de trigo. Em vermelho estão os fatores significativos utilizando um limite de confiança de 95 %.....66

Tabela 3.3.A: Composição codificada e decodificada, otimizada com o auxílio da subrotina SOLVER do Excel, da Equação 5. DCCR utilizando farelo de trigo.....68

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1: Composição dos meios de cultura utilizados em todos os tópicos deste trabalho.....88

Tabela 5.2: Correlações entre a atividade de FPase e BCase utilizando diferentes substratos.....97

Tabela 5.3: Atividades comumente utilizadas pela literatura comparada com a atividade de BCase em BED, para seleção de diferentes cepas com pequenas diferenças nas atividades das glicohidrolases. Comparação da análise dos resultados da atividade de BCase quantificada em CLAE e pelo método de Miller (1959). Médias iguais na mesma coluna possuem a mesma letra de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança.....99

CAPÍTULO 6

Tabela 6.1: Composição dos meios de cultura no DCCR visando o desenvolvimento de um meio de cultura otimizado para aumentar a atividade das glicohidrolases responsáveis por hidrolisar o BED para *T. harzianum*. O DCCR1 foi realizado utilizando o farelo de soja e o DCCR2 utilizando o farelo de trigo. Todos os dois planejamentos foram realizados de forma idêntica, variando apenas os componentes farelo de soja e de trigo para os dois planejamentos.....113

Tabela 6.2: Resumo dos resultados do ensaio de otimização do meio de cultura para as atividades de FPase, β -glicosidase e xilanase. Estão apresentados os modelos que obtiveram os melhores R²-ajustados para cada atividade testada em 48, 72 e 96 horas de cultivo submerso, a atividade prevista pelo modelo, a atividade da validação do modelo, as composições otimizadas calculadas. 1: Sacarose; 2: Celulose; 3: **Farelo de Soja**. Valores reais em g/L.....114

Tabela 6.3: Resumo dos resultados do ensaio de otimização do meio de cultura para as atividades de FPase, β -glicosidase e xilanase. Estão apresentados os modelos que obtiveram os melhores R-ajustados para cada atividade testada em 72 e 96 horas de cultivo submerso, a atividade prevista pelo modelo, a atividade da validação do modelo, as composições otimizadas calculadas. 1: Sacarose; 2: Celulose; 3: **Farelo de Trigo**. Valores reais em g/L.....117

CAPÍTULO 7

Tabela 7.1: Resultado do cultivo submerso em 48 e 72 horas em *Erlenmeyer* de 50 mL e 500 mL para os meios 1 e 2 e dois diferentes métodos de inoculação, inóculo e esporos. O quadro apresenta a atividade em FPU/mL o desvio padrão e a média. Condição 1 e 2 (Meio 1 e Meio 2 utilizando inóculo); Condição 3 e 4 (Meio 1 e Meio 2 utilizando inóculo diretamente por esporos).....138

Tabela 7.2: Atividade de FPase (FPU/mL) em diferentes tempos de amostragem para o cultivo das cepas mutadas por EMS e da cepa selvagem, dos extratos vindo dos mini cultivos, com uma maior quantidade de esporos no inóculo e utilizando o dobro de celulose no meio de cultura. **Verde:** Selvagem; **Azul:** Primeira geração de mutantes; **Roxo:** Segunda geração de mutantes; **Rosa:** Terceira geração de mutantes.....141

Tabela 7.3: Esquematização da linha de pensamento para melhor entendimento do desenvolvimento do método otimizado de seleção em cultivo submerso para fungos celulolíticos, que possuem diferenças nas repressões das celulases por glicose. Caracteres em: **Vermelho:** Etapa ajustada no próximo item; **Verde:** Modificações que melhoraram a eficiência e a sensibilidade da metodologia; **Preto:** Resultados não auxiliaram para o desenvolvimento do próximo item.....151

CAPÍTULO 8

Tabela 8.1: Composição dos meios de culturas ditadas pelo DCCR para *T. harzianum* selvagem e mutante.....165

Tabela 8.2: Atividade de BCase dos melhores mutantes selecionados das cinco rodadas de mutação e pela cepa selvagem. Letras iguais dentro de cada coluna de tempo de produção relaciona produção iguais e letras diferentes relaciona produções diferentes, de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança.....174

Tabela 8.3: Atividade de BCase dos melhores mutantes selecionados das cinco rodadas de mutação e pela cepa selvagem P49P11. Letras iguais dentro de cada coluna de tempo de produção relaciona produção iguais e letras diferentes relaciona produções diferentes, de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança.....175

Tabela 8.4: Atividade de BCase em BEX e BHD para os extratos enzimáticos advindo do cultivo do selvagem e do mutante nos diferentes meios de culturas no tempo de 24 e 48 horas de cultivo submerso. Meios definidos na Tabela 1.....177

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1: Mecanismo de ação das celulases para hidrólise da celulose cristalina: **Verde:** endoglucanase; **Azul:** celobiohidrolase; **Vermelho:** β -glicosidase; **Amarelo:** glicose (MCKENDRY *et al.*, 2002).....34

CAPÍTULO 3

Figura 3.1: Variação do pH com o tempo de cultivo (**A** e **B**) e da atividade de FPase (**C** e **D**) para *Penicillium echinulatum* S01M29 em cultivo submerso em diferentes fontes de carbono indutor. Valores médios das triplicatas com seu respectivo desvio padrão: **A)** sem controle de pH; **B)** com pH controlado por biftalato de potássio 0,1 M; **C)** FPase sem controle de pH; **D)** FPase com pH controlado com tampão biftalato de potássio 0,1 M em pH inicial 5,9.....50

Figura 3.2: Evolução do pH (**A**) e da atividade de FPase (**B**) para *Trichoderma harzianum* P49P11 S01M29. Valores médios das triplicatas com seu respectivo desvio-padrão: **A)** pH controlado por tampão biftalato de potássio 0,1 M (barras negras) e sem controle de pH (barra cinza); **B)** FPase em pH controlado 5,0 por tampão biftalato de potássio 0,1 M (barra preta) e FPase em pH descontrolada (barra cinza) sem a presença do tampão.....51

Figura 3.3: Δ pH para as diferentes composições de meio de cultura para *Penicillium echinulatum* S01M29 em cultivo submerso por 144 horas. **A)** Cultivo utilizando a composição ditada pelo DCCR1 usando o tampão biftalato de potássio 0,1 M em pH inicial 5,9; **B)** Cultivo utilizando a composição ditada pelo DCCR2 usando o tampão biftalato de potássio 0,1 M em pH inicial 4,9; **C)** Cultivo utilizando a composição ditada pelo DFF usando o tampão biftalato de potássio 0,1 M em pH inicial 5,9..... 54

Figura 3.4: Δ pH para as diferentes composições de meio de cultura para *Trichoderma harzianum* P49P11 em cultivo submerso utilizando tampão biftalato de potássio 0,1 M pH 5,0 em diferentes tempos de cultivo. 48 horas (X), 72 horas (■) e 96 horas (□): **A)** DCCR1; **B)** DCCR2; **C)** DFF.....58

ANEXO A

Figura 3.1: Gráfico de Pareto do DCCR 2 em 96 horas de cultivo para *T. harzianum* selvagem utilizando um limite de confiança de 95 % para a atividade de FPase em 96 horas de cultivo submerso; x_1 : sacarose; x_2 : celulose; x_3 : farelo de trigo.....64

CAPÍTULO 4

Figura 4.1: Ilustração do experimento da medida da velocidade de formação do halo de degradação da celulose e ilustração das zonas de degradação de celulose seguido da medição do halo e confecção da curva.....73

Figura 4.2: Medida do diâmetro do halo em centímetros em meio ágar-celulose para as diferentes cepas. **A)** Três dias de incubação a 29 °C. **B)** Quatro dias de incubação a 29 °C. **C)** Cinco dias de incubação a 29 °C. **D)** Seis dias de incubação a 29 °C.....77

Figura 4.3: Medida do diâmetro do halo em centímetros em meio ágar-celulose para as diferentes cepas. **A)** Quatro dias de incubação a 29 °C. **B)** Cinco dias de incubação a 29 °C. **C)** Seis dias de incubação a 29 °C. **D)** Sete dias de incubação a 29 °C. **E)** Dez dias de incubação a 29 °C. **F)** Onze dias de incubação a 29 °C.....81

Figura 4.4: **A)** selvagem; **B)** 1PCE10; **C)** 2PCE43; **D)** 3PCE6. **1)** Crescimento das cepas em PDA, nesta foto fica claro a alta produção de esporos do fungo selvagem comparada com suas variáveis mutantes. **2)** Halo em ágar-celulose tempo de 5 dias utilizando 2 mL de uma solução de glicose de concentração 8 %. **3)** Halo em ágar-celulose tempo de 6 dias utilizando 2 mL de uma solução de glicose de concentração 8 %. **4)** Halo em ágar-

celulose tempo de 11 dias utilizando 2 mL de uma solução de glicose de concentração 8 %.....84

CAPÍTULO 5

Figura 5.1: Verificação do tempo ideal para a atividade de BCCase, utilizando o extrato produzido pela cepa P49P11. **A)** Quantificação em g/L de glicose, celobiose e xilose em CLAE, e o somatório destes três açúcares. **B)** Quantificação em g/L dos açúcares redutores pelo método de Miller (1959). **C)** Correlação da soma dos açúcares totais quantificados por CLAE com os açúcares redutores totais quantificados por DNS pelo método de Miller (1959)93

Figura 5.2: Resultado da atividade de BCCase utilizando o BED como substrato, em g/L de açúcares redutores liberados em duas horas de hidrólise (BCCase). Extratos advindo do cultivo submerso do fungo selvagem, em diferentes meios de culturas (1, 2, 3, 4, 5). Verificação da reprodutibilidade do método em escala cem vezes superior à escala do método proposto.....101

CAPÍTULO 6

Figura 6.1: Valores de BCCase dos sobrenadantes dos meios otimizados com farelo de soja, em diferentes tempos de cultivo. Numerações de 1-9, meios apresentados na Tabela 2 para o planejamento utilizando farelo de soja. Numeração 10, meio otimizado por Delabona *et. al.*, (2012). **A)** Cultivo em pH 5. **B)** Cultivo em pH 4,2.....119

Figura 6.2: Valores de BCCase dos sobrenadantes dos meios otimizados com farelo de soja, em diferentes tempos de cultivo, em pH 5. Numerações de 1-5, meios apresentados na Tabela 3 para o planejamento utilizando farelo de trigo. Numeração 6, meio otimizado por Delabona *et. al.*, (2012)120

Figura 6.3: Evolução da hidrólise do BED dos extratos dos melhores meios otimizados, com farelo de trigo (2 FT; 4FT; 5FT; Tabela 3) e com farelo de soja (2 FS; 9 FS; Tabela 2), em 120 horas de cultivo em pH 5. Hidrólise em diferentes tempos, em uma escala 100 vezes maior que a atividade BCase.....122

Figura 6.4: Atividade de BCase do sobrenadante dos diferentes meios de cultura em diferentes tempos de cultivo para o fungo em estudo.....124

Figura 6.5: Atividades quantificadas em diferentes tempos de cultivo para o cultivo do fungo *T. harzianum* estudo em Biorreatores submersos, para os diferentes meios de cultura (4FT, Delaboba *et. al.*, 2012 e 2013). Substratos: BCase (A), PNPg (B), xilana (C), papel de filtro (D) e da produção de proteína totais (E).....125

CAPÍTULO 7

Figura 7.1: Comparação dos resultados, em 96 horas de cultivo, pela quantificação de FPase e BCase para a seleção de mutantes hipercelulolíticos dos extratos vindo dos mini cultivos submersos, introduzindo a etapa de inóculo.....143

Figura 7.2: Quantificação dos açúcares redutores por DNS. Resultado da medida de BCase utilizando o extrato do mini cultivo em diferentes tempos de cultivo e em diferentes concentrações de glicose: A) 0 %; B) 1 %; C) 2 %; D) 3 %; E) 4 %.....144

Figura 7.3: Medidas de BCase dos extratos enzimáticos dos cultivos das diferentes cepas em diferentes tempos e concentrações de glicose: A) 0 %; B) 0,5 %; C) 1 %; D) 2 %; E) 4 %.....148

CAPÍTULO 8

Figura 8.1: Esquema da pré-seleção em placas de ágar-celulose pelo tamanho do diâmetro do halo de hidrólise. 1) Crescimento dos esporos em ágar-celulose. 2) Diluição dos esporos na concentração de 1000 esporos por mL e adição de EMS, na concentração e tempo adequado, anteriormente estudada. 3) Seleção das colônias que formaram maiores diâmetros de halos de hidrólise em ágar-celulose. 4) As cepas pré-selecionadas são encaminhadas para a seleção em cultivo submerso otimizado desenvolvido por esse trabalho.....162

Figura 8.2: Curva de sobrevivência de mutantes EMS para o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11 (selvagem). **A)** Primeira curva **B)** Segunda curva.....168

Figura 8.3: Curva de sobrevivência para cepa parental 1PCE10 advinda da mutação por EMS da cepa selvagem *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11.....170

Figura 8.4: Curva de sobrevivência para a cepa parental 2PCE43 advinda da mutação por EMS da cepa 1PCE10.....170

Figura 8.5: Curva de sobrevivência para cepa parental 3PCE6 advinda da mutação por EMS da cepa 2PCE43.....172

Figura 8.6: Curva de sobrevivência para cepa parental 4PCE10 advinda da mutação por EMS da cepa 3PCE6.....173

Figura 8.7: Comparação da fisiologia de expressão das glicohidrolases responsáveis por hidrolizar BHD e BEX em função dos componentes presentes no meio de cultura para o selvagem e para o mutante, em 48 horas de cultivo submerso.....179

Figura 8.8: Atividade do mutante e selvagem em BEX (BCse) em diferentes tempos de cultivo submerso em Biorreator com controle automático de temperatura, agitação, oxigênio dissolvido e pH.....180

Figura 8.9: Comparação do crescimento em meio sólido para o selvagem (P49P11) e mutante (5PCE15). **A)** Meio ágar-celulose utilizando 2 % de celulose e 2 % de glicose em 14 dias de crescimento. **B)** Meio ágar-celulose utilizando 1 % de celulose e 0,5 % de glicose em 5 dias de crescimento. **C)** Meio ágar-celulose utilizando 1 % de celulose e 0,5 % de glicose em 14 dias de crescimento..... 181

Figura 8.10: Comparação da produção de espumas em cultivo submerso em biorreator utilizando 1 L de meio de cultivo para o selvagem (P49P11) (**A**) e mutante (5PCE15) (**B**).....182

Figura 8.11: Micrografias com aumento de 400 x dos cultivos submersos em Biorreatores de bancada. **A)** Mutante 5PCE15; **B)** Selvagem.....183

LISTA DE ABREVIACOES

BED: Bagaço Explodido por exploso a vapor seguido de deslignificao por NaOH.

CEL: Celulose comercial cellufloc.

BEX: Bagaço pr-tratado Explodido por exploso a vapor.

BHD: Bagaço por tratamento hidrotmico seguido de deslignificao por NaOH.

BH: Bagaço pr-tratado por tratamento hidrotmico.

DCCR: Delineamento composto central rotacional.

DFF: Delineamento Fatorial Fracionado.

CEL: Celulose comercial *Celufloc 200*.

FT: Farelo de Trigo.

FS: Farelo de Soja.

SAC: Sacarose.

SS: Soluo de sais (soluo salina empregada (Mandels e Reese, 957), 20 x concentrada, previamente preparada e estocada em geladeira possuía a seguinte composio em g/L: KH_2PO_4 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14; uria 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3; CaCl_2 3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,014; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,016; CoCl_2 0,02).

YE: Extrato de Levedura.

EMS: Etil Metil Sulfonato.

BCase: Atividade das glicohidrolses liberadas pelos fungos estudados em duas horas de reao a 50 °C no bagaço de cana-de-aucar pr-tratado.

FPase: Atividade das glicohidrolses em papel de filtro.

ART: Aucares redutores totais.

UV: Luz ultra violeta.

Sumário

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO..... | 24 |
| CAPÍTULO 1 | 28 |
| 1. OBJETIVOS..... | 28 |
| 1.1. Objetivos específicos..... | 28 |
| CAPÍTULO 2 | 30 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 30 |
| 2.1. Contexto energético..... | 30 |
| 2.2. Biomassa Lignocelulósica..... | 31 |
| 2.3. Bioconversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol | 34 |
| 2.4. Enzimas glicohidrolases e hidrólise de materiais lignocelulósicos..... | 35 |
| 2.5. Otimização do processo de produção de celulases..... | 38 |
| 2.6. Obtenção de mutantes hiperprodutores de glicohidrolases | 41 |
| 2.7.2. Mecanismo de mutação por EMS em fungos filamentosos | 43 |
| 2.7.3. Seleção dos mutantes obtidos..... | 43 |
| CAPÍTULO 3 | 45 |
| 3. TAMPÃO BIFTALATO DE POTÁSSIO PARA CONTROLE DO PH PARA OTIMIZAR A PRODUÇÃO DE GLICOHIDROLASES EM FRASCOS AGITADOS PARA FUNGOS FILAMENTOSOS..... | 45 |
| 3.1. Introdução..... | 46 |
| 3.2. Metodologia..... | 47 |
| 3.2.1. Microrganismo..... | 47 |
| 3.2.2. Cultivo submerso..... | 48 |
| 3.2.3. Efeito do tampão sobre o pH e a atividade enzimática em diferentes fontes de carbono indutor..... | 48 |
| 3.2.4. Influência dos componentes de meio estudados em conjunto para a variação do pH do cultivo submerso..... | 49 |
| 3.2.5. Atividade Enzimática | 51 |
| 3.3. Resultados..... | 52 |
| 3.3.1 Efeito do tampão sobre a atividade de FPase para diferentes fontes de carbono indutor..... | 56 |
| 3.3.2. Influência de diferentes componentes de meio de cultivo na variação do pH durante o estudo de otimização do meio em frascos agitados..... | 55 |
| 3.3.3. Otimização do meio de cultura para <i>T. harzianum</i> P49P11 utilizando o tampão biftalato de potássio para controle de pH em frascos agitados..... | 62 |
| 3.4. Conclusões..... | 65 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 4 | 72 |
| 4. OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM MEIO ÁGAR-CELULOSE PARA SELEÇÃO DE MUTANTES <i>T. HARZIANUM</i> PRODUTORES DE GLICOHIDROLASES DESREPRIMIDOS PARA O GENE DAS CELULASES..... | 72 |
| 4.1. Introdução..... | 73 |
| 4.2. Metodologia..... | 75 |
| 4.2.1. Microrganismos..... | 75 |
| 4.2.2. Meio ágar-celulose e metodologia de velocidade de formação de halos de hidrólise em celulose..... | 75 |
| 4.2.3. Comparação de diferentes concentrações de glicose e 2-deoxi-D-glicose..... | 77 |
| 4.2.4. Verificação do aumento da concentração de glicose sem e com a adição de uma quantidade mínima de 2-deoxi-D-glicose..... | 78 |
| 4.3. Resultados..... | 78 |
| 4.3.1. Comparação de diferentes concentrações de glicose e 2-deoxi-D-glicose..... | 78 |
| 4.3.2. Verificação do aumento da concentração de glicose no meio sólido de cultura e adição de uma quantidade mínima de 2-deoxi-D-glicose..... | 83 |
| 4.4. Conclusão..... | 88 |
| CAPÍTULO 5 | 89 |
| 5. NOVO MÉTODO PARA ESTIMAR A PRODUÇÃO DE GLICOHIDROLASES RESPONSÁVEIS POR HIDRÓLISAR O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO..... | 89 |
| 5.1. Introdução..... | 90 |
| 5.2. Metodologia..... | 91 |
| 5.2.1. Microrganismos..... | 91 |
| 5.2.2. Cultivo Submerso..... | 92 |
| 5.2.3. Estudo do tempo de reação ideal..... | 92 |
| 5.2.4. Uso do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos como substratos..... | 93 |
| 5.2.5. Aplicação da medida de BCase como método para selecionar diferentes cepas..... | 93 |
| 5.2.6. Verificação da reprodutibilidade do método em uma escala cem vezes maior..... | 94 |
| 5.2.7. Determinação das atividades enzimáticas..... | 95 |
| 5.3. Resultados..... | 96 |
| 5.3.1. Determinação do tempo de reação ideal..... | 96 |

| | |
|---|-----|
| 5.3.2. Correlação entre FPase e BCase medido para bagaços de cana-de-açúcar submetidos a diferentes pré-tratamentos..... | 99 |
| 5.3.3. Aplicação do método de BCase para selecionar diferentes cepas..... | 101 |
| 5.3.4. Verificação da reprodutibilidade do método em uma escala cem vezes superior | 103 |
| 5.4. Conclusão..... | 104 |
| CAPÍTULO 6 | 106 |
| 6. OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA O FUNGO <i>T. HARZIANUM</i> PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE GLICOHIDROLASES RESPONSÁVEIS POR HIDROLISAR MATERIAL LIGNOCELULÓSICO | 106 |
| 6.1. Introdução..... | 107 |
| 6. 2. Metodologia..... | 109 |
| 6.2.1. Microrganismos | 109 |
| 6.2.2. Cultivo submerso | 109 |
| 6.2.3. Otimização do meio de cultura..... | 110 |
| 6.2.4. Validação dos modelos gerados em experimentos de cultivo submerso.. | 112 |
| 6.2.5. Hidrólise do BED (Bagaço pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado com NaOH) pelos melhores extratos pré-selecionados..... | 113 |
| 6.2.6. Substituição da fonte de celulose comercial do melhor meio selecionado por bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado | 113 |
| 6.2.7. Cultivo em Biorreator..... | 115 |
| 6.2.8. Determinação das atividades enzimáticas | 115 |
| 6.3. Resultados..... | 116 |
| 6.3.1. Otimização do meio de cultura..... | 116 |
| 6.3.2. Hidrólise dos melhores meios em uma escala cem vezes maior | 125 |
| 6.3.3. Substituição do ingrediente celulose pura do meio de cultura por bagaço de cana de açúcar pré-tratado | 126 |
| 6.3.4. Cultivo em biorreator para definir o melhor meio de cultura..... | 128 |
| 6.4. Conclusão..... | 132 |
| CAPÍTULO 7 | 133 |
| 7. MÉTODO DE SELEÇÃO EFICIENTE PARA FUNGOS FILAMENTOSOS DESREPRIMIDOS QUANTO A EXPRESSÃO DE GLICOHIDROLASES ... | 133 |
| 7.1. Introdução..... | 134 |
| 7.2. Metodologia..... | 136 |
| 7.2.1. Microrganismos..... | 136 |
| 7.2.2. Desenvolvimento do método..... | 136 |

| | |
|---|-----|
| 7.2.2.1. Cultivo utilizando frascos agitados de diferentes tamanhos, diferentes métodos de inoculação e diferentes meios de culturas | 136 |
| 7.2.2.2. Inóculo de uma maior quantidade de esporos, substituição do meio sólido de crescimento dos esporos, utilização de uma maior concentração de celulose no meio de cultivo submerso..... | 137 |
| 7.2.2.3. Re-Introdução da etapa de inóculo e avaliação da substituição da atividade de FPase por BCase..... | 138 |
| 7.2.2.4. Avaliação da concentração ideal de glicose a ser utilizada no meio de cultivo submerso | 139 |
| 7.2.3. Determinação das atividades enzimáticas | 141 |
| 7.3. Resultados..... | 141 |
| 7.3.1. Cultivo utilizando frascos agitados de diferentes tamanhos, diferentes métodos de inoculação e diferentes meios de culturas | 141 |
| 7.3.2. Inóculo de uma maior quantidade de esporos, substituição do meio sólido de crescimento dos esporos e utilização de uma maior concentração de celulose no meio de cultivo submerso..... | 143 |
| 7.3.3. Introdução da etapa de inóculo e avaliação da substituição da atividade de FPase para BCase..... | 146 |
| 7.3.4. Avaliação da concentração ideal de glicose a ser utilizada no meio de cultivo submerso | 147 |
| 7.3.5. Verificação da reprodução do experimento do item 7.3.4 em escala cinco vezes superior e em outro meio de cultura | 152 |
| 7.5. Conclusão..... | 160 |
| CAPÍTULO 8 | 162 |
| 8. MUTAÇÃO CLÁSSICA DO FUNGO TRICHODERMA HARZIANUM P49P11 POR SEM | 162 |
| 8.1. Introdução..... | 163 |
| 8.2. Metodologia..... | 164 |
| 8.2.1. Microrganismos | 164 |
| 8.2.2. Determinação das curvas de sobrevivência por EMS | 164 |
| 8.2.3. Seleção das cepas modificadas com EMS..... | 166 |
| 8.2.3.1. Pre-seleção das cepas modificadas com EMS..... | 166 |
| 8.2.3.2. Seleção em mini cultivo submerso das cepas pre-selecionadas pelo item anterior | 167 |
| 8.2.4. Comparação da fisiologia de secreção das glicohidrolases responsáveis por hidrolisar BHD e BEX em função dos componentes presentes no meio de cultura para o selvagem e para o mutante | 168 |
| 8.2.5. Caracterização fenotípica do mutante selecionado | 171 |

| | |
|--|------------|
| 8.2.6. Cultivo em Biorreator..... | 171 |
| 8.3. Resultados..... | 172 |
| 8.3.1. Curvas de mortalidade..... | 171 |
| 8.3.2. Seleção dos mutantes mais promissores das rodadas de mutações por EMS em mini cultivo submerso acrescido de 2 % de glicose..... | 177 |
| 8.3.3. Comparação da fisiologia de secreção das glicohidrolases responsáveis por hidrolisar BHD e BEX em função dos componentes presentes no meio de cultura para o selvagem e para o mutante..... | 180 |
| 8.3.4. Cultivo em Biorreator..... | 183 |
| 8.3.5. Caracterização Fenotípica..... | 184 |
| 8.4. Conclusão..... | 188 |
| 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 190 |
| 10. PUBLICAÇÕES REFERENTES AO PROJETO..... | 191 |
| 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 190 |

INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é o material renovável mais abundante do planeta, e por isso é reconhecida como a principal fonte de energia alternativa ao petróleo (PÉREZ, *et. al.*, 2002; HAHN HAGERDAL, *et. al.*, 2006; BNDES & CGEE, 2008; DASHTBAN, *et. al.*, 2009; YUSUF; KAMARUDIN; YAAKUB, 2011). A cana-de-açúcar é a candidata mais interessante para a produção de energia via produção de etanol, devido a sua alta eficiência energética, entretanto a literatura também nos apresenta muitos estudos sobre a utilização de milho, trigo, beterraba, mandioca, palha, gramado, capim, dentre outros (BNDES & CGEE, 2008; DASHTBAN, *et. al.*, 2009; YUSUF; KAMARUDIN; YAAKUB, 2011).

Cerca de 1 milhão de metros cúbicos de bioetanol adicionados a gasolina evita 1,9 milhões de toneladas de CO₂ emitidas na atmosfera (BNDES, 2008) (BNDES & CGEE, 2008; DASHTBAN, *et. al.*, 2009; YUSUF; KAMARUDIN; YAAKUB, 2011).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (386,2 milhões de toneladas), seguido da Índia (289,6 milhões de toneladas) e China (92,3 milhões de toneladas). A cana de açúcar é um vegetal que realiza o ciclo C4 e são as plantas mais aptas à produção bioenergética. (BNDES & CGEE, 2008; DASHTBAN, *et. al.*, 2009; YUSUF; KAMARUDIN; YAAKUB, 2011).

A faixa de variação da composição do bagaço de cana-de-açúcar em citada em diferentes trabalhos na literatura é de 43-55 % de celulose, 17-28 % de hemicelulose, 20-23 % de lignina, 1-3 % de cinzas e 0-7 % de extrativos (2003; COSTA, 1999; URBANO e GONÇALVES, 1996; SILVA, 1995; LABAT, 2008).

Existem várias rotas tecnológicas propostas para a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar. De particular interesse para o presente trabalho, a rota enzimática de produção do bioetanol de segunda geração compreende as seguintes etapas: o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a hidrólise enzimática, a fermentação alcoólica e a destilação para recuperação do etanol (KANG, *et. al.*, 2004; MARGEOT, *et. al.*, 2009). O processo de hidrólise pode ser realizado de forma química

ou enzimática, a rota química não é sugerida pois gera muitos subprodutos que são contaminantes para a posterior fermentação dos açúcares, por exemplo o hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural (COSTA, *et. al.*, 2014). A hidrólise enzimática possui uma grande barreira econômica a ser ultrapassada, em função do custo de produção das enzimas e da elevada carga enzimática necessária neste processo (KANG, *et. al.*, 2004; DASHTBAN, *et. al.*, 2009; CASTRO & PEREIRA, 2010). Assim, estudos visando otimizar a produção de enzimas celulolíticas são de grande importância.

O processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos promove a liberação das moléculas constituintes do polímero de celulose (celobiose e glicose) e hemiceluloses (xilose e vestígios de arabinose, manose, galactose e ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético) (CASTRO & PEREIRA, 2010; ZINOVIEV, *et. al.*, 2010).

Muitos são os fatores que alteram a produção enzimática por fungos filamentosos, dentre os principais estão a oxigenação do meio, a variação excessiva do pH, os componentes do meio de cultura, contaminação por outros microrganismos, temperatura do cultivo entre outros (DELABONA, *et. al.*, 2012; COSTA, *et. al.*, 2016 b).

A fim de minimizar os custos relacionados à produção das enzimas do complexo celulolítico, o melhoramento do processo de produção enzimática pelo fungo *Trichoderma harzianum* P49P11, isolado da Floresta Amazônica (DELABONA, *et. al.*, 2012 a), bem como o uso de outros fungos filamentosos como *Penicillium echinulatum*, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* vêm sendo estudados pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Estes fungos também são muito estudados em diversos laboratórios do Brasil e do mundo. Desta maneira, espera-se obter maior entendimento sobre o metabolismo da produção enzimática destes organismos, bem como melhorar a produção destas enzimas.

O controle do pH do meio de cultivo para a produção das glicohidrolases por fungos filamentosos é essencial para o processo. Essas enzimas possuem atividade em uma faixa estreita de pH, geralmente entre 4 e 6 (DELABONA, *et. al.*, 2012; COSTA, *et. al.*, 2016 b). A alteração do pH do meio de cultivo está relacionada com o

metabolismo do microrganismo utilizado e com os componentes do meio (STERNBERG, *et. al.*, 1979; DELABONA, *et. al.*, 2012; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). A busca de uma composição ótima do meio de cultura, que induz uma melhor atividade das glicohidrolases, é importante para a diminuição do custo do processo, pois pode elevar a eficiência de produção, utilizar menor quantidade de componentes de meio e aumentar a produtividade alcançando melhores tempos de produção. O uso de metodologias estatísticas, que permitem estudar uma grande quantidade de nutrientes em conjunto, é de grande importância para a confecção de meios que induzam uma maior quantidade destas enzimas (DELABONA, *et. al.*, 2012; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Entretanto, a realização de planejamentos estatísticos em biorreatores, com controle automático de pH, é de elevada dificuldade, pois requer uma grande quantidade desses equipamentos funcionando em um mesmo bloco de experimentos, além do preparo e manuseio destes equipamentos ser extremamente trabalhoso. O desenvolvimento de uma forma eficiente para realizar a otimização do meio de cultura em *erlenmeyer* é interessante, pois conduz a uma metodologia de fácil acesso e baixo custo.

A modificação genética de linhagens fúngicas produtoras das glicohidrolases é outra estratégia interessante para elevar os níveis de produção dessas enzimas (CHAND, *et. al.*, 2005; ADSUL, *et. al.*, 2007; CHENG, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011). A obtenção de mutantes hiperprodutores pode ser realizada por técnicas de mutação dirigida e aleatória. A realização de mutações aleatórias (clássicas) é vantajosa, pois não há a necessidade de conhecimento dos genes de interesse e a aplicação da técnica é simples e de baixo custo (ADSUL, *et. al.*, 2007).

Um dos maiores problemas relacionados ao melhoramento genético de fungos filamentosos está na etapa de seleção das cepas realmente modificadas e melhores produtoras. Métodos eficientes de seleção das cepas de interesse são cruciais para concretizar a eficiência da metodologia de melhoramento clássico. O método de seleção apropriado irá conduzir à identificação dos microrganismos realmente melhorados em alguma necessidade do processo de produção (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b; KASAN, *et. al.*, 2008; DILLON, *et. al.*, 2011; ZHANG, 2017).

O melhoramento genético clássico (EMS) e o melhoramento do meio de cultivo foram as técnicas usadas no presente trabalho para o *T. harzianum* P49P11 com o intuito

de melhorar a produtividade das glicohidrolases produzidas por esse fungo filamentoso. Além disso foram desenvolvidas metodologias que facilitaram a aplicação de tais técnicas. Este trabalho pode contribuir para auxiliar outras pessoas que pretendem utilizar as técnicas de melhoramento de meio de cultura e genético para fungos filamentosos produtores de glicohidrolases, pois contribui com novas metodologias que proporcionam o aumento da produção de enzimas e, conseqüentemente, ganhos em rendimento e produtividade das glicohidrolases.

CAPÍTULO 1

1. OBJETIVOS

Esta tese de doutorado tem como objetivo aumentar a atividade das glicohidrolases produzidas pelo fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* P49P11, utilizando como ferramentas a otimização do meio de cultura e o melhoramento genético clássico, a fim de viabilizar o processo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

1.1. Objetivos específicos

- Desenvolver um método de otimização de meio de cultura, em pequena escala, utilizando *Erlemyers* de 500 mL em estufa agitada, sendo o pH controlado pelo tampão biftalato de potássio (COSTA, *et. al.*, 2016);
- Otimizar um meio de cultura sólido que permita a seleção de mutantes desreprimidos quanto à produção de glicohidrolases, estudando diferentes concentrações de glicose e 2-deoxi-D-glicose;
- Desenvolver um método de avaliação da atividade das enzimas produzidas em bagaço de cana-de-açúcar, de forma a direcionar as metodologias de atividade para o processo real de produção do etanol de segunda geração;
- Otimizar o meio de cultura para o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* P49P11, selvagem, de forma a obter uma nova formulação de meio de cultura que possa contribuir para aumentar a expressão das celulases, responsáveis por hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar;
- Desenvolver um método otimizado de seleção em cultivo submerso que permita selecionar fungos filamentosos mutantes, produtores de celulases responsáveis por hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar, de forma eficiente e confiável;
- Estabelecer um sistema de mutação cumulativa, com o agente mutagênico EMS e selecionar os mutantes mais promissores das diferentes etapas de mutação;

- Otimizar a composição do meio de cultura para os mutantes selecionados, testando diferentes fontes de nutrientes;
- Validação do meio selecionado em cultivo em maiores escalas utilizando biorreatores de bancada com pH, agitação e temperatura controlada para o melhor mutante e cepa a selvagem;
- Caracterizar morfológicamente as cepas selecionadas;
- Realizar experimentos de hidrólise para determinar qual cepa possui maiores vantagens para produção de glicohidrolases em uma escala maior;

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contexto energético

Durante o século XX, o desenvolvimento industrial e social foi essencialmente alavancado pelo crescimento do setor petroquímico. O constante aumento das taxas de exploração e utilização das reservas dos recursos fósseis assegurou por muito tempo a disponibilidade de matéria-prima para a indústria de combustíveis para transporte e geração de energia via petróleo (HOWARTH, SANTORO & INGRAFFEA, 2010; NIGAM & SINGH, 2011; BALAT, 2011; ENTREKIN, *et. al.*, 2011; HOLZMAN, 2011; OSBORN, *et. al.*, 2011; MCKENZIE, *et. al.*, 2012; JACKSON, *et. al.*, 2013; WARNER, *et. al.*, 2013; ANNA, *et. al.*, 2014; LAUREN, 2015).

O processo de formação do petróleo acontece de forma cíclica, mas leva milhares de anos para se completar, enquanto a capacidade de exploração pela humanidade está muito acelerada e em constante crescimento. Em 1850 foi criado o processo de refinamento do petróleo. Em menos de trinta anos a produção do óleo nos Estados Unidos, por exemplo, cresceu num ritmo acelerado, cerca de dez milhões de vezes em termos de exploração de barris de petróleo por dia (YUSIF & BABAYEV, 2002). No Brasil, do ano de 2010 a 2014 a taxa de exploração aumentou em uma escala maior que 400 vezes, o número de barris de petróleo por dia. Desde quando o petróleo se tornou um produto de alto valor agregado ele dominou a economia mundial, sendo matéria prima para a maioria dos produtos produzidos pelo setor empresarial (LAUREN, 2015).

Ao contrário da energia dos combustíveis fósseis, a biomassa lignocelulósica é renovável e não contribui para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre. Isso por que o CO₂ liberado durante o uso dessa biomassa é absorvido novamente pelo processo de fotossíntese, sendo utilizado para a formação da mesma, resultando em um ciclo rápido e com balanço energético neutro (MOTA C. J. A & MONTEIRO R S,

2013). A gasolina, por outro lado, possui impurezas como o enxofre que, ao ser queimado no processo de combustão, produz o dióxido de enxofre, responsável pela acidificação da atmosfera. A utilização de biomassa vegetal para a produção de etanol não altera a estrutura natural da Terra, e não está relacionada a desastres ecológicos, como vazamento de óleo, causando prejuízos incalculáveis para o ecossistema e as gerações futuras (HALL, 1984; DASHTBAN, *et. al.*, 2009; NIGAM & SINGH, 2011; BALAT, 2011; ENTREKIN, *et. al.*, 2011; HOLZMAN, 2011; ANNA, *et. al.*, 2014; LAUREN, 2015).

O motor dos carros movido a etanol é 1,62 vezes mais limpo que o motor a base de gasolina (BNDES & CGEE, 2008; CORTEZ, *et. al.*, 2008; ROCHA & BUCKERIDGE, 2009). O bioetanol tem recebido atenção considerável nos últimos anos, no Brasil, como combustível para transporte, principalmente após a primeira crise do petróleo em 1973 que levou o país a lançar um programa nacional para substituir parte da gasolina por etanol (BASSO, *et. al.*, 2008; BNDES & CGEE, 2008; ROCHA & BUCKERIDGE, 2009; SOCCOL, *et. al.*, 2009).

Neste sentido, o etanol produzido pelo bagaço de cana-de-açúcar é uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol sem aumentar a área plantada de cana-de-açúcar e ainda contribuir para a redução das taxas de poluentes emitidos na atmosfera terrestre, caso esse combustível venha a substituir os combustíveis à base de petróleo. Se comparado com a gasolina, o etanol reduz cerca de 70 % das emissões de poluentes atmosféricos, porém, se contabilizarmos os gases do efeito estufa (metano, dióxido de enxofre e óxido nítrico) essa redução atinge quase 90 % (BNDES & CGEE, 2008; CORTEZ, *et. al.*, 2008; SINGHANIA, *et. al.*, 2010; NIGAM & SINGH, 2011). A utilização do bagaço para produção de etanol de segunda geração, aumenta a produtividade do processo normal de 89 L/TC para até 131 L/TC, aumentando cerca de 47 % a produção de etanol (DIAS, *et. al.*, 2011).

2.2. Biomassa Lignocelulósica

A biomassa é definida como toda matéria orgânica (vegetal, terrestre ou aquática) formada pelo processo de fotossíntese. Pode-se dizer que a biomassa é uma forma de armazenamento de uma pequena fração da energia solar que incide na superfície da Terra, na forma de ligações moleculares orgânicas. Esta é uma forma que a natureza utiliza para concentrar a energia solar em ligações químicas altamente rígidas (LEHNINGER, *et. al.*, 2006; CORTEZ, *et. al.*, 2008; GÍRIO, *et. al.*, 2010).

O maior constituinte da biomassa lignocelulósica é a celulose, um polímero linear composto de subunidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β (1-4) (CARVALHO, 2005; SOREK, *et. al.*, 2014). Estas cadeias poliméricas, são fortemente unidas por ligações de hidrogênio (GÍRIO, *et. al.*, 2010; SOREK, *et. al.*, 2014). Essa conformação estrutural, bem como a estreita associação com lignina e hemiceluloses a torna altamente resistente aos diferentes métodos de hidrólise (FAN, *et. al.*, 1980; LYND, *et. al.*, 2002; CORTEZ, *et. al.*, 2008).

As hemiceluloses, segundo componente principal da biomassa lignocelulósica, são heteropolímeros complexos e altamente ramificados em cuja composição estão presentes hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose, L-raminose, L-frutose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico e ácido D-galacturônico) (SÁNCHEZ, 2009). Contudo, em contraste com a celulose, as hemiceluloses são facilmente hidrolisadas em seus monossacarídeos constituintes, por não apresentarem elevada cristalinidade. Entretanto, a fermentação das pentoses necessita de microrganismos especializados no processo e ainda não apresenta rendimentos tão satisfatórios quanto a fermentação das hexoses, já bem estabelecida por leveduras capacitadas para o processo de etanol de primeira geração (BASTAWDE, *et. al.*, 1992; PÉREZ, *et. al.*, 2002; DEMAIN, *et. al.*, 2009, MARGEOT, *et. al.*, 2009; CORTEZ, *et. al.*, 2008; ZINOVIEV, *et. al.*, 2010).

Os monossacarídeos, como as hexoses e pentoses resultantes da hidrólise da celulose e das hemiceluloses presentes nessas biomassas, podem ser fermentados a etanol por leveduras adaptadas a esse sistema (BASTAWDE, 1992; MARGEOT, *et. al.*, 2009; SANTOS, *et. al.*, 2015). O alto teor de celulose e hemicelulose na biomassa representa uma alternativa sustentável, ou seja, uma fonte de energia renovável altamente disponível para aumentar a produção de bioetanol mundial. (BNDES &

CGEE, 2008; CORTEZ, *et. al.*, 2008; DEMAIN, *et. al.*, 2009; MARGEOT, *et. al.*, 2009; ZINOVIEV, *et. al.*, 2010).

Diante das grandes vantagens da utilização do etanol a partir dos materiais lignocelulósicos é necessário salientar que a tecnologia ainda não atingiu a maturidade industrial necessária para a comercialização. O custo das próprias enzimas, bem como a carga enzimática necessária para uma eficiente hidrólise, aumenta de forma significativa a dificuldade para a viabilidade global dos biocombustíveis. As estimativas encontradas na literatura ainda não estão bem definidas, sendo que os custos de produção do etanol lignocelulósico variam significativamente, desde US\$ 0,026/L até US\$ 0,107/L (CARVALHO, 2005; LYND *et. al.*, 2008; ADEN & FOUST, 2009; KAZI *et. al.*, 2010).

2.3. Bioconversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol

Muitos são os gargalos tecnológicos que deverão ser enfrentados para a utilização dos materiais lignocelulósicos para produção de bioetanol. Podemos apresentar os principais:

- Resistência da biomassa à hidrólise, devido à estrutura cristalina da celulose e sua interação com as hemiceluloses e lignina. Este problema pode ser contornado utilizando pré-tratamentos mais eficientes no bagaço de cana-de-açúcar. Após o pré-tratamento as celulasas têm melhor acesso à celulose, resultando em uma maior eficiência no processo de hidrólise. Entretanto, muitos trabalhos relatados na literatura reportam uma grande evolução na eficiência dos pré-tratamentos das biomassas, especialmente do bagaço de cana-de-açúcar. Constatam-se muitos métodos de pré-tratamentos e verifica-se que o material sem a presença da lignina resulta em uma melhor hidrólise. O custo desta etapa está basicamente contido nos equipamentos de alta resistência requeridos pelo processo (MARTÍN, *et. al.*, 2007; RABELO, *et. al.*, 2008; DEMAIN, *et. al.*, 2009; BALAT,

2009; RABELO, *et. al.*, 2009; DASHTBAN, *et. al.*, 2009; BASSO, *et. al.*, 2008; FAN, *et. al.*, 1980; FUENTES, *et. al.*, 2011)

- Variedades de açúcares liberados quando há quebra das hemiceluloses e celulose, e a necessidade de se encontrar ou modificar, geneticamente, organismos capazes de fermentar eficientemente as pentoses (MARGEOT, *et. al.*, 2009; COSTA, *et. al.*, 2014; SANTOS, *et. al.*, 2015).
- Custos de coleta e armazenamento de matérias-primas lignocelulósicas de baixa densidade. Porém, esta limitação é evitada com a utilização de bagaço de cana-de-açúcar, resíduo abundante produzido pela própria produção de etanol de primeira geração. Neste caso, seria evitado o custo do transporte, armazenamento e coleta caso as usinas de etanol de primeira ou segunda geração fossem integradas (BALAT, *et. al.*, 2009).
- Alto custo de produção dos coquetéis enzimáticos aliados às baixas velocidades e conversão da hidrólise dos materiais lignocelulósicos. O presente trabalho está concentrado neste problema (PRADELLA, *et. al.*, 2009; CASTRO & PEREIRA, 2010; DELABONA, *et. al.*, 2012 e 2013; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b).

Abaixo está apresentada uma breve explicação das etapas necessárias para a produção do bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar (MARGEOT, *et. al.*, 2009):

Pré-tratamento: O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar pode ser realizado de diferentes maneiras. Dentre os diferentes pré-tratamentos podemos citar: a explosão a vapor (BEX), a explosão a vapor seguida de deslignificação (BED), o tratamento hidrotérmico (BH), o tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação (BHD), dentre outros. Os pré-requisitos para um pré-tratamento ideal da biomassa lignocelulósica são: i) produzir fibras celulósicas reativas para o ataque enzimático; ii) evitar a destruição das hemiceluloses e celulose; iii) evitar a formação de possíveis inibidores das enzimas hidrolíticas e microrganismos fermentadores; iv) minimizar a demanda de energia; v) reduzir o custo do material de construção dos reatores para pré-tratamentos; vi) produzir menos resíduos, e vii) consumir pouco ou nenhum produto químico, de baixo custo. É relatado que a retirada da lignina no pré-tratamento eleva a eficiência da hidrólise em mais de três vezes, entretanto aumenta o custo do processo. Contudo, a lignina é um

composto químico extremamente rico que pode ser direcionado para outros processos para produção de produtos com maior valor agregado. (RABELO, *et. al.*, 2008; DEMAIN, *et. al.*, 2009; BALAT, 2009; RABELO, *et. al.*, 2009; FUENTES, *et. al.*, 2011; LAUREN, 2015; RAGAUSKAS, *et. al.*, 2014; RINALDI, *et. al.*, 2016).

Hidrólise enzimática: Nesta etapa, ocorre a despolimerização da celulose até glicose e de pequena parte das hemiceluloses que permanecem no sólido pré-tratado até pentoses (principalmente xilose), por meio de enzimas celulolíticas/hemicelulolíticas. A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é dificultada por parâmetros estruturais do bagaço de cana-de-açúcar, tais como a presença de lignina e hemiceluloses, área superficial e a estrutura cristalina da celulose. A vantagem da hidrólise enzimática é que não produz subprodutos inibitórios da fermentação alcoólica, no entanto ainda apresenta maior custo comparada à hidrólise química (BALAT, 2009; GÍRIO, *et. al.*, 2010).

Fermentação alcoólica: Nesta etapa o material hidrolisado, contendo os açúcares, é metabolizado a etanol, geralmente por leveduras. A variedade de açúcares liberados, quando há quebra das hemiceluloses e celulose, é que torna esse processo desafiador, pois há a necessidade de se encontrar ou modificar, geneticamente, organismos capazes de fermentar eficientemente o material hidrolisado. Os gêneros de leveduras mais utilizadas atualmente são *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Spathaspora*, *Pichia stipitis* dentre outras (COSTA, *et. al.*, 2014; de SOUZA, *et. al.*, 2012).

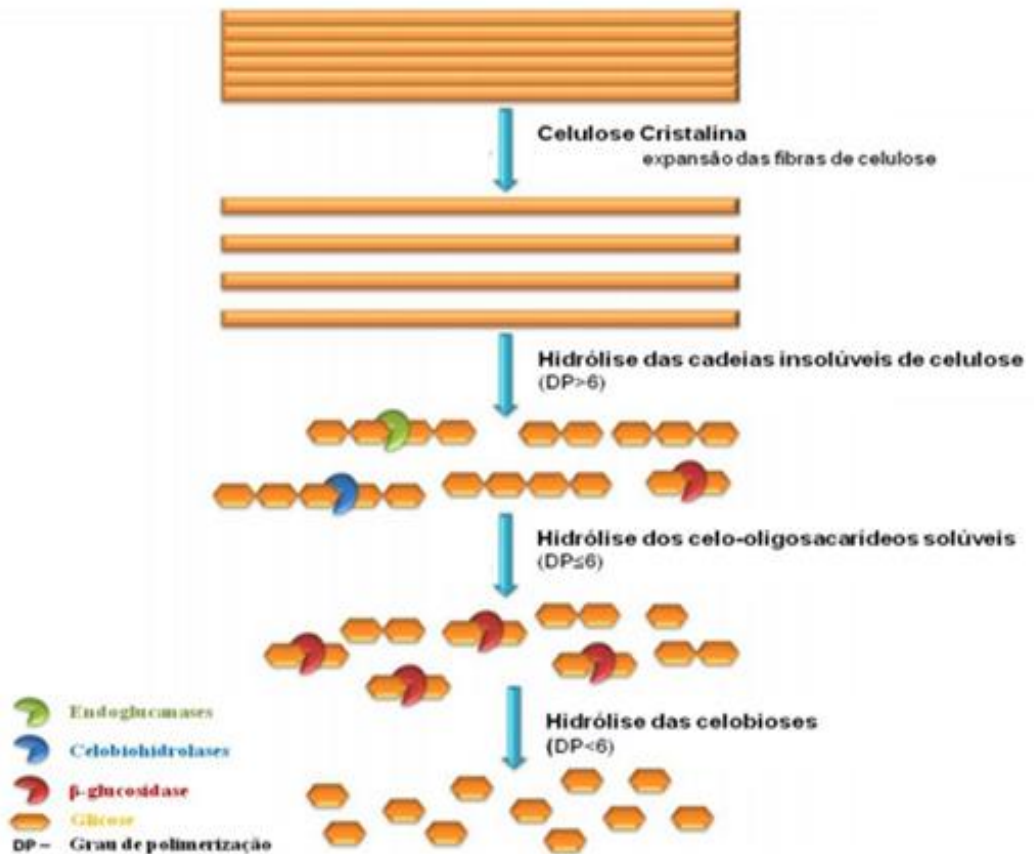
Destilação-retificação-desidratação: O vinho fermentado é colocado em colunas de destilação, nas quais é aquecido até evaporar. O etanol, que possui um ponto de ebulição menor que o restante dos componentes contidos no vinho fermentado é evaporado e em seguida condensado, sendo separado o vinho do etanol.

2.4. Enzimas glicohidrolases e hidrólise de materiais lignocelulósicos

A produção de glicohidrolases para uso no processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos tem sido realizada principalmente por fermentação submersa utilizando fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Thichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (KADAM, 2006).

Para hidrolisar todo o complexo de fibras encontrado nos materiais lignocelulósicos são necessárias no mínimo três enzimas básicas (HENDY, *et. al.*, 1982). Inicialmente as endoglucanases (EG, endo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.1.2.4) atacam regiões de baixa cristalinidade nas fibras de celulose, quebrando ligações glicosídicas na superfície das microfibrilas, principalmente onde as cadeias de celulose são mais fracamente associadas, provocando um aumento na disponibilidade de extremidades redutoras e não redutoras da cadeia. Em seguida as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- β -D-glucano celobiohidrolases, EC 3.2.1.91) atacam as extremidades do polímero e os produtos resultantes da atividade da endoglucanase, liberando celobiose (CAMASSOLA, *et. al.*, 2004; MARGEOT, *et. al.*, 2009; ZINOVIEV, *et. al.*, 2010) (Figura 1.1). Finalmente as β -glicosidases promovem a quebra da celobiose e de outros oligossacarídeos de baixa massa molar em glicose (Figura 1.1), que é utilizada para a produção de etanol pelas leveduras de interesse (MEDVE, *et. al.*, 1997; CAMASSOLA, *et. al.*, 2004; SANDGREN, *et. al.*, 2005; DASHTBAN, *et. al.*, 2009).

Figura 2.1: Mecanismo de ação das celulasas para hidrólise da celulose cristalina: **Verde:** endoglucanase; **Azul:** celobiohidrolase; **Vermelho:** β -glicosidase; **Amarelo:** glicose (MCKENDRY *et al.*, 2002).



As hemicelulasas e pectinases, conhecidas como enzimas acessórias, podem também desempenhar um papel importante na hidrólise da biomassa, agindo nas cadeias de hemiceluloses e pectina, proporcionando melhor acesso das celulasas à matriz de celulose (CAMASSOLA, *et al.*, 2004; KUMAR & WYMAN, 2009; DELABONA, *et al.*, 2012 b).

Atividades acessórias como a monooxigenase lítica de polissacarídeos também podem ter efeito benéfico na hidrólise enzimática por atacarem regiões cristalinas da cadeia de celulose apresentando efeito sinérgico com endoglucanase e celobiohidrolase (VAAJE-KOLDSTAD, *et al.*, 2010).

2.5. Otimização do processo de produção de celulases

Segundo estudos relacionados ao custo de produção das celulases, o custo do etanol celulósico deve ser competitivo com o etanol de primeira geração se a produtividade do processo de produção das celulases for na ordem de 200 a 250 FPU/L*h (HIMMEL *et. al.*, 1999). Estudo econômico efetuado na biorrefinaria virtual (CTBE) corrobora este resultado, mostrando a produtividade do sistema (FPU/L*h) como uma das variáveis mais impactantes no custo de produção do sistema enzimático. Pradella *et. al.* (2009) mostraram que produtividade de 200 FPU/L*h leva a custo de produção de enzima abaixo de US\$ 0,40/10.000 FPU, o que concorre para se ter uma contribuição do custo de enzima à produção de etanol de US\$ 0,10/L. Portanto, estudos que contribuam para aumentar a produtividade dessas enzimas, responsáveis pela hidrólise do bagaço, são de fundamental importância (DELABONA *et. al.*, 2012 e 2013; COSTA *et. al.* 2016).

A literatura apresenta muitos trabalhos que utilizam materiais lignocelulósicos como potenciais indutores de glicohidrolases. Esses materiais, como o bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana, farelo de soja e farelo de trigo, são considerados de baixo custo quando comparados a outras fontes industriais de nutrientes. Eles contêm porções de celulose e hemiceluloses, proporcionando a indução de enzimas responsáveis por hidrolisar as mesmas (REESE, 1969; MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977b; HENDY, *et. al.*, 1982; KASAN, *et. al.*, 2008; CASTRO & PEREIRA, 2010; DILLON, *et. al.*, 2011; DELABONA, *et. al.*, 2013; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b).

O uso de celulose como indutor de glicohidrolases (celulases e hemicelulases) em fungos filamentosos é bem documentado (HENDY, *et. al.*, 1982; HIMMEL, *et. al.*, 1999; DELABONA, *et. al.*, 2013; COSTA, *et. al.*, 2016 a). Por outro lado, a sacarose tem mostrado sua importância na indução de β -glicosidase e celulases, podendo entretanto variar o seu potencial de indução entre os microrganismos (KADAM, *et. al.*, 1996; IIMÉN, *et. al.*, 1997; DEMAIN, *et. al.*, 2009; BALAT, 2009; DELABONA, *et. al.*, 2013; COSTA, *et. al.*, 2016 a).

Mandels *et. al.*, (1962) verificaram que sofrorose, um dissacarídeo de glicose ligado na posição β 1-2 encontrado como uma impureza na glicose comercial, era o mais potente indutor da síntese das glicohidrolases em *Trichoderma*.

Reese *et. al.* (1969) afirmaram que o complexo celulolítico é induzido pelos substratos relacionados com a sua atividade. Ou seja, para induzir enzimas celulolíticas devem se utilizar substratos celulolíticos como fonte de carbono para o crescimento de fungos filamentosos. Por outro lado, produtos da hidrólise como celobiose e glicose produziram inibição da síntese de celulasas em *Trichoderma*, sendo esses bons indutores de crescimento de biomassa.

Ilmén *et. al.* (1997) demonstraram que a glicose utilizada como fonte de carbono promoveu bom crescimento de *T. reesei* QM9414, mas exerceu uma forte repressão da síntese de celulasas, agindo ao nível da transcrição dos genes que codificam essas enzimas, mesmo na presença de sofrorose, forte indutor da síntese dessas enzimas.

Hendy *et. al.* (1982) verificaram que a produtividade máxima de celulase por *T. reesei* RUT-C30 ocorreu quando se utilizou uma concentração inicial de celulose comercial (Solka Floc) de 50 g/L, acima desse valor houve repressão da síntese enzimática, acarretando em velocidades decrescentes da atividade das celulasas.

Íons metálicos também têm efeito positivo na biossíntese de celulasas, e Mandels e Reese (1957) apresentaram resultados que mostram a necessidade da presença de magnésio e cálcio para produção de celulasas em *T. reesei*. Kadam (1996) afirma que esses metais podem estar presentes como impurezas nas biomassas lignocelulósicas, utilizadas como fonte de carbono para produção de celulasas.

A indução da atividade provocada por farelos pode ser devida às altas cargas de proteínas verificadas na composição dos mesmos, que servem como fontes de aminoácidos para a produção de biomassa e proteína pelo fungo (AHAMED & VERMETTE, 2008; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). O farelo de trigo é o produto resultante do processamento do grão de trigo para obtenção da farinha de trigo comum, ou seja, é o que sobra na fabricação da farinha branca industrializada que consumimos diariamente em forma de pães, bolos, tortas entre outras infinidades de produtos (ROSTAGNO, *et. al.*, 2005; DASHTBAN, *et. al.*, 2009; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Por seu alto teor proteico, o farelo de soja e outros nutrientes ricos em nitrogênio orgânico, como o

extrato de levedura, podem contribuir para um crescimento celular mais vigoroso, que teria efeito benéfico à biossíntese enzimática (ILMÉN, 1996; COSTA, *et. al.*, 2016).

O farelo de trigo possui em sua composição 40,59 % de celulose, contra 14,93 % para o farelo de soja. A fração proteica contida no farelo de soja é de 44, 13 % enquanto que a fração proteica do farelo de trigo é de 15,52 %, sendo a principal vantagem do farelo de soja com relação ao farelo de trigo (ROSTAGNO, *et. al.*, 2005). Porém, a grande quantidade de proteínas encontrada no farelo de soja contribui para desregular o pH do meio, e isso pode afetar de forma negativa a produção de enzimas (COSTA, *et. al.*, 2016 b).

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a otimização de meios de cultura, utilizando a técnica de planejamento de experimentos, para a produção de celulase e hemicelulases, com os fungos *T. harzianum*, *T. reesei* RUT C30 e *P. echinulatum* S1M29. De uma maneira geral podemos concluir que: a) bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, hidrotérmico ou pré-tratado e deslignificado com NaOH a quente são ótimos indutores da atividade contra papel de filtro (FPase) e podem substituir com êxito celulose pura (comercial) como indutor de celulases (COSTA *et. al.*, 2012 e 2013 a e b) ; b) a suplementação do meio de cultura com farelo de soja contribui para o aumento de atividade celulolítica, ao passo que a suplementação com farelo de trigo contribui para o incremento da atividade hemicelulolítica (COSTA *et. al.*, 2012 e 2013 a e b); c) a suplementação de sacarose pode contribuir de uma maneira geral para aumento da velocidade da síntese enzimática, elevando a atividade das β -glicosidases, adiantamento do pico de algumas atividades enzimáticas no cultivo, porém, em alguns casos inibe fortemente a indução de celulases (COSTA *et. al.*, 2012 e 2013 a e b); e) aumento da concentração do meio de cultura original em até 3 vezes de bagaço pré-tratado (até 30 g/L) tem efeito positivo na elevação da atividade de celulase, β -glicosidase e xilanase, mas concentrações mais elevadas têm efeito inibitório na síntese, provavelmente por repressão catabólica, porém isso não ocorre com a atividade de β -glicosidase (COSTA *et. al.*, 2013 a); g) processo descontínuo alimentado pode minimizar até certo ponto o efeito da repressão catabólica (COSTA *et. al.*, 2013 a). Essas conclusões anteriormente obtidas por nosso grupo de pesquisa foram de extrema importância para o delineamento dos experimentos deste projeto.

2.3. Obtenção de mutantes hiperprodutores de glicohidrolases

Com o intuito de incrementar os níveis de produção de enzimas, linhagens fúngicas têm sido geneticamente modificadas para tentar obter organismos capazes de produzir elevados níveis de celulases (ROWLANDS, 1984; CHAND, *et. al.*, 2005; CHENG, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011). As mutações no DNA de qualquer organismo podem surgir espontaneamente ou podem ser induzidas por agentes mutagênicos. Mutagênicos físicos, químicos e biológicos são empregados para aumentar a frequência de mutação. O material genético de um microrganismo pode ser modificado e essa modificação tem que ser capaz de ser transmitida aos descendentes, dando origem aos organismos mutantes. O resultado é o aparecimento de um indivíduo diferente, que pode ser distinguível da linhagem selvagem em uma ou mais características genéticas desejadas (ROWLANDS, 1984; LEHNINGER, *et. al.*, 2006; CHENG, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011; ZHANG, 2017).

P. echinulatum linhagem 9A02S1 obtida por mutagênese clássica com radiação UV tem mostrado uma superior capacidade de produzir o conjunto completo de enzimas celulolíticas, com alta razão FPase/ β -glucosidase e capacidade de hidrolisar bagaço de cana pré-tratado com bons rendimentos tornando-se um forte candidato para a produção industrial de complexo enzimático celulolítico (MARTINS *et. al.*, 2008, CAMASSOLA *et. al.*, 2004; SEHNEM *et. al.*, 2006; CAMASSOLA e DILLON, 2007). A partir deste mutante *P. echinulatum* linhagem S1M29 foi recentemente obtida por mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio (DILLON *et. al.*, 2011).

Diversas técnicas são empregadas para a obtenção de fungos mutantes hipercelulolíticos, como fusão de protoplastos, irradiação por luz UV (IKEHATA & ONO, 2011), emprego de agentes químicos como o etil-metil-sulfonato (EMS) (COSTA *et. al.*, 2014), Brometo de etídio (EtBr), 1-metil-3-nitroguanidina (MNNG), dentre outros (ROWLANDS, 1984; AZIN & NOROOZI, 2001; CHENG, *et. al.*, 2009; KOVACS, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011; ZHANG, 2017).

A curva de sobrevivência é gerada com a contagem das colônias que resistiram após a exposição ao agente mutagênico e é uma forma de inferir a quantidade de erros aleatórios provocados no DNA de um organismo. Deste modo, quanto maior a

letalidade, maior a variabilidade gerada por mutações, em teoria. Geralmente é escolhida a condição que resulta em 90 a 98 % de mortalidade para a aplicação desta técnica (AZIN & NOROOZI, 2001; KOVACS, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011; ZHANG, 2017).

Para induzir mutações em fungos filamentosos é necessário trabalhar somente com os esporos, pois as hifas geralmente possuem mais de um núcleo, podendo resultar na impossibilidade de observação do fenótipo e perda deste mutante ao longo das etapas de seleção (AZIN & NOROOZI, 2001; KOVACS, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011; ZHANG, 2017).

As colônias sobreviventes são recuperadas, procedendo-se então à seleção da linhagem mais produtiva. A etapa de seleção é determinante para a obtenção de um potencial mutante hiperprodutor.

O uso desses agentes de mutagênese clássica em fungos filamentosos tem sido efetuado com êxito para microrganismos pertencentes a diversos gêneros, destacando-se *Trichoderma* e *Penicillium* (CHAND *et. al.*, 2005). Dillon *et. al.*, (2012) descreveram um método de mutagênese para fungos filamentosos do gênero *Penicillium*, utilizando peróxido de hidrogênio e seleção em placas de celulose intumescida (*swollen cellulose*) acrescida de 2-deoxi-D-glicose, que seleciona mutantes cuja a repressão catabólica é mimetizada.

2.7.2. Mecanismo de mutação por EMS em fungos filamentosos

Os agentes mutagênicos químicos, artificialmente produzidos, são mais eficientes para a promoção de mutação nos microrganismos, pois dependendo da interação dos mesmos com o DNA, o sistema de reparo do microrganismo não está preparado para aquele tipo de interação, com isso a mutação pode ser mais efetiva. O etil-metil-sulfonato (EMS) é um potente agente mutagênico que induz mudanças permanentes na estrutura do DNA. As mudanças são consolidadas pela deleção de fragmentos alquilados (pelo EMS) do material genético, uma mutação denominada “*frameshift*” que pode

alterar os quadros de leitura (SEGA, 1984; LEHNINGER, *et. al.*, 2006; CHENG, *et. al.*, 2009; ZHANG, 2017).

Tais mutações aparecem a uma taxa de 5×10^{-4} a 5×10^{-2} por gene. No mecanismo de ação do EMS o grupo etil ataca guaninas do DNA, conduzindo à formação da base nitrogenada anormal, O-6-etilguanina. Durante a replicação essa base anormal induz um erro no quadro de leitura pela DNA polimerase. Este erro resulta na introdução da base timina, ao invés de citosina, onde a sua complementar natural era a guanina. Assim, um par G:C acaba se tornando, após duas replicações, um par de A:T. Essa modificação poderá resultar em diferentes acontecimentos como; não produção de esporos pelo fungo, melhor capacidade de expressão e secreção das glicohidrolases, perda da capacidade de produção de espuma em ambiente de cultivo submerso, maior sensibilidade fisiológica em ambiente de cultivo submerso, dentre outros inúmeros outros fatores (SEGA, 1984; LEHNINGER, *et. al.*, 2006; CHENG, *et. al.*, 2009; ZHANG, 2017).

2.7.3. Seleção dos mutantes obtidos

A avaliação da capacidade do mutante de utilizar substratos lignocelulósicos, neste caso o bagaço de cana-de-açúcar, é de grande importância para o direcionamento da escolha de um mutante que induza as enzimas necessárias para a hidrólise do mesmo. O método de seleção por velocidade de crescimento de halos de hidrólise, que usa celulose pura (por exemplo, Celufloc 200™, Celuflok Und. Com. Brasil) como substrato é vantajoso para se fazer uma pré-seleção. Porém, o cultivo submerso utilizando o material lignocelulósico reproduz de forma mais realista o processo realizado em escala industrial, sendo indispensável a sua realização depois da pré-seleção em meio sólido (SUTO & TOMITA, 2001; DILLON, *et. al.*, 2011; KOVACS, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011; ZHANG, 2017).

No caso específico de melhoramento dos microrganismos produtores de celulasas por mutações clássicas, a principal dificuldade de aplicação deste tipo de metodologia é a seleção dos microrganismos realmente diferentes e melhores, quanto à produção das

glicohidrolases (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977b; SUTO & TOMITA, 2001; KASAN, *et. al.*, 2008; DILLON, *et. al.*, 2011). Esse tipo de melhoramento gera muitos mutantes a serem selecionados e um método eficiente e prático de seleção pode criar a possibilidade de poucas pessoas concluírem trabalhos tão dispendiosos (ROWLANDS, 1984; CHAND, *et. al.*, 2005; DILLON, *et. al.*, 2011; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b;). A diversidade de métodos aplicados para a seleção de fungos filamentosos hipercelulolíticos encontrados na literatura, sugere a necessidade de utilizar mais de um método de seleção visando aumentar a probabilidade de captar um verdadeiro mutante hipercelulolítico (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b; KASAN, *et. al.*, 2008; DILLON, *et. al.*, 2011; ZHANG, 2017).

A incorporação de corantes como vermelho congo, solução de iodo de coloração de Gram (KASAN, *et. al.*, 2008) e AZCL-HE-celulose ou ciclo de incubação a 50 °C para incremento da zona de clareamento (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b) são medidas auxiliares para melhor visualização dos halos de hidrólise da celulose ao redor das colônias formadas. Porém, os resultados de seleção usando esses tipos de corantes têm mostrado pouco sucesso pela literatura (KASAN, *et. al.*, 2008), não sendo eficiente para o fungo aqui trabalhado.

Várias divergências são encontradas na literatura a respeito do melhor método de seleção. Essa intensa atenção à essas metodologias de seleção se deve ao fato de que quando se opta por um método inadequado o trabalho se compromete inteiramente. Pensando nisso, esse trabalho se dedicou a estudar novas metodologias de seleção bem com melhorar as metodologias já estudadas pela literatura, de maneira a adaptá-las para o fungo aqui estudado. As metodologias desenvolvidas neste trabalho contribuíram para aumentar a eficiência do processo de seleção do mutante de interesse, bem como otimizar o seu processo de produção das glicohidrolases responsáveis por hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

CAPÍTULO 3

3. TAMPÃO BIFTALATO DE POTÁSSIO PARA CONTROLE DO PH PARA OTIMIZAR A PRODUÇÃO DE GLICOHIDROLASES EM FRASCOS AGITADOS PARA FUNGOS FILAMENTOSOS

RESUMO

O melhoramento do meio de cultura por metodologias estatísticas é de grande interesse para a confecção de meios ótimos de produção das glicohidrolases por fungos filamentosos. A execução de tais estudos em reatores de bancada com pH controlado é de elevada dificuldade, pois necessita de uma grande quantidade de reatores operando em conjunto. Isso, inviabiliza a realização de tais metodologias quando é empregada uma grande variedade de substratos diferentes a serem estudados em conjunto. O objetivo deste trabalho foi verificar a utilização do tampão biftalato de potássio para o controle do pH ao longo do cultivo, objetivando a possibilidade de realização do melhoramento do meio de cultura em pequena escala utilizando frascos agitados, para os fungos filamentosos *Penicillium echinulatum* PS1M29 e *Trichoderma harzianum* P49P11. Os resultados demonstraram que a utilização do tamponamento do meio, com o biftalato de potássio 0,1 M, permite um considerável controle do pH, diminuindo o desvio padrão dentro das triplicatas, para variação do pH e atividades das glicohidrolases, para os dois fungos utilizados como modelos. Foi verificada a influência de celulose, sacarose, farelo de trigo e farelo de soja, solução de sais, extrato de levedura e peptona para o desajuste do pH do cultivo em três projetos de experimentos diferentes, para os dois fungos. A utilização desta metodologia permitiu a otimização da atividade de FPase para *T. harzianum* P49P11 em pequena escala, aumentando a atividade das celulases em mais de 2 vezes em relação aos meios de cultura padrão, não tamponados. Este trabalho pode contribuir para auxiliar outros trabalhos de melhoramento de meios de cultura para os fungos filamentosos *Penicillium echinulatum* PS1M29 e *Trichoderma harzianum* podendo estender a metodologia para outras variedades de microrganismos.

3.1. Introdução

Os fungos filamentosos como *Trichoderma harzianum* e *Penicillium echinulam* surgiram como potenciais candidatos para aumentar a eficiência da produção das glicohidrolases. A otimização de meios de cultura e do processo de produção bem como a realização de melhoramentos genéticos destes fungos filamentosos são estratégias que vêm sendo utilizadas para diminuir o custo destas enzimas (DILLON *et. al.*, 2004 e 2011; DELABONA *et. al.*, 2012 a e b, 2013; PEREIRA *et. al.*, 2013; REIS *et. al.*, 2013).

Os componentes de meio de cultura podem modificar drasticamente o pH do meio e isso pode exercer grande influência sobre a biossíntese e atividade do complexo celulolítico, sendo necessário um controle deste parâmetro durante o cultivo submerso dos fungos (STERNBERG *et. al.*, 1979; TANGNU *et. al.*, 1981). Reis *et. al.*, (2014) descobriram que o melhor pH para indução das celulases para *P. echinulatum* S1M29 em biorreator era na gama de 5,5 a 6,5. Delabona *et. al.*, (2012) afirmaram que o pH ótimo para a atividade de FPase em cultivo utilizando biorreatores está na faixa de 5,0 a 6,0.

Um sistema tamponante adequado de cultivo pode possibilitar muitos estudos fisiológicos de indução enzimática para fungos filamentosos, sem a necessidade de se utilizar biorreatores de bancada com controle automático de pH. A estrutura e a atividade das enzimas glicohidrolases são extremamente sensíveis para variações bruscas de pH. Quaisquer agentes que promovem deformações na estrutura e forma do sítio ativo de uma enzima também promoverá a inativação de sua função/atividade (LEHNINGER, *et. al.*, 2006).

Já foi mostrado que o tampão biftalato de potássio era adequado para a produção de celulase por *T. reesei* RUT-C30, em frascos de agitação, para a estabilização do pH durante todo o período do tempo de cultivo, e este tampão conduziu um bom crescimento do fungo e foi eficiente na estabilização do pH do cultivo (FERREIRA *et. al.*, 2009). O tampão biftalato de potássio tem um conjunto de propriedades físico-químicas interessantes que lhe permite ser um potencial candidato para exercer a estabilização do pH durante o crescimento dos microrganismos. Ele abrange uma ampla faixa de pH no nível adequado de produção de celulases por fungos filamentosos (3,4-

5,9). Este tampão não é consumido, ao contrário do tampão citrato, e é fisiologicamente compatível com fungos filamentosos (FERREIRA *et al.*, 2009). O presente trabalho irá testar o seu potencial de tamponamento (em 0,1 M) de meio de cultura, em resposta aos diferentes componentes de meio estudados.

Este estudo teve como objetivo verificar o uso do tampão biftalato de potássio, para controle do pH, utilizando um sistema em pequena escala de frascos agitados, a fim de verificar a influência do bagaço de cana, submetidos a diferentes pré-tratamentos, Celufloc (celulose comercial micro pulverizado), sacarose, farelo de soja, farelo de trigo, extrato de levedura e solução de sais segundo Mandels e Reese (1957) (SS) sobre a alteração do pH do meio de cultura para os fungos filamentosos *P. echinulatum* e *T. harzianum*.

No presente estudo, verificou-se a influência, estaticamente significativa dos componentes de meio de cultura testados, para o descontrole do pH durante os estudos de otimização de meio de cultura realizados em frascos agitados.

3.2. Metodologia

3.2.1. Microrganismo

O fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* P49P11 foi isolado na floresta amazônica (DELABONA *et al.*, 2012 a), sendo doado pela Dra. Cristine Sanchez Farinas da Embrapa Instrumentação - São Carlos, SP, estando depositado na coleção de microrganismos Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil), com o número de acesso BRMCTAA115. O fungo filamentoso *Penicillium echinulatum* S1M29 é um mutante obtido por Dillon *et al.* (2012) e fornecido pela Universidade de Caxias do Sul, RS, Brasil. Os microrganismos utilizados foram armazenados em solução de glicerol (30 % v/v) a - 80 °C.

3.2.2. Cultivo submerso

Todos os experimentos foram realizados em estufas rotativas usando *erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura incubados a 29 °C em 200 rpm (Inova 44R, New Brunswick Scientific, EUA). O cultivo foi realizado como descrito. Os fungos filamentosos foram cultivados em placas de PDA a 29 °C durante 7 dias. Os esporos foram recolhidos com 20 mL de solução de *Tween 80* (0,1 % v/v) e transferidos para um meio de inóculo composto de *Celufloc 200TM* (CEL) (Celuflok Ind, Brasil) 10 g/L, glicose (GL) 10 g/L, peptona (PEP) 1 g/L, a solução salina de acordo com Mandels e Reese (1957) 20 vezes concentrada (SS) 100 mL/L e *Tween 80* a 1 mL/L. O inóculo foi mantido a 29 °C, 200 rpm durante 72 horas. O inóculo (10 % v/v) foi transferido para *erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura com uma composição variável, com ou sem tampão biftalato de potássio a pH 5,0 ou 5,9 de acordo com as condições estudadas e incubou-se nas mesmas condições acima descritas. Os planejamentos dos experimentos foram realizados e analisados utilizando *STATISTICA 7.0* (Statsoft, EUA). A determinação do modelo matemático foi realizado utilizando a técnica de *backward elimination* e a otimização do mesmo foi realizada com auxílio da sub-rotina Solver (Excel 2013; Microsoft Inc. EUA). As atividades enzimáticas de cada teste foram medidas em triplicata e os resultados são apresentados como média e desvio padrão.

3.2.3. Efeito do tampão sobre o pH e a atividade enzimática em diferentes fontes de carbono indutor

As experiências descritas abaixo foram realizadas para testar se o tampão estudado era adequado para o cultivo dos fungos e se o mesmo não influenciava na atividade das celulases produzidas por eles.

A influência de tampão biftalato de potássio foi investigada para *P. echinulatum* PS1M29 utilizando 10 g/L de diferentes bagaços de cana pré-tratados: explosão a vapor (BEX), explosão a vapor seguida de deslignificação a quente com NaOH (BED), tratamento hidrotérmico (BH) e celulose pura *Celufloc200* (CEL). Esses meios foram

suplementados com sacarose (SUC) 5,0 g/L, sulfato de amônio (SM) de 1,4 g/L, farelo de soja (FS) 2,0 g/L, farelo de trigo (FT) de 5,0 g/L, extrato de levedura (YE) 0,5 g/L, *Tween 80* a 1 mL/L e SS 100 mL/L de acordo com Mandels e Reese (1957). Estas experiências foram realizadas na presença e na ausência de tampão biftalato de potássio (0,1 M) a pH 5,9. Neste caso foi avaliado o melhor substrato para o cultivo deste fungo, verificando se os mesmos afetam o pH do meio (COSTA *et. al.*, 2016).

A influência do tampão biftalato de potássio na atividade de celulase foi investigada também para *T. harzianum* P49P11 no meio de cultura composto de bagaço de cana-de-açúcar explodido e deslignificado (BED) 7 g/L, sacarose (SUC) 3 g/L, peptona (PEP) 1 g/L, *Tween 80* a 1 mL/L e uma solução de sais (SS) 100 mL/L, de acordo com Delabona *et. al.*, (2013). Estas experiências foram realizadas na presença e na ausência de tampão biftalato de potássio (0,1 M) pH 5,0. Foi escolhido apenas o BED para esse fungo pois de acordo com os resultados demonstrados por Delabona *et. al.*, (2012 e 2013) este era o melhor substrato para induzir a secreção das glicohidrolases. O tampão biftalato de potássio (0,1 M) pH 5,0 foi preparado segundo Ferreira *et. al.*, (2009) e utilizado no meio de cultivo.

3.2.4. Influência dos componentes de meio estudados em conjunto para a variação do pH do cultivo submerso

Os experimentos descritos abaixo foram realizados com o objetivo de observar a utilização desse tampão para o controle de pH em experimentos de otimização de meios de culturas utilizando frascos agitados. Estes experimentos foram realizados também para verificar a influência que cada componente de meio possui para a alterar o pH do meio, tanto no sentido de aumento como de diminuição do mesmo. Este experimento se fez necessário para verificar os cuidados que se deve tomar ao delinear tais experimentos, mostrando os limites de concentrações dos componentes e pH inicial de cultivo a serem utilizados.

Tabela 3.1: Faixa de concentração dos componentes estudados nos diferentes ensaios, para os dois fungos em estudo.

| Componentes | <i>P. echinulatum</i> PS1M29 | | | <i>T. harzianum</i> P49P11 | | |
|----------------------------|------------------------------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|
| | DFF | DCCR1 | DCCR2 | DFF | DCCR1 | DCCR2 |
| Farelo de Trigo | 0-5 | | | 0-5 | | 0-15 |
| Farelo de Soja | 0-10 | 5-15 | 0-5 | 0-10 | 0-15 | |
| Extrato de Levedura | 0-2 | 4-7,5 | 0-3 | 0-2 | | |
| Sacarose | 0-10 | | | 0-10 | 0-10 | 0-10 |
| Solução de Sais | 50-300 | | | 50-100 | | |
| Bagaço BEX | | 10-30 | | | | |
| Peptona | | | | 0-2 | | |
| Celulose | | | | | 0-20 | 0-20 |

Três projetos estatísticos foram realizadas com o fungo *P. echinulatum* PS1M29: um DFF (Delineamento Fatorial Fracionado), um DCCR1 (Delineamento Composto Central Rotacional) e um DCCR2 (Tabela 3.1). O planejamento fatorial fracionário (DFF) 2^{5-2} foi realizado com o objetivo de estudar a influência de cinco componentes do meio de cultura para o desajuste do pH, utilizando este tampão, sendo os intervalos de concentração estudados: FT (0-5 g/L), FS (0-10 g/L), YE (0-2 g/L), SAC (0-10 g/L) e SS (50-300 mL/L). O planejamento composto central rotacional (DCCR1) foi realizado utilizando altas concentrações dos substratos FS (5-15 g/L), YE (5-7,5 g/L) e BEX (10-30 g/L). Para o DFF e DCCR1 utilizou-se um pH inicial de 5,9 ajustado pelo tampão biftalato potássio 0,1 M. O DCCR2 foi realizado através da variação de quantidades diferentes de FS (0-5 g/L) e YE (0-3 g/L) em pH inicial de 4,7 utilizando o tampão biftalato 0,1 M. As amostras foram coletadas no tempo de 144 horas de cultivo submerso, ponto de máxima atividade, centrifugadas a 10.000 x g, 10 minutos, 10 °C e para os sobrenadantes foram realizadas as aferições de pH (Tabela 3.1).

Três projetos estatísticos também foram realizados para o fungo *T. harzianum* P49P11: um DFF, um DCCR1 e um DCCR2. O DFF foi um planejamento 2^{6-2} para testar a influência dos componentes FS (0-10 g/L), FT (0-5 g/L), SAC (0-10 g/L), YE (0-2 g/L), PEP (0-2 g/L), SS (50-100 mL/L). Para o DCCR1 foram estudados meios de culturas compostos por SAC (0-10 g/L), CEL (0-20 g/L) e FS (0-15 g/L). Os meios de cultura para o DCCR2 foram compostos de SAC (0-10 g/L), CEL (0-20 g/L) e FT (0-15 g/L). As amostras foram coletadas nos tempos de 72 horas para o FFD, de 48, 72 e 96 horas para o DCCR1 e de 72 e 96 horas para o DCCR2. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos à 10 °C e os sobrenadantes foram utilizadas para aferição do pH e atividade das celulases em 96 horas de cultivo, para o DCCR1 (Tabela 3.1).

O pH foi aferido utilizando uma sonda de pH e potenciometria padrão (Mettler Toledo modelo S220) e o valor de Δ pH calculado como a diferença entre o valor do pH inicial e o valor real do pH aferido nos diferentes tempos de cultivo submerso.

3.2.5. Atividade Enzimática

As atividades das celulases do sobrenadante enzimático foram medidas usando o método de papel de filtro com uma escala de redução de 10 vezes de acordo com Ghose, 1987, definida como atividade FPase e relatado como FPU/mL. Açúcares redutores foram medidos pelo método de DNS (MILLER, 1959), utilizando glicose como um padrão (COSTA, *et. al.*, 2016).

3.3. Resultados

3.3.1 Efeito do tampão sobre a atividade de FPase para diferentes fontes de carbono indutor

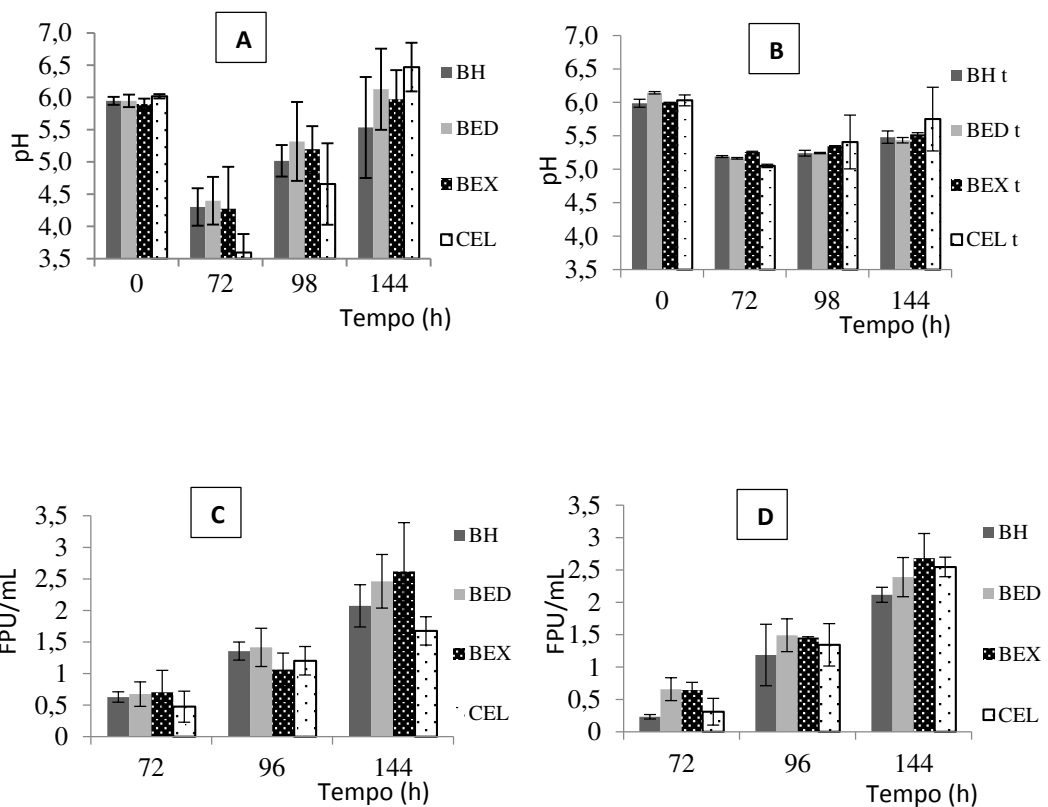
O bagaço de cana pré-tratado por diferentes métodos (BEX, BED e BH) e a celulose comercial micronizada (Celufloc 200TM, CEL) foram utilizados como fontes indutoras das glicohidrolases para *P. echinulatum* S1M29. Para *T. harzianum* P11P49

foi utilizado um meio de cultura anteriormente otimizado por Delabona *et. al.*, (2013). O objetivo deste experimento foi verificar a influência do tampão biftalato de potássio sobre a atividade de FPase e sua posterior utilização para a manutenção do perfil do pH ao longo do tempo de cultivo, para os dois fungos exemplificados neste trabalho.

As experiências com *P. echinulatum* foram realizadas com e sem o controle do pH, utilizando o tampão biftalato de potássio a pH inicial de 5,9, que se sabe estar na gama de pH ótimo para a síntese de celulases por esse fungo (REIS *et. al.*, 2014). Para este fungo, os ensaios não tamponados exibiram uma grande alteração do pH ao longo do tempo de cultivo, para todas as fontes de carbono testadas, decrescendo na faixa de 5,9-3,5 e depois subindo até 5,9 novamente (Figura 3.1 A). Por outro lado, experiências tamponadas levaram a um forte decréscimo dessas flutuações de pH (Figura 3.1 B) para todas as fontes de carbono testadas. Ele tende a diminuir a partir de 6 para 5 nas primeiras 72 horas, porém depois deste período o pH subiu para 5,7 e permaneceu estável até o final do experimento. As variações do pH de cultivo, utilizando o tampão proposto, foram bem menores comparadas aos resultados na ausência do mesmo em cultivo submerso.

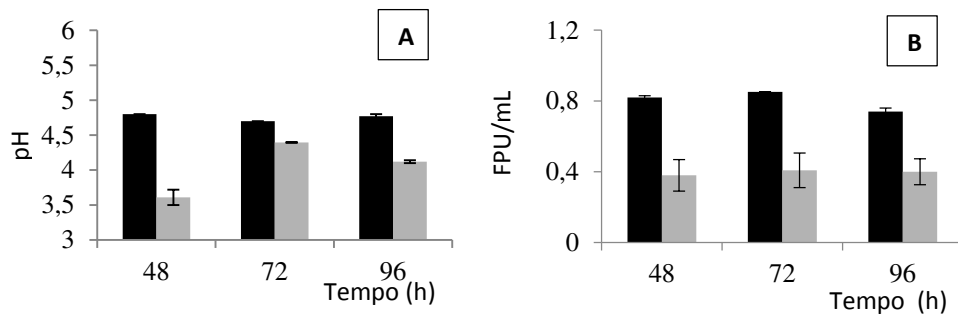
A influência da utilização do tampão para a atividade de FPase também foi investigada, e percebe-se que o tampão teve uma influência positiva para esta atividade. Utilizando a CEL como indutor das celulases, percebe-se que as atividades de FPase foram sempre inferiores para os cultivos não tamponados (Figura 1 C) quando comparados aos resultados em meio tamponado (Figura 3.1 D), conduzindo claramente uma atividade de FPase maior (2,5 FPU/mL) do que nas experiências não tamponadas (1,7 FPU/mL) no tempo de 144 horas. Interessante, aparentemente, este não era o caso dos bagaços de cana pré-tratado por diferentes metodologias, BEX, BED e BH sendo que seus títulos máximos de FPase atingidos em 144 horas foram na faixa de 2,1-2,7 FPU/mL com e sem o tampão (Figura 3.1 C e D). Estes resultados demonstram que as diferentes fontes de celuloses estudadas, nestas condições, induzem de forma bastante semelhante a atividade de FPase, sendo que o principal fator das flutuações das atividades o desajuste do pH do meio.

Figura 3.1: Variação do pH com o tempo de cultivo (A e B) e da atividade de FPase (C e D) para *Penicillium echinulatum* S01M29 em cultivo submerso em diferentes fontes de carbono indutor. Valores médios das triplicatas com seu respectivo desvio padrão: A) sem controle de pH; B) com pH controlado por biftalato de potássio 0,1 M; C) FPase sem controle de pH; D) FPase com pH controlado com tampão biftalato de potássio 0,1 M em pH inicial 5,9.



Por outro lado, *T. harzianum* P49P11 cultivado no meio de cultura em condições tamponadas a pH 5,0 e não tamponados foram muito diferentes (Figura 3.2 A e B). Uma alteração dramática no perfil de pH foi observado sem o uso de tampão biftalato. Observa-se que com a presença do tampão, o pH se estabilizou próximo a 5 em todo o tempo de cultivo, porém na ausência do tampão houve uma queda do pH para 3,5 (Figura 3.2 A) em 48 horas de cultivo.

Figure 3.2: Evolução do pH (A) e da atividade de FPase (B) para *Trichoderma harzianum* P49P11 S01M29. Valores médios das triplicatas com seu respectivo desvio-padrão: A) pH controlado por tampão biftalato de potássio 0,1 M (barras negras) e sem controle de pH (barra cinza); B) FPase em pH controlado 5,0 por tampão biftalato de potássio 0,1 M (barra preta) e FPase em pH sem controle pelo tampão (barra cinza).



A atividade máxima de FPase atingida foi de 0,8 FPU/mL em 72 horas e 96 horas de cultivo submerso, com a presença do tampão (Figura 3.2 B). Entretanto na ausência do tampão a atividade máxima atingida não ultrapassou 0,4 FPU/mL, ou seja, somente com o uso deste tampão para o controle do pH a atividade de FPase praticamente dobra (Figura 3.2 B). Está claro que a queda do pH abaixo de 4,0 prejudica a atividade das glicohidrolases. Este resultado está de acordo com Delabona *et. al.*, (2012), que alegou que o pH ideal está na faixa de 5,0 a 6,0, para atividade ótima de FPase para o cultivo submerso do *T. harzianum* P1P49. Fica claro que a alteração do pH do cultivo interfere na atividade dessas enzimas, provavelmente o sítio ativo destas enzimas apresenta alta sensibilidade pela alteração do pH ambiental, tendo a sua melhor atividade dentro de uma estreita faixa de pH.

Portanto, as experiências anteriores demonstram a utilidade do sistema tampão proposto, para ambos os fungos, e corroboram com Ferreira *et. al.* (2009), que foi o primeiro a propor a utilização do tampão de biftalato de potássio como controlador do pH em cultivo submerso utilizando frascos agitados para *T. reesei*. Por esses resultados, percebe-se que o tampão foi adequado para o cultivo destes dois microrganismos, e que permitiu até uma melhora na atividade de FPase.

3.3.2. Influência de diferentes componentes de meio de cultivo na variação do pH durante o estudo de otimização do meio em frascos agitados

A otimização de meios de cultura é um estudo-chave para aumentar o título de celulase, e portanto, reduzir o custo do complexo enzimático celulolítico (COSTA, *et. al.*, 2016; DELABONA, *et. al.*, 2013).

Para planejar experimentos de otimização de meio em frascos agitados, deve-se atentar às influências que cada ingrediente de meio exerce na alteração do pH do cultivo. Essa preocupação inicial se deve ao fato de que a desestabilização do mesmo pode gerar resultados inconclusivos a respeito da influência que cada componente possui na atividade das glicohidrolases, sendo essas influências mascaradas pela alteração do pH quando o mesmo se encontra descontrolado. A verificação de como cada ingrediente afeta o pH do meio, mesmo tamponado com o tampão proposto, é de grande ajuda para se planejar experimentos de otimização em frascos agitados de maneira mais direcionada às limitações desta técnica. Para isso, vários planejamentos foram criados para os fungos filamentosos *P. echinulatum* e *T. harzianum*. Os ingredientes do meio de cultura foram escolhidos com base em estudos anteriores para o *P. echinulatum* (PEREIRA *et. al.*, 2013) e o *T. harzianum* (DELABONA *et. al.*, 2012).

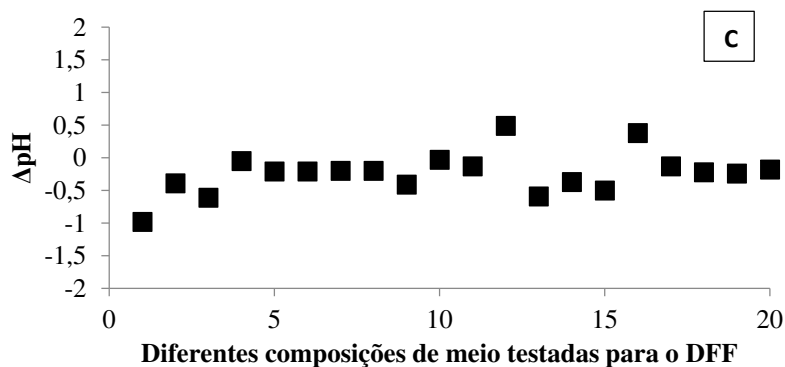
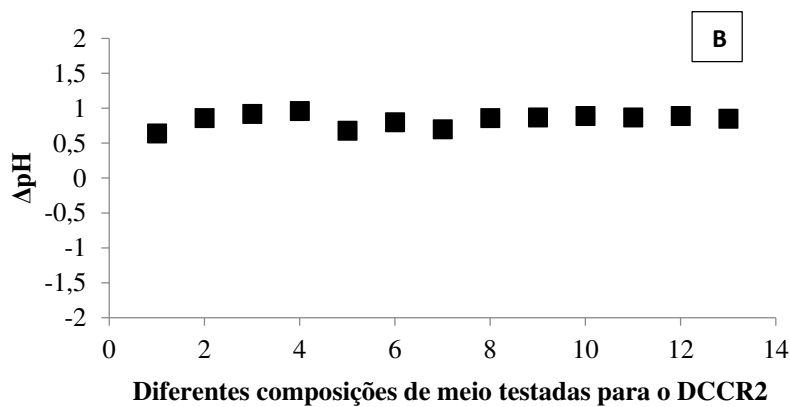
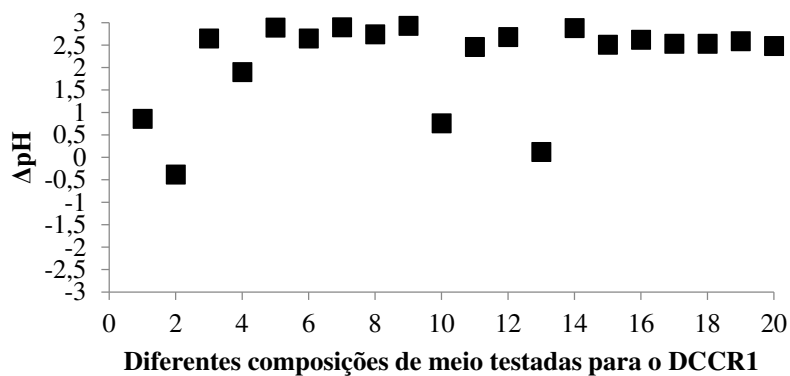
3.3.2.1. *P. echinulatum* S1M29

Três estudos de casos foram realizados para o fungo *P. echinulatum* S1M29 utilizando tampão biftalato potássio: um fatorial fracionado (DFF) criado para estudar a influência dos cinco componentes diferentes de meio de cultura, e dois Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR1 e DCCR2) usando um número reduzido de componentes de meio. As condições testadas e os resultados da análise dos efeitos, a 95 % de confiança, estão resumidos na Tabela 3.2. A Figura 3.3 mostra os valores de ΔpH observado para estas três experiências.

Tabela 3.2: Análise para os diferentes designs dos experimentos testados. Influência que cada faixa de concentração, dos diferentes componentes de meio exerce para a variação do pH para o cultivo do *P. echinulatum* S1M29. DFF e DCCR1 pH inicial foi de 5,9; DCCR2 pH inicial foi de 4,9. Cinzento claro: componente que tem o efeito de aumentar o pH do meio de cultura, em cultivo submerso; cinzento escuro: componente que tem o efeito de baixar o pH do meio de cultura, em cultivo submerso (valor de $p < 0,05$ representa efeito significativo no nível de confiança de 95,0 %).

| Componentes | DFF | | | DCCR1 | | | DCCR2 | | |
|---------------------------|--------------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | Faixa de | | | Faixa | p-valor | Efeito | Faixa | p-valor | Efeito |
| | concentração | p-valor | Efeito | | | | | | |
| Farelo de Soja (g/L) | 0-5 | 0,272 | +0,261 | 5-15 | 0,000 | +0,664 | 0-5 | 0,000 | +0,390 |
| Sacarose (g/L) | 0-10 | 0,580 | -0,128 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Farelo de Trigo (g/L) | 0-10 | 0,580 | +0,126 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Extrato de Levedura (g/L) | 0-2 | 0,875 | +0,036 | 5-7,5 | 0,000 | +1,580 | 0-3 | 0,000 | +0,470 |
| Solução de Sais (mL/L) | 50-300 | 0,154 | -0,346 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Bagaço Explodido (g/L) | --- | --- | --- | 10-30 | 0,000 | -0,884 | --- | --- | --- |
| R-adj | 0,00 % | | | 88,19 % | | | 99,30 % | | |

Figura 3.3: Δ pH para as diferentes composições de meio de cultura para *Penicillium echinulatum* S01M29 em cultivo submerso por 144 horas. **A)** Cultivo utilizando a composição ditada pelo DCCR1 usando o tampão biftalato de potássio 0,1 M em pH inicial 5,9; **B)** Cultivo utilizando a composição ditada pelo DCCR2 usando o tampão biftalato de potássio 0,1 M em pH inicial 4,9; **C)** Cultivo utilizando a composição ditada pelo DFF usando o tampão biftalato de potássio 0,1 M em A inicial 5,9.



A condições estudadas no DFF realizado para *P. echinulatum* indicaram que os componentes dos meios de cultura estudados não foram significativos em 95 % de confiança, para o desequilíbrio do pH no cultivo. O valor de R-adj foi de 0,0 % e todos os valores de p eram muito maiores do que 0,05 para todos os componentes de meio testados (Tabela 3.2). Isto significa que não houve efeito entre a variação Δ pH do caldo de cultura para os componentes testados, na gama de concentração experimentados para este fungo filamentoso (Tabela 3.2). A Figura 3C indica que o desajuste do pH durante o cultivo estava na gama de $\pm 1,0$ em torno do valor inicial de 5,9. Foi previamente mostrado que a maior produção de glicohidrolase era em torno do pH 6,0 (REIS *et. al.*, 2014). Por conseguinte, o tampão utilizado foi muito eficiente para controlar o pH na região de valor ótimo para a biossíntese das glicohidrolases produzidas por *P. echinulatum*, sendo provável que o estudo das influências dos componentes é confiável, nesta condição (COSTA, *et. al.*, 2016).

Para explorar a possibilidade de utilização desta metodologia em planejamentos do tipo DCCR1, um intervalo de concentração menos propícios foi executado, utilizando concentrações mais altas de ingredientes de meio cultura FS (5-15 g/L), YE (5-7,5 g/L) e BEX (10-30 g/L) (Tabela 3.2). Nesta circunstância, o uso de tampão biftalato de potássio utilizado para manter o pH inicial de 5,9, não foi adequado, observando variações no Δ pH maiores que $\pm 1,0$, sendo encontrados valores de pH tão altos como 8,5 (Figura 3.3A). A Tabela 1 mostra que estes valores foram provavelmente devido à alta concentração de FS e YE (valores de $p = 0,00$ a 95 % no nível de confiança), que foram estatisticamente significativos para aumentar o pH do meio de cultura. BEX foi estatisticamente significativo para diminuir o pH do cultivo. Neste caso a realização de modelagens matemáticas, para estudar a influência dos componentes de meio de cultura para produção de celulases, portanto, não era possível, pois nestas condições o tampão biftalato não foi eficiente para atingir o controle necessário do pH do cultivo dentro da faixa de não desnaturação das celulases.

Para contornar os problemas verificados nas condições estudadas no DCCR1 foi realizado um DCCR2 abaixando os níveis de concentração YE e FS, respectivamente, 0-3 g/L e 0-5 g/L, e mantendo a concentração BEX a 20 g/L. Também estava previsto que, devido ao metabolismo de proteínas a partir de FS e YE, a provável secreção de

NH_4^+ seria um fator que aumentaria o pH do meio de cultura. Para resolver este problema, decidiu-se ajustar o pH do tampão biftalato potássio ajustando o valor inicial de pH para 4,9. Nestas condições foi observado novamente que FS e YE influenciaram positivamente para aumentar o pH do meio de cultura ($p = 0,00$ a 95 % no nível de confiança) (Tabela 3.2), no entanto houve uma baixa variação ΔpH (Figura 3.3b). Com efeito, foi possível manter ΔpH numa gama bastante baixa de variação, sendo provável que estudos de modelações matemáticas possam ser realizadas para alcançar a faixa de concentrações ideais destes componentes para a produção ótima das glicohidrolases em frascos de agitação, nestas condições, para esse fungo.

3.3.2.2. *T. harzianum* P49P11

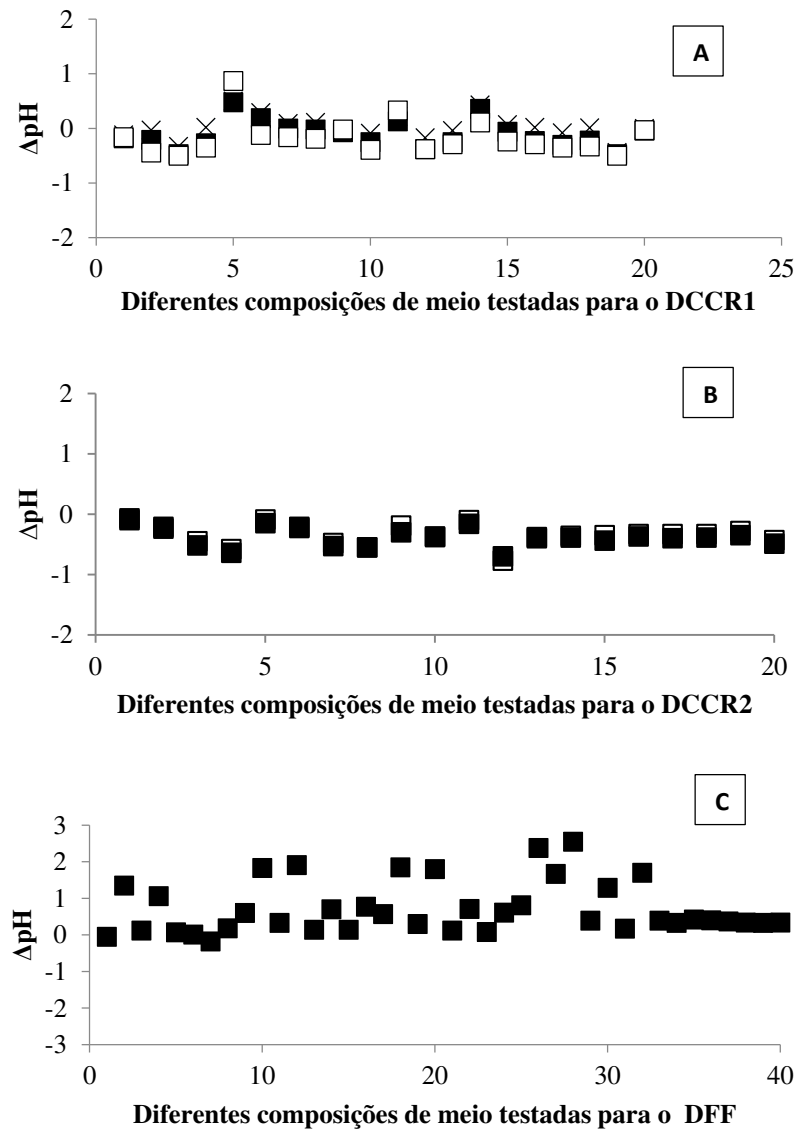
Três estudos de casos foram realizados com o objetivo de verificar a influência dos componentes de meio para o desajuste do pH do cultivo de *T. harzianum* P49P11 utilizando o tampão biftalato de potássio: um Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) sobre a influência de cinco componentes diferentes de meios de cultura e dois Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR1 e DCCR2) utilizando três componentes de meio de cultura.

As condições testadas e os resultados da análise das influências estão resumidos na Tabela 3.3, e a Figura 4 mostra os valores de ΔpH observados para estas três experiências. Os resultados da Tabela 3.2 demonstraram que, de fato, houve uma influência dos componentes testados para a variação do pH do meio de cultivo em todos os planejamentos realizados, onde foram verificados altos valores R-adj para todos os DOEs, respectivamente, com correlação de 80 % (DFF), 88 % (DCCR1) e 95 % (DCCR2) (Tabela 3.3). Esse resultado sugere uma elevada sensibilidade de *T. harzianum*, de acordo com os ingredientes do meio de cultivo, para o desajuste do pH, mesmo utilizando o tampão proposto.

Tabela 3.3: Análise dos diferentes experimentos realizados. Influência que cada faixa de concentração, dos diferentes componentes de meio, exerce para a variação do pH de cultivo do *T. harzianum* P1P49. O pH inicial foi de 5,0. Cinzento claro: componente que tem o efeito de aumentar o pH do meio de cultura, em cultivo submerso; cinzento escuro: componente que tem o efeito de baixar o pH do meio de cultura, em cultivo submerso (valor de $p < 0,05$ representa efeito significativo ao nível de confiança de 95 %).

| Componentes de Meio | DFF | | | DCCR1 | | | DCCR2 | | |
|---------------------------|-----------------------|---------|--------|-----------------------|---------|--------|-----------------------|---------|--------|
| | Intervalo estudado | p-valor | Efeito | Intervalo estudado | p-valor | Efeito | Intervalo estudado | p-valor | Efeito |
| Farelo de Trigo (g/L) | 0-10 | 0,000 | +0,968 | 0-10 | 0,000 | +0,369 | --- | --- | --- |
| Sacarose (g/L) | 0-10 | 0,000 | -0,765 | 0-10 | 0,002 | -0,259 | 0-10 | 0,023 | -0,068 |
| Farelo de Soja (g/L) | 0-5 | 0,780 | +0,031 | --- | --- | --- | 0-15 | 0,823 | 0,003 |
| Extrato de Levedura (g/L) | 0-2 | 0,000 | +0,544 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Peptona (g/L) | 0-2 | 0,000 | +0,505 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Solução de sais (mL/L) | 50-100 | 0,128 | +0,176 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Celulose (g/L) | --- | --- | --- | 0-20 | 0,000 | -0,372 | 0-20 | 0,000 | -0,359 |
| R-adj | | 80,00 % | | | 88,00 % | | | 95,00 % | |

Figura 3.4: Δ pH para as diferentes composições de meio de cultura para *Trichoderma harzianum* P49P11 em cultivo submerso utilizando tampão biftalato de potássio 0,1 M pH 5,0 em diferentes tempos. 48 horas (X), 72 horas (■) e 96 horas (□): **A)** DCCR1; **B)** DCCR2; **C)** DFF.



Notou-se que os efeitos dos ingredientes foram significativos para o desajuste do pH, exceto para a solução de sais (SS) e farelo de trigo (FT) que não exerceram efeito significativo em nenhum dos ensaios realizados com este fungo filamentoso (Tabela 3.3).

Farelo de soja (FS), extrato de levedura (YE) e peptona (PEP) exerceram grande influência sobre o aumento do pH do meio de cultura ao nível de confiança de 95 %, com o p-valor de 0,00 para as três fontes orgânicas nitrogenadas, provavelmente pela acumulação de NH_4^+ no caldo de cultura durante a metabolização destes componentes, que possuem uma elevada carga proteica. Por outro lado, a sacarose e a celulose diminuíram fortemente o pH do meio de cultura a um nível de confiança de 95 %, para todos os planejamentos realizados (p-valor = 0,00, Tabela 3.3). Isto sugeriu uma acumulação de compostos vindo do metabolismo incompleto dos carboidratos, gerando produtos derivados de ácidos, abaixando o pH do meio. Foi previamente observado que para *T. harzianum* P49P11 a variação na ordem de $\pm 1,0$ unidade de pH do caldo não afetaria a atividade das glicohidrolases, sendo a gama de pH ótimo para esse fungo na ordem de 5,0 a 6,0 (DELABONA *et. al.*, 2012).

Portanto, experimentos com ΔpH superiores a $\pm 1,0$ não seriam válidos para otimizar o meio de cultura para a produção das glicohidrolases para esse fungo. Foi observado a partir da Tabela 3.3 e Figura 3.4 C que os valores de ΔpH para as condições estudadas no DFF foram maiores do que o permitido, cerca de 2,0 unidades, invalidando as respostas de FPase para as análises estatísticas deste planejamento. No entanto, para as condições utilizadas nos DCCRs, estudando um menor número de componentes de meio e faixa de concentração, constatou-se que o ΔpH não saiu da faixa permitida de variação, ± 1 (Figura 3.4 A e B). Nestas circunstâncias, a construção de modelos matemáticos preditivos, para a atividade das glicohidrolases, podem ser realizados. Para ilustrar essa possibilidade, um conjunto de análises estatísticas foram realizadas para verificar a concentração ótima desses componentes, objetivando um meio ótimo para indução das glicohidrolases para o fungo filamentoso *T. harzianum* P49P11.

3.3.3. Otimização do meio de cultura para *T. harzianum* P49P11 utilizando o tampão biftalato de potássio para controle de pH em frascos agitados

Com base nos estudos anteriores, foram escolhidos os resultados das condições estudadas no DCCR2, a 96 horas de cultivo, para exemplificar a possibilidade de

otimizar meios de culturas utilizando a metodologia proposta. A etapa inicial foi a verificação da variação do pH que está dentro da faixa de não desnaturação das glicohidrolases. Com isso, pode-se confiar que as análises das atividades de FPases não estarão mascaradas pela variação do pH, fazendo com que as influências sejam apenas advindas da variação da concentração dos componentes estudados (Figura 3.4 B).

Para exemplificar a aplicação desta metodologia foi realizada a análise do DFF e do DCCR2 em 96 horas de cultivo, para verificar a influência dos componentes para a atividade de FPase, no cultivo submerso do fungo *T. harzianum* P49P11 em frascos de agitação (Tabela 3.4). Lembrando que as condições estudadas no DFF apresentaram problemas no controle do pH (Figura 3.4 C).

Para as condições estudadas no DFF foram testados os componentes de meio de cultura FT, SAC, FS, YE, PEP e SS e para o DCCR2, SAC, FT e CEL (Tabela 3.4). A análise de variância foi realizada para demonstrar a relação da máxima atividade de FPase com os componentes de meios de cultura dos ensaios DFF e DCCR2. Os valores R-adj calculados foram, respectivamente, 49,78 % e 84,07 % (Tabela 3.4). Portanto, as condições estudadas no DCCR2 resultaram em um R-adj dentro dos valores permitidos para propor um modelo matemático que descreve as concentrações ótimas de SAC, FT e CEL para se obter a atividade máxima de FPase para o experimento nas condições estudadas no DCCR2. Enquanto os resultados das condições estudadas no DFF nos conduziu a resultados inconclusivos, devido o alto valor de Δ pH e, conseqüentemente, um baixo R-adj (Figura 3.4 C, Tabela 3.4). Com base neste resultado, as condições testadas no DFF não servem para nos informar a respeito de influências que os componentes exercem na atividade de FPase, pois essa atividade está mascarada frente às altas variações do pH.

A análise do resultado para as condições estadas no DCCR2 levou-nos a afirmar que só celulose (CEL) e farelo de trigo (FT) foram importantes para a atividade de FPase enquanto sacarose (SAC) teve efeito negativo sobre a indução/secreção das enzimas que realizam a atividade de FPase em 96 horas de cultivo submerso para *T. harzianum* P49P11 (Tabela 3.4). Para a construção do modelo foram utilizados todos os coeficientes calculados das análises estatísticas realizadas pelo *software* ESTATÍSTICA 7.0.

Tabela 3.4: Análise da influência de cada componente de meio de cultura na atividade de FPase em 96 horas de cultivo submerso para *T. harzianum* P41P11. O pH inicial foi de 5,0. Cinza claro: componente que exerce uma influência significativa e positiva a 95 % de confiança, na atividade de FPase (p-valor < 0,05 representa efeito significativo no nível de confiança de 95,0 %).

| Substrato | DFF | | | DCCR | | |
|---------------------------|---------------------------|---------|------------|---------------------------|---------|--------|
| | Intervalo de concentração | p-valor | Efeito | Intervalo de concentração | p-valor | Efeito |
| Farelo de Trigo (g/L) | 0-10 | 0,100 | -0,030 | --- | --- | --- |
| Sacarose (g/L) | 0-10 | 0,057 | +0,01 4 | 0-10 | 0,053 | -0,049 |
| Farelo de Soja (g/L) | 0-5 | 0,290 | -0,020 | 0-15 | 0,012 | +0,110 |
| Extrato de Levedura (g/L) | 0-2 | 0,000 | -0,095 | --- | --- | --- |
| Pepitona (g/L) | 0-2 | 0,000 | -0,098 | ---- | --- | --- |
| Solução de Sais (mL/L) | 50-100 | 0,011 | -0,061 | --- | --- | --- |
| Celulose (g/L) | --- | ---- | --- | 0-20 | 0,000 | +0,170 |
| R-adj | | 49,78 % | | | 84,07 % | |

A equação 1 mostra o modelo matemático, em unidades codificadas obtidos pela técnica de eliminação para trás, para a atividade FPase em 96 horas de cultivo submerso. O modo de utilização desta técnica está detalhada no *anexo A* deste trabalho.

$$FPase = 0,521718 + 0,132718*x_2 - 0,035152*x_2^2 - 0,022421*x_3 + 0,017439*x_3^2 + 0,047713*x_1*x_2 - 0,041237*x_1*x_3 + 0,023987*x_2*x_3 \quad (\text{Eq 1})$$

Onde, x_1 , x_2 e x_3 são as concentrações codificadas de, respectivamente, sacarose (SAC), farelo de trigo (FT) e Celufloc 200TM (CEL). A otimização da relação FPase com x_1 , x_2 e x_3 foi realizada utilizando sub-rotina Solver (EXCEL 2013, Microsoft Inc, EUA) que previu a atividade máxima de FPase 0,98 FPU/mL, que foi conseguida utilizando os meios de cultura com a seguinte concentração: SAC = 0,0 g/L, FT = 15 g/L e CEL = 20,0 g/L. O meio de cultura ideal, para a atividade de FPase em 96 horas de cultivo do DCCR2 proposto pela Eq 1 foi posteriormente validado em triplicata por cultivo submerso utilizando frascos agitados. A média dos valores obtidos nesses ensaios foi de 0,92 FPU/mL \pm 0,1, em 96 horas de cultivo, semelhante à atividade máxima FPase previsto pela Equação 1 (FPase previu = 0,98 FPU/mL). O valor máximo experimental da atividade de FPase, obtido com o meio de cultura otimizado, tamponado com o tampão biftalato de potássio foi 2 vezes mais elevado do que o título máximo 0,4 FPU/mL encontrado no meio de cultura padrão (BED 7 g/L, SAC 3 g/L, não tamponado) proposto na literatura (DELABONA *et. al.*, 2012).

3.4. Conclusões

A presença do tampão nos ensaios de cultivo submerso teve influência positiva sobre a atividade de FPase para os dois fungos filamentosos testados. Os projetos de experimentos realizados para estudar a influência estatística dos componentes de meio de cultura sobre o Δ pH (ao nível de confiança de 95 %) levaram a resultados conclusivos em ambos fungos filamentosos testados. A presença de farelo de soja, peptona e extrato de levedura aumentaram significativamente o pH, enquanto que a sacarose e celufloc diminuíram o pH durante o cultivo de *T. harzianum* P49P11 em frascos agitados. Farelo de soja e extrato de levedura aumentaram significativamente o pH, enquanto que bagaço de cana pré-tratado por explosão à vapor diminuiu o pH do meio de cultura para o cultivo

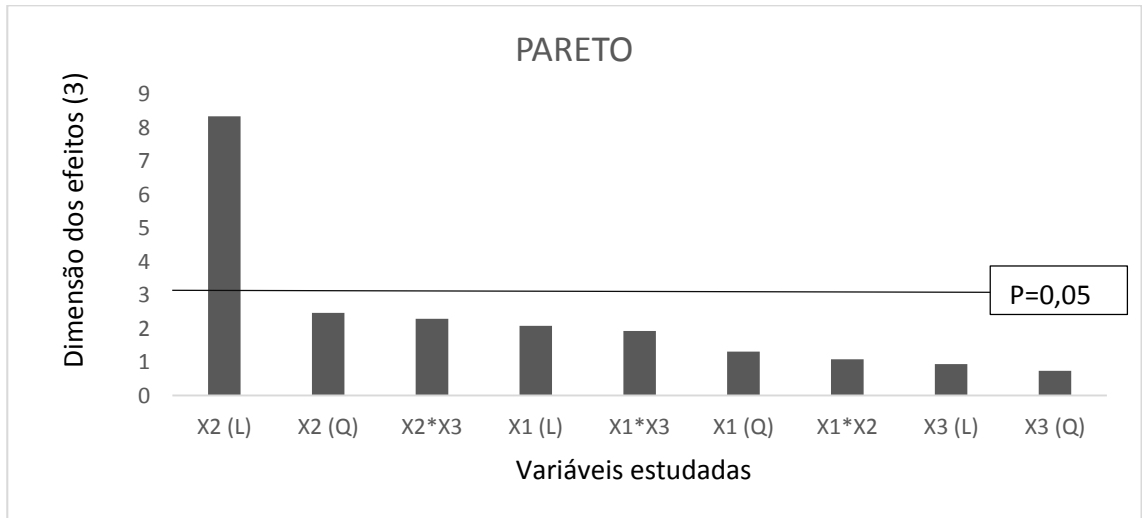
de *P. echinulatum* S1M29. O farelo de trigo não teve nenhum efeito sobre a variação do pH do meio de cultura para os fungos *P.echinulatum* S01M29 e *T. harzianum* P49P11. A aplicação do controle do pH pelo tampão biftalato de potássio em experimentos de cultivo submerso em frascos agitados foi eficiente em experimentos de otimização de meio de cultura para os fungos filamentosos *P. echinulatum* S01M29 e *Trichoderma harzianum* P49P11. A otimização do meio visando aumentar a atividade de FPase para *T. harzianum* P49P11 foi eficiente elevando a 2 vezes o título FPase. A presente técnica tem potencial para ser usada em outros fungos filamentosos celulolíticos.

ANEXO A: Detalhamento da técnica utilizada para a construção do modelo de otimização.

Será apresentada toda a esquematização dos cálculos para a análise da significância do modelo para 96 horas de cultivo para a atividade de FPase.

A Figura 3.1 apresenta o gráfico de Pareto obtido pelo programa *Statistica 7.0* ao analisar o resultado da atividade de FPase em 96 horas de cultivo para *T. harzianum* selvagem. Foi utilizado o erro puro obtido pela triplicata do ponto central para essas análises.

Figura 3.1: Gráfico de Pareto do DCCR 2 em 96 horas de cultivo para *T. harzianum* selvagem utilizando um limite de confiança de 95 % para a atividade de FPase em 96 horas de cultivo submerso; x_1 : sacarose; x_2 celulose; x_3 : farelo de trigo.



A Tabela 3.1 mostra a análise de variância para as condições estudadas no DCCR2, da análise dos resultados de FPase em 96 horas de cultivo, utilizado um limite de confiança de 95 %. Pelo Gráfico de Pareto (Figura 3.1) e pela Tabela 3.1 pode-se notar que apenas o efeito linear da celulose tem significância a 95 % de confiança, mas que os outros efeitos possuem p-valor em torno de 0,10, podendo ser significativos se diminuirmos o nível de confiança dessa análise.

Tabela 3.1.A: Efeitos e coeficientes do modelo a 95 % de confiança **antes** “*backward elimination*” para 96 horas de cultivo de *T. harzianum* selvagem para a atividade de FPase para o DCCR2. Em vermelho estão os fatores significativos utilizando limite de confiança de 95 %.

| Fator | Efeito | t(2) | P | Coeficiente |
|------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| Media | 0,52 | 17,97 | 0,00 | 0,52 |
| 1-SAC (L) | -0,06 | -2,08 | 0,12 | -0,03 |
| SAC (Q) | 0,01 | 1,31 | 0,77 | 0,00 |
| 2-CEL (L) | 0,26 | 8,34 | 0,00 | 0,13 |
| CEL (Q) | -0,08 | -2,47 | 0,08 | -0,04 |
| 3-FT (L) | -0,03 | 0,94 | 0,41 | 0,01 |
| FT (Q) | -0,02 | 0,74 | 0,50 | 0,01 |
| 1*2 | 0,05 | 1,08 | 0,35 | 0,02 |
| 1*3 | -0,08 | -1,93 | 0,14 | 0,04 |
| 2*3 | 0,09 | 2,29 | 0,10 | 0,47 |
| R-sqr | | | 92,88 % | |
| R-adj | | | 84,87 % | |

Desta forma, para determinar quais termos deveriam ser mantidos no modelo, foi usada a técnica de “*backward elimination*”.

A inclusão de termos em um modelo sempre aumenta o valor do coeficiente de determinação R^2 , mesmo que estes termos não tenham influência na variável dependente. Assim, quanto mais termos tem um modelo, melhor ele vai parecer se apenas avaliarmos o valor de R^2 . O valor de R^2 ajustado, no entanto, só aumenta se a melhora do modelo pela inclusão de um novo termo for maior do que esperada pelo acaso. Assim, a comparação do valor de R^2 ajustado é uma técnica que auxilia na escolha entre modelos com diferentes números de termos.

O melhor modelo foi determinado pela técnica de “*backward elimination*”. O resumo dos efeitos, da análise de variância, que serão utilizados no modelo e os coeficientes do mesmo estão mostrados na Tabela 3.2.

A técnica de “*backward elimination*” inicia-se analisando o gráfico de Pareto, onde percebe-se que os efeitos possuem uma ordem de grandeza, em módulo, de influência para cada variável. A técnica é basicamente a eliminação da variável menos significativa, de acordo com o gráfico de Pareto e análise do valor do R^2 -adj. Enquanto o valor do mesmo for subindo, continua-se a eliminação, parando somente quando o valor do R^2 -adj começar a cair. Desta forma, como pode ser observado na Tabela 3.1, o valor inicial do R^2 -adj é 84,87, quando todos os coeficientes são utilizados no modelo. O primeiro termo a ser eliminado do modelo foi relacionado ao efeito quadrático do farelo de trigo, neste caso o R^2 -adj aumentou. Em seguida, de acordo com o gráfico de PARETO apresentado na Figura 3.1, eliminou-se o termo do efeito linear, neste caso o R^2 -adj aumentou também. Seguindo a sequência, eliminou-se o termo de interação entre sacarose e celulose e o R^2 -adj diminuiu, por isso esse termo foi novamente incluído no modelo. O modelo a ser utilizado neste caso será o que apresentar o máximo do R^2 -adj no valor de 86,9 %. Este modelo está representado pela Equação 1, que foi construída segundo a Tabela 2.

Tabela 3.2.A: Efeitos e coeficientes do modelo a 95 % de confiança após “backward elimination” para 72 horas de cultivo de *T. harzianum* selvagem para a atividade de FPase para o DCCR utilizando farelo de trigo. Em vermelho estão os fatores significativos utilizando um limite de confiança de 95 %.

| Fator | Efeito | t(2) | P | Coeficiente |
|--------------|--------|---------|------|-------------|
| Media | 0,54 | 29,56 | 0,00 | 0,52 |
| 2-CEL (L) | 0,26 | 8,34 | 0,00 | 0,13 |
| 2-CEL (Q) | -0,08 | -2,76 | 0,07 | -0,03 |
| SAC (L) | -0,03 | 0,94 | 0,41 | -0,02 |
| SAC (Q) | 0,03 | 0,94 | 0,10 | 0,02 |
| 3*2 | 0,04 | 1,08 | 0,35 | 0,04 |
| 1*3 | -0,08 | -1,93 | 0,14 | -0,04 |
| 2*1 | 0,09 | 2,29 | 0,10 | 0,02 |
| R-sqr | | 92,22 % | | |
| R-Adj | | 86,9 % | | |

Os dados da tabela Anova, calculados pelo programa *Statistica*, foram utilizados para realizar os testes F que avaliam a significância do modelo proposto (NETO B.B., SCARMINIO I.S & BRUNS R.E, 2010).

O primeiro teste F realizado foi o da regressão. Os cálculos estão apresentados logo abaixo:

Primeiro Teste $F_{7,9\text{cal}}$ regressão: $0,043935/0,003363=13,07$ **$F_{7,9\text{tab}}= 2,50$**

O $F_{7,9\text{cal}}$ (F calculado), segundo o cálculo exposto acima, é 13,07, sendo maior que o $F_{7,9\text{tab}}$ 2,50 (F tabelado com 95 % de confiança), com isso percebe-se que o modelo é significativo.

O segundo teste F realizado foi o de falta de ajuste. Os cálculos estão apresentados logo abaixo:

Segundo Teste F $F_{7,2cal}$ falta de ajuste: $0,003901/0,001477= 2,64$ $F_{7,2 tab}= 9,34$

O $F_{7,2cal}$ (F calculado para falta de ajuste) foi de 2,64, sendo menor que o $F_{7,2tab}$ 9,34 (F tabelado com 95 % de confiança), com isso percebe-se que o modelo não apresenta evidência de falta de ajuste a 95 % de confiança.

A Equação 1, representa o modelo obtido para a atividade de FPase com 96 horas de cultivo para *T. harzianum* selvagem, que possui um R^2 ajustado de 86,9 %.

Equação 1:

$$FPase \text{ (FPU/mL)} = 0,52 + 0,13 * x_2 - 0,03 * x_2^2 - 0,02 * x_1 + 0,02 * x_1^2 + 0,04 * x_3 * x_2 - 0,04 * x_1 * x_3 + 0,02 * x_2 * x_1 = 0,93$$

A resolução do modelo de forma a maximizar a atividade de FPase foi obtida pelo auxílio da sub-rotina SOLVER do Excel. A Tabela 3 mostra a composição da atividade ótima de FPase, decodificada e codificadas, do meio de cultura em 96 horas de cultivo para *T. harzianum* selvagem. As concentrações ótimas ditadas pelo modelo foram validadas em cultivo submerso para esse fungo como já discutido anteriormente.

Tabela 3.3.A: Composição codificada e decodificada, otimizada com o auxílio da sub-rotina SOLVER do Excel, da Equação 5. DCCR utilizando farelo de trigo.

| Variáveis | SAC (x1) | CEL (x2) | FT (x3) |
|---------------------------|----------|----------|---------|
| Codificado | -1,68 | 1,68 | 1,68 |
| Decodificado (g/L) | 0,00 | 20,00 | 15,00 |

CAPÍTULO 4

4. OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM MEIO ÁGAR-CELULOSE PARA SELEÇÃO DE MUTANTES *T. HARZIANUM* PRODUTORES DE GLICOHIDROLASES DESREPRIMIDOS PARA O GENE DAS CELULASES

RESUMO

Os fungos filamentosos são os candidatos mais vantajosos para a produção de enzimas celulolíticas, pois eles produzem o coquetel enzimático completo para a hidrólise da biomassa lignocelulósica, devido a essa biomassa participar de sua cadeia alimentar. A utilização de melhoramentos genéticos dos microrganismos produtores destas enzimas é uma alternativa para aumentar a produtividade do processo. Uma das características mais desejadas de seleção destes microrganismos é a produção de celulases mesmo em ambiente repressivo. As moléculas 2-deoxi-D-glicose e glicose realizam a repressão dos genes envolvidos na produção das glicohidrolases, sendo que a primeira não é utilizada no metabolismo do fungo. No entanto, o custo da 2-deoxi-D-glicose é em torno de quatrocentos e cinquenta (Sigma 650,00 R\$/g) vezes superior ao custo da glicose (1,34 R\$/g). Neste sentido, esse trabalho se preocupou em comparar a eficiência da repressão catabólica destas duas moléculas bem como a utilização de diferentes proporções das mesmas com intuito de encontrar uma proporção ótima e de menor custo destas moléculas, para ser utilizada na seleção em meio sólido. A seleção dos mutantes em meio sólido é uma etapa muito importante para a eficiência do melhoramento genético, sendo que, se o método de seleção for falho, o trabalho pode se comprometer inteiramente. Neste sentido foi demonstrado que a concentração de 0,1 % de glicose pode ser utilizada para selecionar mutantes em tempos de até quatro dias de crescimento. Foi verificado que a substituição da 2-deoxi-D-glicose por glicose pode ser realizada, e confere resultados melhores além de diminuir o custo deste processo. Este trabalho contribui com uma nova formulação de meio sólido, específico para a linhagem

trabalhada e que pode facilitar o processo de melhoramento genético desta linhagem ou inspirar outros trabalhos que se utilizam de outras linhagens dentro da mesma linha de pesquisa.

4.1. Introdução

O método mais usado para seleção de mutantes hipercelulolíticos de *T. reesei* foi desenvolvido por Montenecourt e Eveleigh (1977), utilizando placas de Petri com celulose intumescida (swollen cellulose), inibidor de crescimento de colônias e repressor catabólico, sendo realizado o exame de zonas claras de degradação da celulose ao redor das colônias. Assim, a seleção dos mutantes hiperprodutores é efetuada com base no tamanho dos halos de degradação da celulose após incubação por alguns dias (CAMASSOLA & DILLON, 2010).

A incorporação de corantes como vermelho congo, solução de iodo de coloração de Gram (KASAN, *et. al.*, 2008) e AZCL-HE-celulose ou ciclo de incubação a 50 °C para incremento da zona de clareamento (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b) são medidas auxiliares para melhor visualização dos halos de hidrólise da celulose ao redor das colônias formadas. Porém, os resultados de seleção usando esses tipos de corantes têm mostrado pouco sucesso pela literatura (KASAN, *et. al.*, 2008), entretanto foi verificado que esses métodos de coloração não são eficientes para o microrganismo trabalhado nesta tese (dados não apresentados), sendo necessário estudar um método de seleção específico para essa cepa.

A definição de um método de seleção eficiente para fungos filamentosos hipercelulolíticos continua sendo um desafio (MONTENECOURT e EVELEIGH *et. al.*, 1977 b; KASAN *et. al.*, 2008; DILLON *et. al.*, 2012).

Uma forma de seleção dos potenciais mutantes é a observação do tamanho e velocidade de aparecimento de halos de hidrólise ao redor das colônias em meio sólido com a presença de repressor catabólico, como glicose e 2-deoxi-D-glicose e/ou pelo consumo de celulose presente no meio quando a mesma estiver em excesso (ADSUL *et. al.*, 2007; CAMASSOLA e DILLON, 2010). A molécula de 2-deoxi-D-glicose é um análogo da molécula de glicose, por isso faz o mesmo papel da glicose, promovendo a

repressão do gene que codifica a produção de celulases. No entanto não é metabolizada para a produção de ATP pelos fungos filamentosos, como a molécula de glicose. Um meio de seleção apropriado, com as concentrações adequadas dos reagentes, pode facilitar o trabalho na parte de seleção, principalmente no caso de mutações clássicas, onde há grande quantidade de cepas a serem selecionadas, o que pode tornar o processo muito trabalhoso.

Em *Trichoderma sp.* o mecanismo de repressão catabólica é mediado pelo fator de transcrição CRE 1 que age pela união ao sitio promotor dos genes que codificam hidrolases como *cbh 1* e *xyn 1* regulando a expressão de aproximadamente 207 genes, sendo que 118 são aparentemente reprimidos por CRE1 (PORTNOY, MARGEOT *et. al.*, 2011). As pesquisas indicam que a repressão catabólica age preferencialmente à entrada de 20 açúcares na célula, sendo que a maioria dos genes reprimidos pelo CRE1 codificam permeases de membranas. Modificações genéticas nestes genes podem promover o seu não funcionamento, o que gera um organismo desreprimido.

Existem outros fatores de transcrição também envolvidos na modulação da síntese de hidrolases, por exemplo o repressor Ace 1 (ativador de celulases 1), que regula negativamente a expressão das principais (hemi) celulases, mesmo na presença de indutores como sofrorose e celulose. O mecanismo inibitório consiste na união à região promotora do gene *cbh 1* (ARO, SALOHEIMO *et. al.*, 2001). Em contrapartida, Ace 2 (ativador de celulases 2) funciona como um regulador positivo, mediante a união ao elemento ativador de xilana XAE, no promotor do gene *xyn2* (ARO, PAKULA *et. al.*, 2005).

É importante obter mutantes onde a proteína repressora catabólica da produção de celulases, tenha dificuldade em executar a sua função. Essa proteína é responsável pela regulação negativa a nível transcricional e impede o fungo de sintetizar uma quantidade excessiva de celulases em circunstâncias que há fonte de carbono facilmente assimilável, basicamente ele consegue regular o seu balanço energético com a quantidade de energia disponível no meio (MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977; SUTO & TOMITA, 2001; LYND *et. al.*, 2002; DILLON *et. al.*, 2011).

Este trabalho propõe-se forçar a seleção dos mutantes desreprimidos, aumentando a concentração de glicose, 2-deoxi-D-glicose e misturas das duas, afim de

determinar o melhor meio sólido que permita uma seleção visual do sistema de produção das glicohidrolases, mesmo em ambiente repressivo, selecionando as que mais se destacarem dentro deste sistema. A seleção de um meio sólido confiável, que nos permita diferenciar os mutantes utilizados, diminuiria o custo do processo de produção em mão de obra e equipamentos, comparado com o uso de cultivos submersos ou meios sólidos não adequados (MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977; SUTO & TOMITA, 2001; LYND *et. al.*, 2002; DILLON *et. al.*, 2011; COSTA, D. A, 2014).

4.2. Metodologia

4.2.1. Microrganismos

O fungo empregado neste trabalho é o *Trichoderma harzianum* P49P11 e as cepas 1PCE10, 3PCE6 e 2PCE43 que são variações do *Trichoderma harzianum* P49P11 (Selvagem) que foram modificadas por mutação clássica utilizando o agente mutagênico Etil Metil Sulfonato durante o presente trabalho (COSTA *et. al.*, 2014). Todas essas cepas são armazenadas em geladeira e em PDA e repicadas periodicamente a cada 2 meses ou esporuladas e mantidas em freezer em glicerol 30 % a -80 °C.

4.2.2. Meio ágar-celulose e metodologia de velocidade de formação de halos de hidrólise em celulose

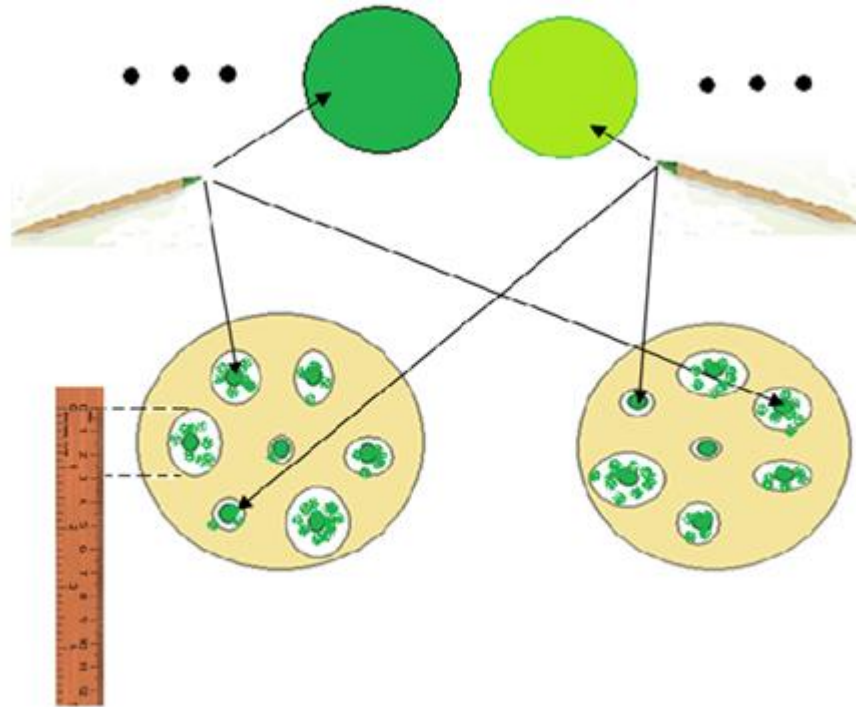
A celulose utilizada no meio ágar-celulose é a *swollen celufloc*, celulose que possui uma homogeneização mais eficiente em solução comparada com a Celufloc que não passou por esta etapa. O preparo da *swollen* foi realizado da seguinte maneira: 4 g de Celufloc 200 (Celuflok Industrial e Comercial de Celulose Ltda., Brasil) foram solubilizadas em 200 mL de água destilada, juntamente com 20 g de bolinhas de vidro e mantidas em *shaker* a 29 °C e 200 rpm por 7 dias (CAMASSOLA & DILLON, 2010).

O meio ágar-celulose foi formulado segundo estudos de Camassola e Dillon (2010) adaptado, tendo em sua composição 1 % (p/v) *Swollen* celulose Celufloc 200 (Celuflok Industrial e Comercial de Celulose Ltda., Brasil), 0,1 % (p/v) extrato de

levedura (Sigma-Aldrich), 0,1 % (p/v) sacarose (Alamar Tecno Científica Ltda., Brasil), 10 % (v/v) solução de sais minerais 20 x concentrada, 0,1 % (v/v) Triton X-100 e 2 % (p/v) de Agar. Este meio base citado acima foi utilizado para desenvolver a busca da concentração ótima de glicose e 2-deoxi-D-glicose alcançada por esse trabalho. Depois de autoclavado, 40 mL deste meio foi vertido em placas de Petri de tamanho maior que a padrão (40 cm de diâmetro). Neste meio foram inoculados pontos de inserção de esporos para cada mutante utilizado, juntamente com a cepa selvagem (Figura 4.1). As placas foram mantidas em estufa a 29 °C e foram medidos o diâmetro do halo de hidrólise da celulose, provocado pela produção das glicohidrolases pelos fungos aqui estudados. O experimento foi feito em duplicata e as posições de cada cepa na placa foram colocadas aleatoriamente (Figura 4.1).

A Figura 4.1 ilustra o experimento, onde os pontos verdes representam as diferentes cepas utilizadas no experimento, e a região clara em volta das colônias ilustra o halo de degradação da celulose, sendo a celulose exemplificada na cor bege.

Figura 4.1: Ilustração do experimento da medida da velocidade de formação do halo de degradação da celulose e ilustração das zonas de degradação de celulose seguido da medição do halo e confecção da curva.



O diâmetro de formação do halo de degradação da celulose foi medido a cada 24 horas. Através das medidas dos diâmetros dos halos de hidrólise (em centímetro), ao longo do tempo, foram geradas curvas de crescimento de diâmetro do halo.

À medida que a celulose vai sendo degradada no meio sólido de seleção percebe-se que ocorre um aumento na transparência da zona de degradação, o aumento da transparência da placa foi comparado entre as diferentes cepas e esse foi um critério visual de seleção também.

4.2.3. Comparação de diferentes concentrações de glicose e 2-deoxi-D-glicose

As placas de ágar-celulose descritas acima foram utilizadas para fazer este estudo. Em ambiente estéril foram adicionados 2 mL de uma solução de 2-deoxi-D-glicose e glicose, testando as concentrações de 0 %, 2 %, 4 %, 6 % e 8 % destes reagentes no meio de seleção. Esta solução foi espalhada e seca em presença de luz UV em

ambiente estéril, utilizando uma câmara de fluxo laminar. Neste caso, as placas apresentam uma composição não homogênea. O objetivo deste experimento foi determinar a melhor concentração destes reagentes para promover a repressão catabólica das celulas secretadas pelas cepas testadas.

A utilização de apenas 2 mL dos reagentes repressores, sendo o mesmo espalhado em cima da placa, faz com que a superfície da placa contenha uma maior concentração do mesmo e com isso induza maior repressão sem gastar demasiados reagentes. No entanto, verifica-se uma concentração desigual destes reagentes de forma transversal no meio sólido.

4.2.4. Verificação do aumento da concentração de glicose sem e com a adição de uma quantidade mínima de 2-deoxi-D-glicose

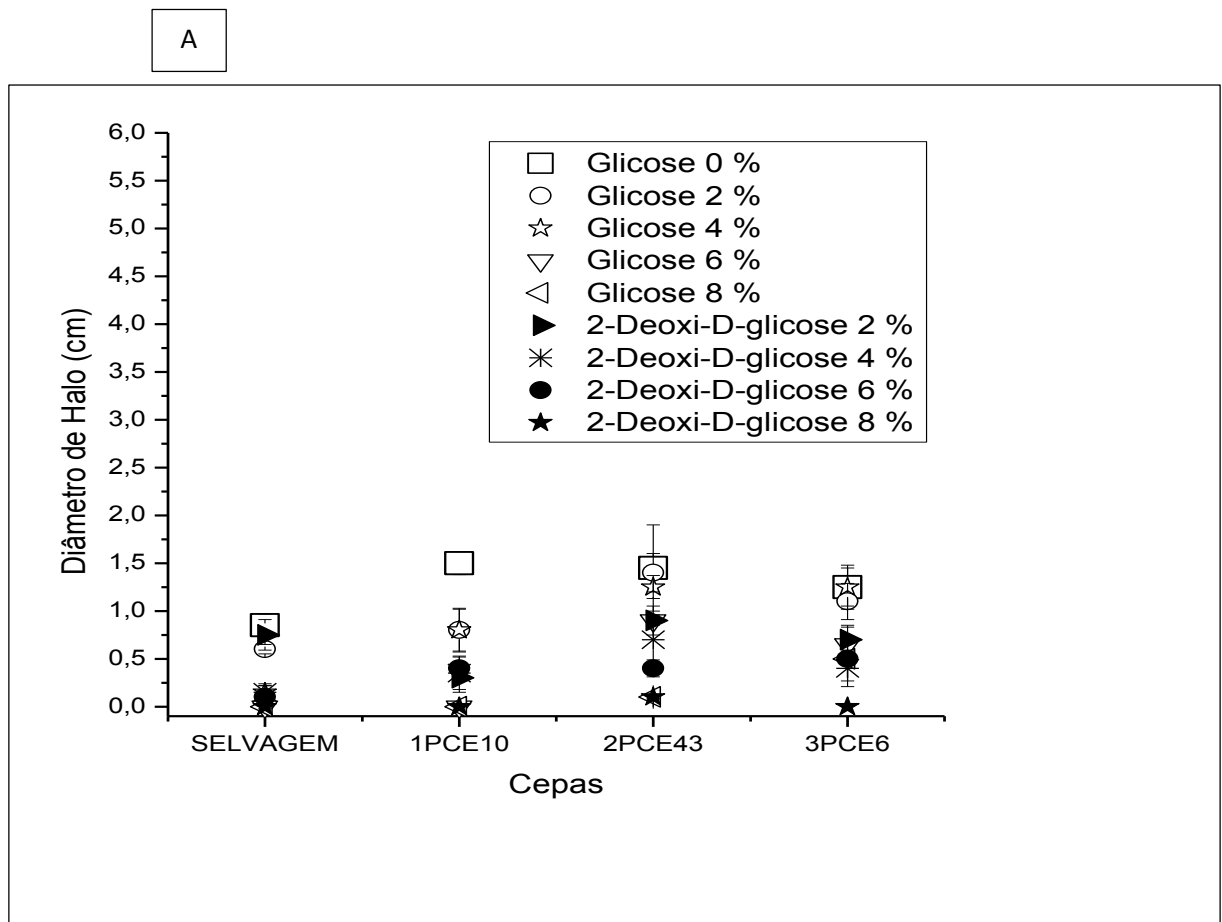
Neste caso, optou-se por estudar maiores concentrações de glicose para acessar um meio mais repressor devido ao baixo custo da mesma. Para isso, foram preparadas novas placas de ágar-celulose, com a composição base semelhante ao explicado anteriormente e adicionadas nas mesmas depois de autoclavadas, ainda no estado líquido em ambiente estéril, uma quantidade de glicose 40 % que fosse possível estudar várias concentrações de glicose (0,1 %; 0,5 %; 1 %; 2 %; 4 %; 6 %; 8 %; 16 %). Neste caso, toda a placa apresenta uma composição homogênea de glicose. Foram medidos os crescimentos dos halos nestes meios com diferentes concentrações de glicose, distribuídos de uma forma homogênea e também acrescidos com 0,5 mL de uma solução 8 % de 2-deoxi-D-glicose. A hipótese da necessidade da 2-deoxi-D-glicose ainda não foi descartada, porém em conjunto com a molécula de glicose, visando uma melhor pressão de seleção para os mutantes. O objetivo deste experimento foi determinar a concentração máxima de glicose que se pode utilizar para exercer a melhor seleção possível das diferentes cepas aqui utilizadas como exemplos para o desenvolvimento desta metodologia.

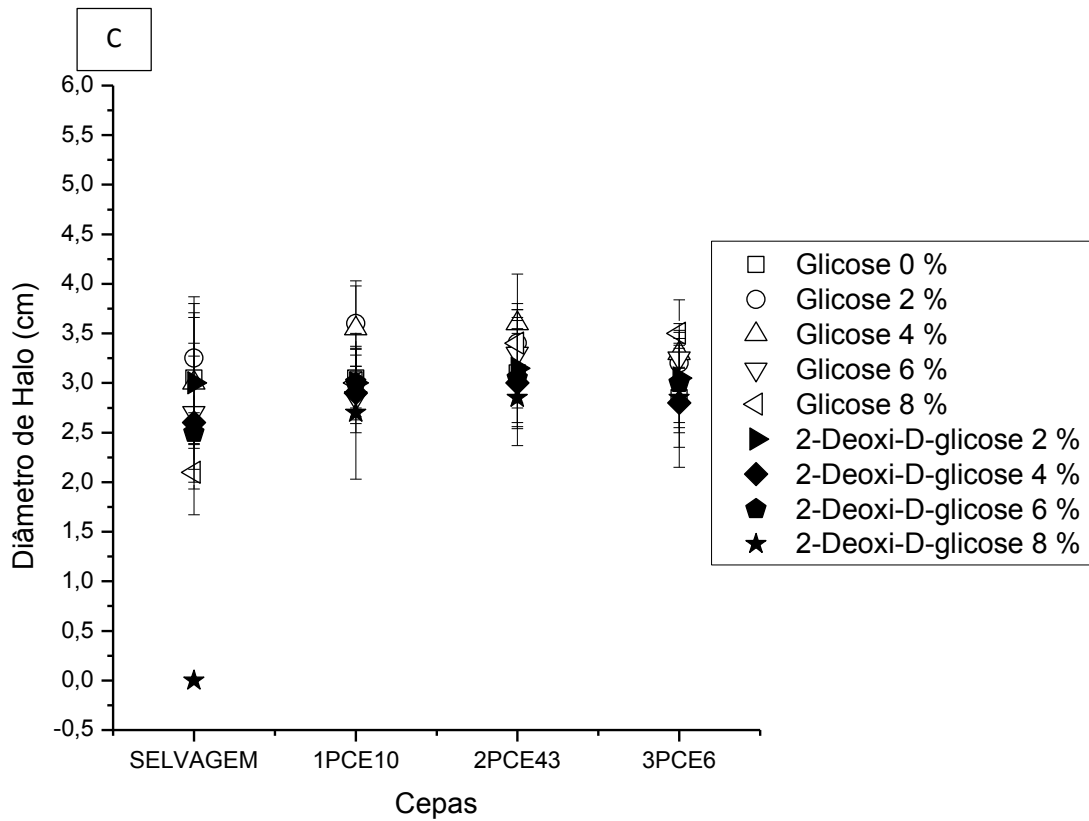
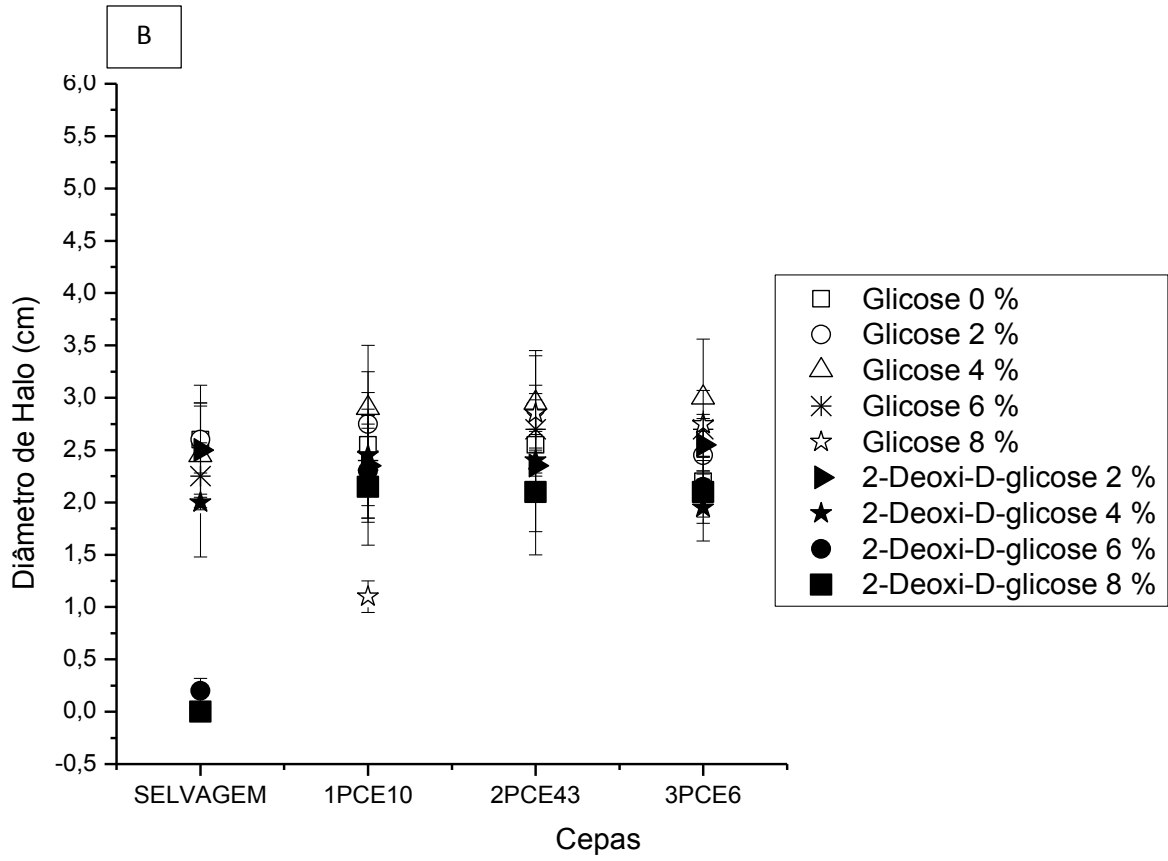
4.3. Resultados

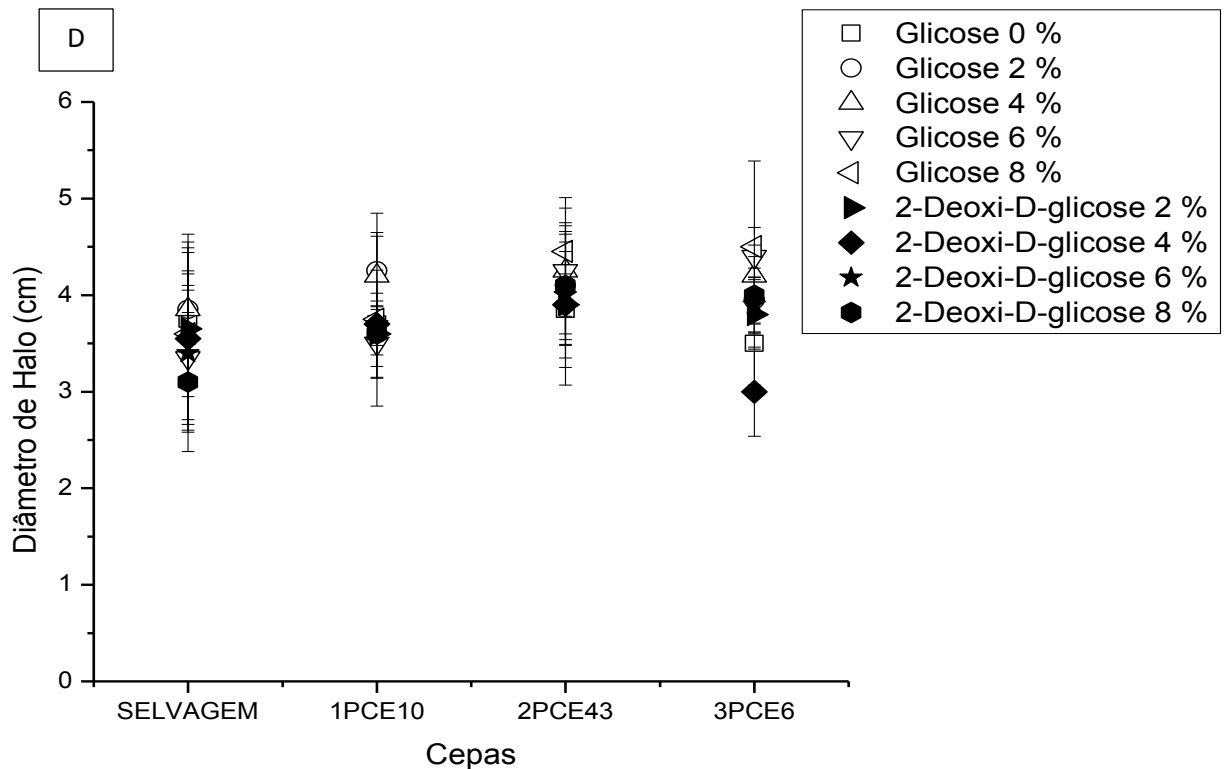
4.3.1. Comparação de diferentes concentrações de glicose e 2-deoxi-D-glicose

Percebe-se que a cepa selvagem é mais reprimida que os demais mutantes, sendo a única cepa a demorar mais de quatro dias para começar a formar halo de degradação em presença de 2 mL de uma solução de 8 % de 2-deoxi-D-glicose, enquanto para os demais mutantes o aparecimento do halo já ocorreu no quarto dia de crescimento (Figura 4.2 B). Parece que os mutantes 2PCE43 e 3PCE6 são mais desreprimidos que os demais (Selvagem e 1PCE10) apresentando um pequeno halo já no terceiro dia de crescimento em presença de 2 mL de uma solução 2 e 4 % de glicose (Figura 4.2 A). Percebe-se que a glicose é realmente um repressor catabólico da síntese de celulases, onde podemos observar que para todas as cepas testadas houve retardamento da formação do halo à medida que foi aumentando a concentração de glicose e do seu análogo 2-deoxi-D-glicose (Figuras 4.2). Observa-se que no tempo de 11 dias de crescimento a diferenciação do tamanho do diâmetro do halo é pouco visível para as diferentes concentrações de glicose e 2-deoxi-D-glicose testadas. Neste sentido, torna-se clara a importância das medições ao longo dos primeiros dias de surgimento de halos de hidrólise (Figura 4.2), onde se observa quais cepas possuem maiores velocidades de produção enzimática em ambiente repressivo (LEHNINGER *et. al.*, 2006; DILLON *et. al.*, 2012). Percebe-se que a partir do quarto dia de incubação não há tanta diferenciação de tamanhos de halos entre as cepas, nas concentrações de repressores testadas.

Figura 4.2: Medida do diâmetro do halo em centímetros em meio ágar-celulose para as diferentes cepas. **A)** Três dias de incubação a 29 °C. **B)** Quatro dias de incubação a 29 °C. **C)** Cinco dias de incubação a 29 °C. **D)** Seis dias de incubação a 29 °C.







No quarto dia de crescimento foi verificado que a concentração de 8 % de glicose foi adequada para diferenciar a cepa selvagem das mutantes, sendo que a selvagem não apresentou halo neste tempo, a 1PCE10 formou halo de 1 cm e as 2PCE43 e 3PCE6 apresentaram halos de 3 cm (Figura 4.2 B). A seleção utilizando um meio acrescido de 2 mL de uma solução de 8 % de glicose se apresentou ideal como método de seleção de fungos mutantes hipercelulolíticos. Os fungos podem ser selecionados em placa utilizando ágar-celulose acrescido de 2 mL de uma solução de 8 % de glicose, pois a glicose obteve o melhor resultado quando comparada com a 2-deoxi-D-glicose (Figura 4.2). Este resultado foi importante pois provou que a utilização de glicose no lugar de 2-deoxi-D-glicose pode ser realizada.

É interessante que a glicose permitiu nítida diferenciação na formação dos halos nos primeiros dias de incubação, sendo o menor halo da cepa selvagem, seguido de 1PCE10 e depois 3PCE6 e 2PCE43 (Figura 4.2). Este fato sugere que a molécula de glicose é uma molécula que reprime mais fortemente que a 2-deoxi-D-glicose (Figura 4.2), que é concreto pois o repressor catabólico natural é a molécula de glicose, que por sua vez deve apresentar encaixe perfeito com a proteína repressora. Já a 2-deoxi-D-

glicose é a molécula de glicose modificada na posição 2 de sua estrutura, tendo o grupo α -hidroxila substituído por hidrogênio. Esta modificação pode ter afetado na afinidade do encaixe da molécula repressora e com isso a 2-deoxi-D-glicose pode ter um encaixe mais fraco, necessitando de maiores concentrações para diferenciar microrganismos menos reprimidos. Porém a utilização de maiores concentrações desta molécula se torna inviável, devido ao alto custo da mesma (LEHNINGER *et. al.*, 2006).

4.3.2. Verificação do aumento da concentração de glicose no meio sólido de cultura e adição de uma quantidade mínima de 2-deoxi-D-glicose

O objetivo deste tópico é avaliar um meio mais repressor estudando combinações de 2-deoxi-D-glicose com glicose e concentrações superiores de glicose das testadas no experimento anterior.

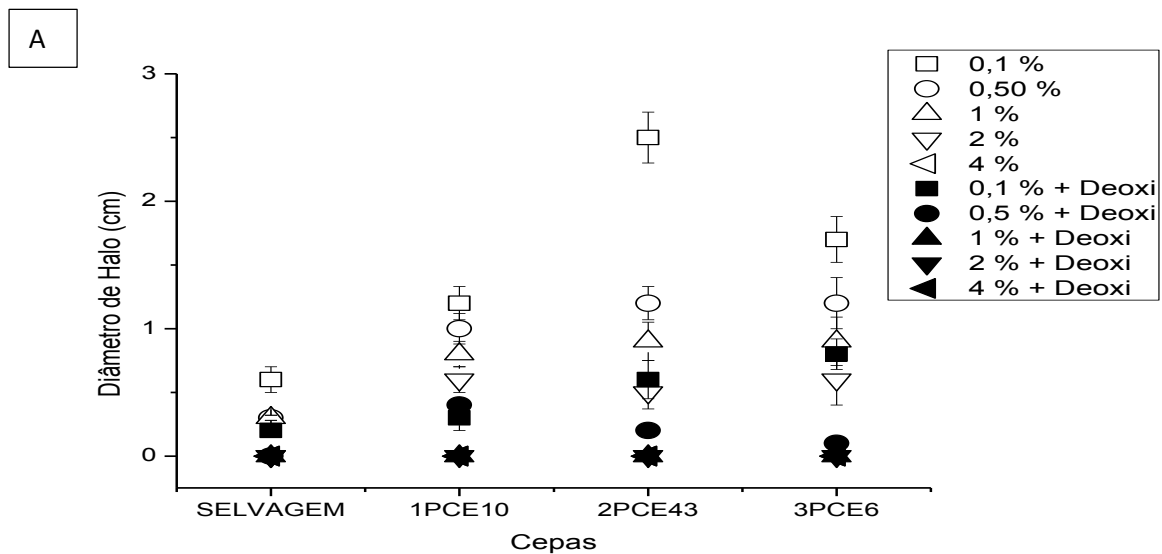
Como a molécula de 2-deoxi-D-glicose pôde ser substituída com êxito pela molécula de glicose, que apresenta um custo mais acessível para estudar concentrações superiores, foi realizado um outro experimento, do mesmo modo que o anterior porém, utilizando concentrações fixas de glicose no meio sólido, sendo a mesma solidificada de forma homogênea em todo o meio. Neste caso, não houve problemas de homogeneização da solução de glicose quando ela é acrescida depois do ágar seco, pois a concentração final de glicose agora é calculada considerando o volume total do meio na placa. Então testou-se o crescimento do tamanho do halo, testando as mesmas cepas em ágar-celulose verificando as concentrações de 0,1 %; 0,5 %; 1 %; 2 %; 4 %; 6 %; 8 %; 16 % de glicose. Foram testadas essas mesmas concentrações acrescida de 0,5 mL de uma solução de 8 % de 2-deoxi-D-glicose, para testar a combinação desta com a glicose, afim de afinar ainda mais o acerto em uma seleção. O resultado deste experimento está apresentado na Figura 4.3.

Comparando esse resultado com o resultado anterior podemos dizer que este experimento com certeza aumentou o estresse causado pelos repressores, podendo-se observar os primeiros sinais de halos somente no quarto dia de crescimento enquanto que no experimento anterior observava-se sinais de halos já no terceiro dia (Figura 4.3).

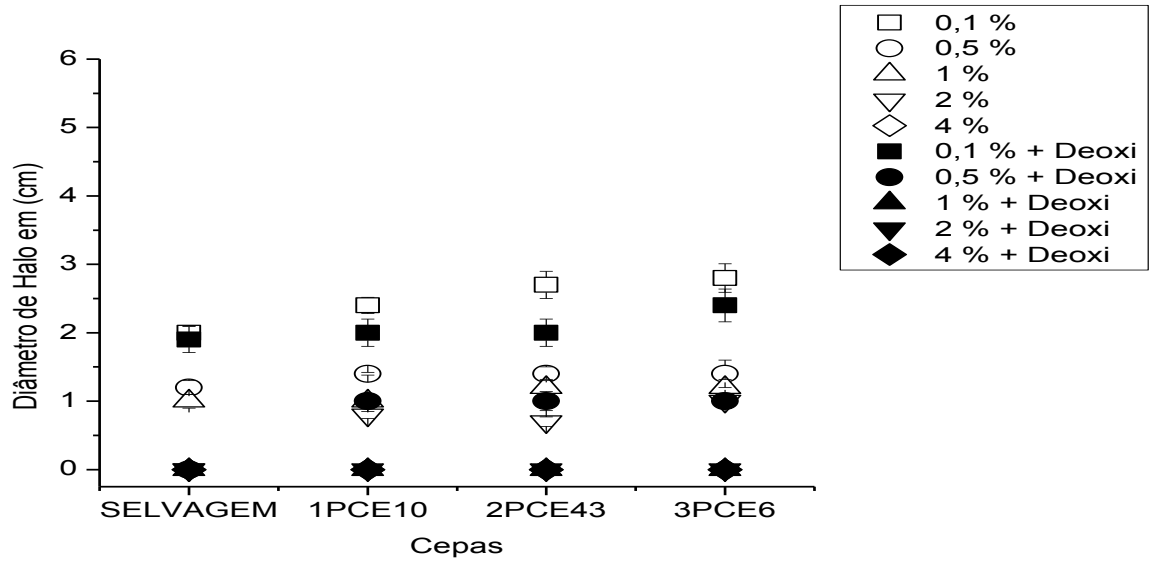
Observe que o acréscimo de 0,5 mL de uma solução de 8 % de 2-deoxi-D-glicose provoca um estresse maior para a formação do halo. Porém, não é tão necessária para a seleção deste microrganismo, podendo o laboratório optar pelo menor custo ou um auxiliar potente para a seleção (Figura 4.3).

A concentração de 0,1 % no quarto dia de crescimento apresentou melhor resultado pois conseguiu separar as quatro cepas, sendo que nas outras concentrações estudadas não foi visualizado este resultado (Figura 4.3 A) (Selvagem 0,5 cm; 1PCE10 1,2 cm; 2 PCE43 2,5 cm; 3PCE6 2 cm).

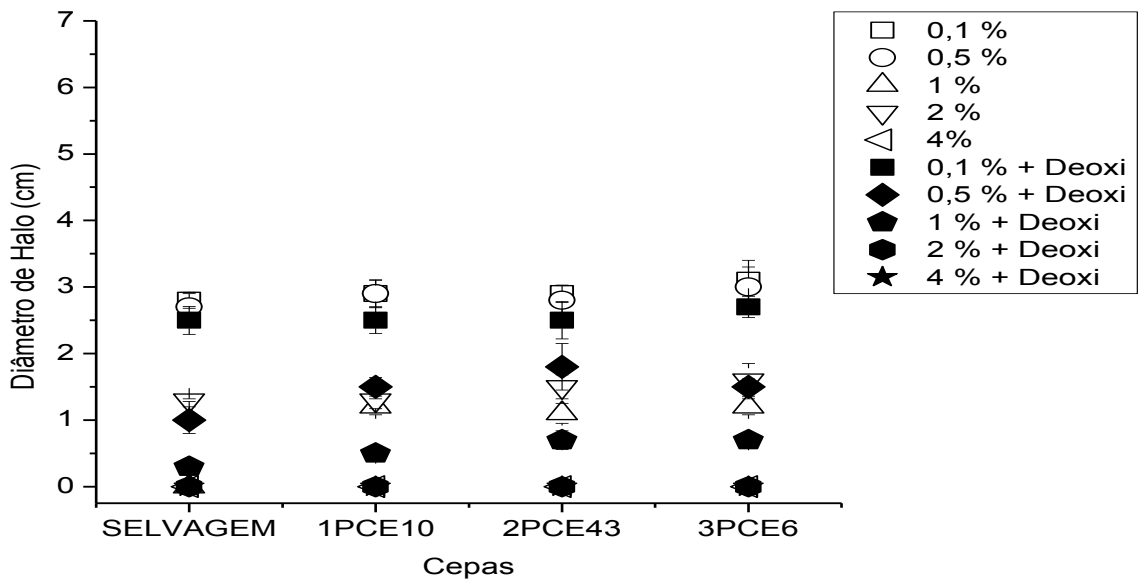
Figura 4.3: Medida do diâmetro do halo em centímetros em meio ágar-celulose para as diferentes cepas. **A)** Quatro dias de incubação a 29 °C. **B)** Cinco dias de incubação a 29 °C. **C)** Seis dias de incubação a 29 °C. **D)** Sete dias de incubação a 29 °C. **E)** Dez dias de incubação a 29 °C. **F)** Onze dias de incubação a 29 °C.

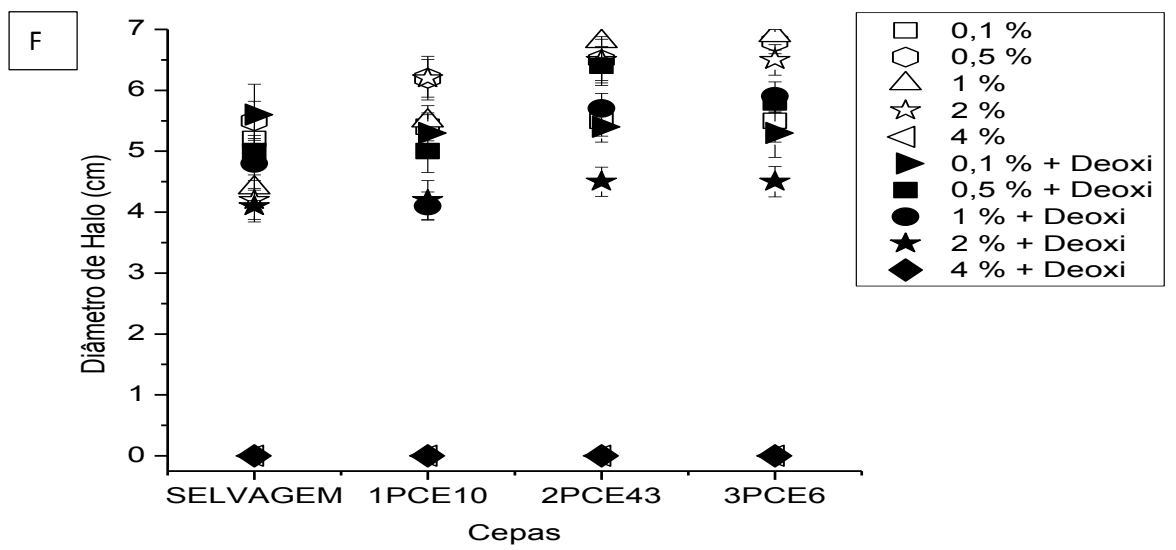
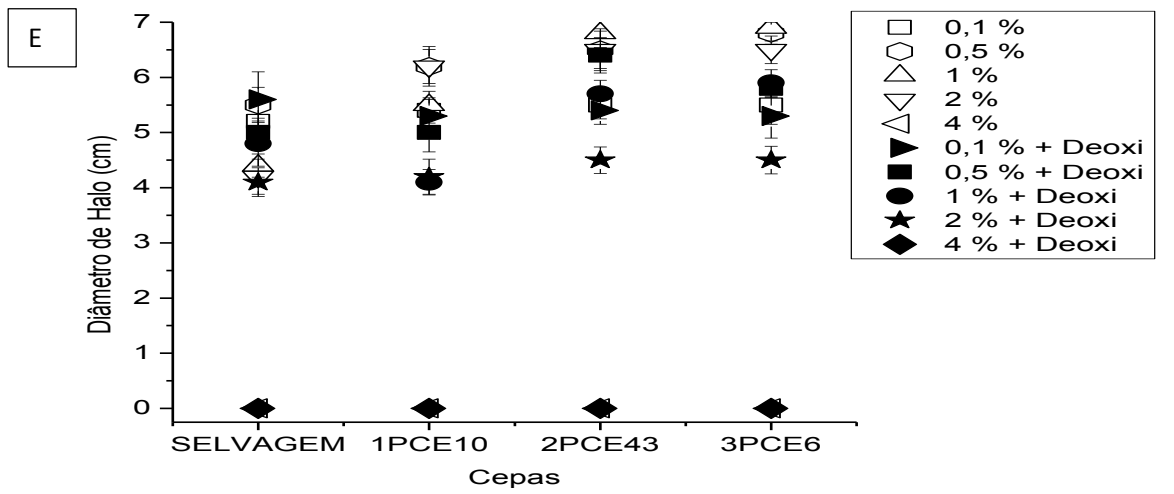
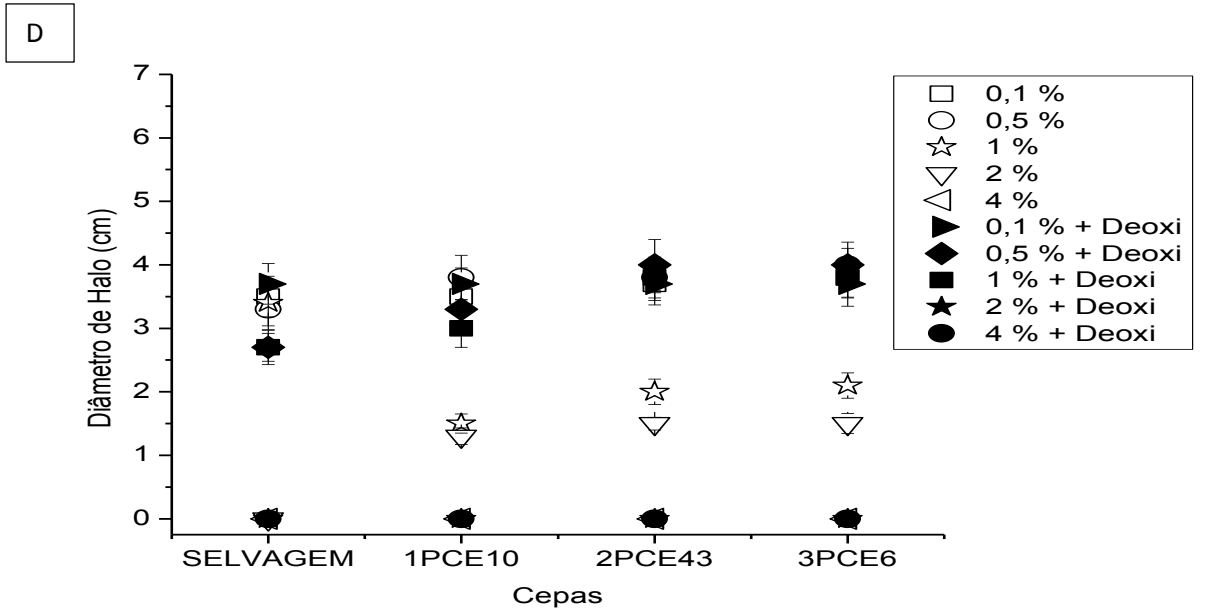


B



C





Para ilustrar a visualização dos halos de degradação em celulose, a Figura 4.4 demonstra algumas fotos deste experimento. A primeira placa exemplifica o crescimento do fungo em PDA, nesta foto fica clara a alta produção de esporos do fungo selvagem comparada com suas variáveis mutantes, mostrando também que este meio não pode ser observado nada em relação a produção de glicohidrolases pelas cepas. Esta placa também mostra as diferenças das cores das colônias, que é devida a alta concentração de esporos de pigmentação verde escura. Demais sequências de placas representam a exemplificação do crescimento do halo em placa de ágar-celulose. Podemos observar que os halos de hidrólise de celulose para as cepas 3PCE6 e 2PCE43 sempre são maiores que os halos das cepas 1PCE10 e a selvagem que apresentou o pior desempenho para esse experimento (Figura 4.4).

Figura 4.4: **A)** selvagem; **B)** 1PCE10; **C)** 2PCE43; **D)** 3PCE6. **1)** Crescimento das cepas em PDA, nesta foto fica claro a alta produção de esporos do fungo selvagem comparada com suas variáveis mutantes. **2)** Halo em ágar-celulose tempo de 5 dias utilizando 2 mL de uma solução de glicose de concentração 8 %. **3)** Halo em ágar-celulose tempo de 6 dias utilizando 2 mL de uma solução de glicose de concentração 8 %. **4)** Halo em ágar-celulose tempo de 11 dias utilizando 2 mL de uma solução de glicose de concentração 8 %.



(1)

(2)

(3)

(4)

Neste sentido foi verificado que de fato as moléculas de glicose e 2-deoxi-D-glicose são repressores catabólicos da produção das celulases, e que a segunda pode ser substituída pela primeira sem causar prejuízos ao processo, sendo até mais potente. Isso não é um fato raro pois a molécula de glicose é o repressor catabólico naturalmente

encontrado na natureza, e por isso deve apresentar um encaixe mais perfeito no sistema de repressão se comparada com a 2-deoxi-D-glicose, molécula sintética não natural.

4.4. Conclusão

O melhor meio sólido para se selecionar as cepas com diferentes potenciais de repressão no gene que controla a expressão e secreção das celulases, na presença de glicose, foi utilizando 0,1 % de glicose, fazendo observações de até quatro dias para a linhagem trabalhada. Este valor é específico para o fungo trabalhado sendo que para cada linhagem de fungo filamentoso esse valor pode ser diferente, sendo sempre necessário fazer um estudo da melhor concentração para cada organismo que se vai trabalhar.

CAPÍTULO 5

5. NOVO MÉTODO PARA ESTIMAR A PRODUÇÃO DE GLICOHIDROLASES RESPONSÁVEIS POR HIDRÓLISAR O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

RESUMO

Os métodos de avaliação da produção das glicohidrolases atualmente utilizados não são totalmente direcionados para o objetivo final do processo, que é a hidrólise de materiais lignocelulósicos, sendo que a maioria dos trabalhos usa a atividade em papel de filtro (FPase) como medida da produção de enzimas celulolíticas. Para um melhor direcionamento das análises ao processo real, este capítulo tem como objetivo propor o uso de uma mini hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como maneira de estimar a atividade do extrato enzimático. Justifica-se esta prática pelas grandes diferenças das características físicas (arquitetura da estrutura do material, porosidade, distribuição de tamanho de poros, capacidade de absorção de água, etc) e da composição química (diferenças marcantes no teor de lignina, hemicelulose e celulose) entre o papel de filtro e os diversos materiais lignocelulósicos pré-tratados. Estas diferenças têm influência no desempenho do coquetel enzimático durante a hidrólise enzimática. Determinou-se o melhor tempo de hidrólise de bagaço em mini-escala para o extrato fúngico empregado (2h), e comparou-se essa atividade com atividades frequentemente utilizadas pela literatura. A técnica pode ser aplicada ao bagaço submetido a diferentes pré-tratamentos, e apresentou reprodutibilidade em uma escala cem vezes superior, permitindo a estimativa dos resultados para escalas industriais.

5.1. Introdução

Desde muitos anos, o método reconhecido pela I.U.P.A.C. para a quantificação da atividade das celulasas é o publicado por Ghose, (1987), onde é utilizado o papel de filtro como substrato (FPase). Porém, para os trabalhos envolvendo etanol de segunda geração, utilizando resíduos lignocelulósicos, neste caso o bagaço de cana-de-açúcar, a utilização da atividade de FPase para a verificação do potencial de hidrólise dos extratos enzimáticos tornou-se incompleta. O papel de filtro difere bastante em termos estruturais e químico dos materiais lignocelulósicos, podendo gerar desta maneira, dados incompletos e de baixa representatividade do potencial de hidrólise de um dado extrato enzimático. Além disso, o método de FPase conduz a uma identificação limitada das enzimas individuais e sua interação com outras enzimas durante a evolução com o tempo da hidrólise. Estas limitações do método representam um enorme gargalo para a concepção de coquetéis enzimáticos que são capazes de proporcionar uma hidrólise enzimática mais eficiente de substratos lignocelulósicos (SÁNCHEZ, 1983; SILVEIRA *et. al.*, 2014).

A principal importância do método proposto é dar um melhor direcionamento das pesquisas envolvendo produção de enzimas por fungos em cultivo submerso, efetuando a avaliação do potencial de hidrólise do complexo enzimático produzido com o substrato real a ser utilizado no processo de produção de etanol de segunda geração.

5.2. Metodologia

5.2.1. Microrganismos

As cepas 1PCE10, 3PCE6 e 2PCE43 são variações do *Trichoderma harzianum* P49P11 modificadas por mutação clássica por Costa, *et. al.*, (2014) utilizando o agente mutagênico Etil Metil Sulfonato. Todas essas cepas são armazenadas em geladeira e em PDA e repicadas periodicamente a cada 2 meses ou esporuladas e mantidas em freezer em glicerol 30 % a -80 °C.

5.2.2. Cultivo Submerso

Para todos os cultivos realizados neste trabalho o fungo foi repicado em PDA e incubado em estufa a 29 °C por sete dias, para o desenvolvimento dos esporos. Em seguida, 20 mL da solução de *Tween 80* 0,1 %, estéril, foi utilizada para a captação dos esporos na placa de Petri, e 20 mL dessa suspensão de esporos foi inoculada em 200 mL de meio para o crescimento das hifas (Celufloc 200 10 g/L, glicose 10 g/L, peptona 1 g/L, 10 % de solução salina 20 x, 0,1 % de *Tween 80*). Os inóculos foram mantidos em estufas rotativas a 29 °C a 200 rpm por 72 horas (COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Posteriormente, 20 mL de cada inóculo foram inoculados em frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultura para a produção das glicohidrolases, de acordo com a Tabela 5.1. Esta tabela mostra as diferentes composições de meio utilizada neste trabalho de acordo com o objetivo de cada tópico. Neste caso, foram fixados em todos os meios os componentes *Tween 80* em 1 mL/L, e 10 mL de solução de sais 20 x concentrado desenvolvido por Mandels e Reese (1957) (COSTA, *et. al.*, 2016 a e b).

Os cultivos foram realizados em triplicatas e o resultado está apresentado como média e desvio padrão. Todos os cultivos realizados utilizaram o tampão biftalato de potássio pH 5 0,1 M como controlador do pH (COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Foram retiradas amostras em diferentes tempos de cultivo submerso, de acordo com o objetivo de cada item. As amostras foram centrifugadas (4000 x g por 10 min) e o sobrenadante reservado para a aferição das diferentes atividades enzimáticas.

Tabela 5.1: Composição dos meios de cultura utilizados em todos os tópicos deste trabalho.

| Ingredientes (g/L) | Quantidade em g/L dos componentes utilizados para os diferentes meios de cultura | | | | | | |
|----------------------------|--|----|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1* | 2* | 3* | 4* | | | |
| Celufloc | 20 | | Meio 1 | Meio 2 | Meio 3 | Meio 4 | Meio 5 |
| | | | 15,13 | 20 | 8,88 | 14,37 | 7,40 |
| Farelo de trigo | 15 | 15 | 0,47 | 15 | | 15 | 15 |
| Extrato de levedura | 1 | 1 | 1 | | | | |
| BED | | | 14 | | | | |
| Sacarose | | | 3 | 5,49 | | 3,25 | 2,43 |
| BHD | 14,37 | | | | | | |

1*: (item 5.2.3); 2*: (item 5.2.4); 3*: (item 5.2.5); 4*: (item 5.2.6).

5.2.3. Estudo do tempo de reação ideal

Para este estudo foi utilizado o extrato do *Trichoderma harzianum* P49P11 em 96 horas de cultivo, onde se testou uma faixa de tempo de 30 minutos a três horas e meia de hidrólise, colhendo pontos com intervalos de cinco em cinco minutos, para verificar o tempo ideal de determinação da concentração de açúcares redutores a serem usados na avaliação dos diferentes coquetéis enzimáticos produzidos.

Foram utilizados micro tubos do tipo *Eppendorf* de 2 mL contendo 0,075 g de bagaço pré-tratado por explosão a vapor, deslignificado e moído (BED), ao qual foram adicionados 1,5 mL do sobrenadante enzimático. A reação ocorreu em *Thermomix* a 50 °C e 400 rpm em diferentes tempos, em seguida os tubos foram centrifugados e o sobrenadante coletado. A desnaturação das enzimas foi realizada também em *Thermomix* a 95 °C e 20 rpm por 15 minutos com o sobrenadante do hidrolisado advindo da centrifugação anterior.

Os açúcares redutores foram medidos pelo método de Miller (1959) utilizando o reagente DNS, empregando glicose como padrão. Para isso foram utilizados 10 µL do hidrolisado, 90 µL de água e 100 µL do reagente DNS. As reações foram realizadas por 5 minutos a 95 °C. A absorvância foi determinada a 540 nm em leitor de placas *Tecan Infinite® 200* (Männedorf, Suíça).

A análise dos sobrenadantes dos ensaios nos diferentes tempos foram realizadas também utilizando CLAE, com sistema equipado com detector RI-1260 (AGILENT). Foram analisadas as concentrações de glicose, xilose e celobiose liberadas, usando uma coluna *Aminex HPX-87h* (BIO-RAD, HERCULES, CA, EUA) equipada com um cartucho de Carbo-P micro-guarda.

5.2.4. Uso do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos como substratos

O método proposto, que vamos chamar de BCCase ao longo do trabalho, propõe avaliar a atividade enzimática dos coquetéis enzimáticos produzidos fazendo uma hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, em mini escala, conforme descrito no item 5.2.3. Foram testados diferentes pré-tratamentos (BEX, BED, BHD, BH e celulose comercial), medindo a concentração de açúcares redutores (DNS, como explicado no item 5.2.3) em 2h de hidrólise, tempo determinado pelos experimentos do item 5.2.3.

Foi determinada também a atividade de FPase e realizadas correlações de BCCase com a mesma. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram calculados em forma de média e desvio padrão, sendo esses utilizados para gerar os dados de correlação.

5.2.5. Aplicação da medida de BCCase como método para selecionar diferentes cepas

Este experimento se fez necessário para verificar o potencial do novo método (BCCase) para selecionar cepas que possuem pequenas diferenças na produção de glicohidrolases, e comparar os resultados com as metodologias empregadas atualmente

pela literatura. Neste caso, o tempo de hidrólise do BED foi de 2 horas, determinado pelo experimento no item 5.2.3, o restante da metodologia da atividade foi realizada de forma idêntica a esse item, porém a quantificação do hidrolisado foi quantificada em termos dos açúcares redutores liberados (DNS). As cepas P49P11, 1PCE10, 2PCE43 e 3PCE6 foram utilizadas como exemplo para verificação da possibilidade de seleção de cepas com pequenas diferenças de produção das glicohidrolases. O cultivo destas cepas já foi descrito no item 5.2.2. Foram determinadas as atividades de FPase, xilanase e β -glicosidase, e foram realizadas as correlações destas atividades com os resultados do método proposto (BCase).

5.2.6. Verificação da reprodutibilidade do método em uma escala cem vezes maior

Este tópico tem o objetivo de verificar se o método proposto é reprodutivo em uma escala maior, sendo aplicado neste tópico para selecionar meios de cultura que melhor induzem a atividade das glicohidrolases produzidas pela cepa selvagem em cultivo submerso.

Os diferentes meios, descritos na Tabela 1, foram cultivados até 120 horas e, no final deste tempo, o extrato enzimático foi separado da massa de células por centrifugação (4000 x g por 10 min). Com esse sobrenadante enzimático foi determinado o valor de BCase em duas escalas, uma utilizando a escala mini proposta (1,5 mL de sobrenadante foram adicionados em 0,075 g de BED em *Eppendorfs* com volume total de 2 mL, utilizando um tempo de duas horas de atividade a 50 °C, a 400 rpm em *Thermomix*) e outra utilizando um aumento de escala na ordem de 100 vezes (150 mL do sobrenadante enzimático adicionados a 7,5 g de bagaço pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação com NaOH (BED), utilizando frascos *Erlenmeyer* com um volume total de 500 mL. Essa reação foi incubada a 50 °C a 200 rpm no tempo de 2 horas, o experimento foi conduzido em estufas rotativas.

Para os sobrenadantes das duas escalas foram analisados os açúcares redutores totais medidos pelo método de Miller (1959) utilizando o reagente DNS, empregando glicose como padrão.

5.2.7. Determinação das atividades enzimáticas

As quantificações das atividades enzimáticas dos sobrenadantes dos extratos enzimáticos, expressas em unidades internacionais (IU), foram realizadas utilizando diferentes substratos.

A atividade de β -glicosidase foi medida a partir dos resíduos de p-nitrofenol (pNP) correspondentes (Sigma-Aldrich, EUA). As reações foram conduzidas utilizando 20 μ L do sobrenadante diluído e 80 μ L do respectivo pNPG (0,5 mM diluído em 50 mM de tampão). As reações foram realizadas por 10 minutos a 50 °C e foram finalizadas pela adição de 100 μ L de Na₂CO₃ (1M). A absorbância foi determinada a 400 nm em leitor de placas *Tecan Infinite*® 200 (Männedorf, Suíça) (COSTA, *et. al.*, 2016 a).

A atividade de xilanase foi medida utilizando o substrato xilana (Sigma-Aldrich, EUA). As reações foram conduzidas utilizando 10 μ L do sobrenadante diluído, 40 μ L do tampão citrato 50 mM e 50 μ L da solução de xilana 0,5 %. As reações foram realizadas por 10 minutos a 50 °C e foram finalizadas pela adição de 100 μ L de DNS, que reagiu durante 5 minutos a 95 °C. Os açúcares redutores foram medidos pelo método de Miller (1959), empregando xilose como padrão. A absorbância foi determinada a 540 nm em leitor de placas *Tecan Infinite*® 200 (Männedorf, Suíça) (COSTA, *et. al.*, 2016 a).

A atividade enzimática em papel de filtro (filter paper activity FPase) foi realizada segundo Ghose (1987), modificado de forma a reduzir a escala de reação em 100 vezes. Os açúcares redutores foram medidos pelo método de Miller (1959) utilizando o reagente DNS, empregando glicose como padrão (COSTA, *et. al.*, 2016 a).

Para todas as dosagens utilizou-se tampão citrato de sódio pH 5,0 (50 mM). Todas as reações foram conduzidas a 50 °C. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados estão apresentados em forma de média e desvio padrão (COSTA, *et. al.*, 2016 a).

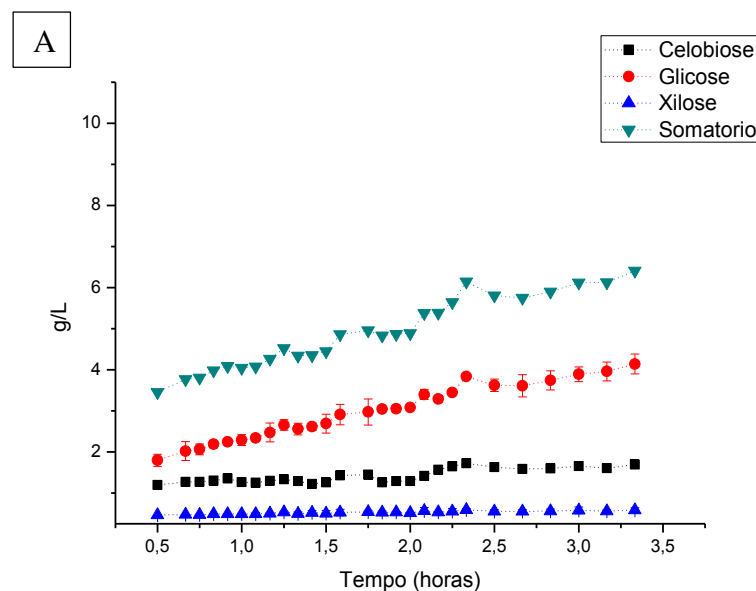
5.3. Resultados

5.3.1. Determinação do tempo de reação ideal

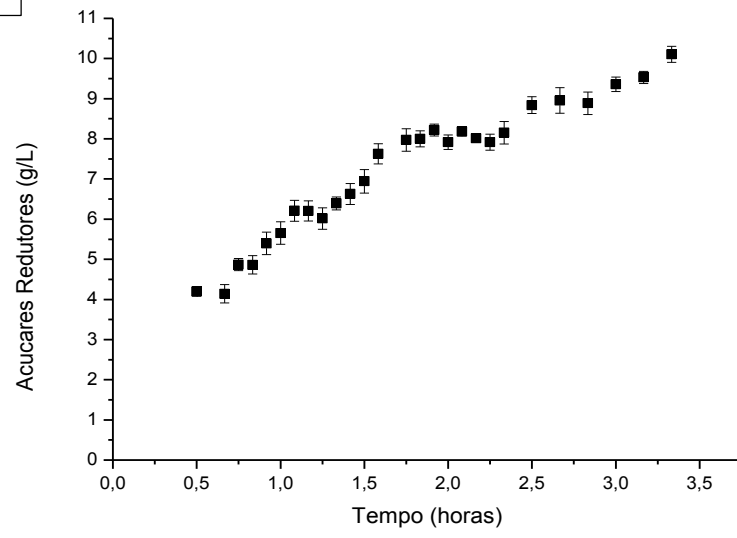
A Figura 5.1 mostra os resultados do experimento que objetivou determinar o melhor tempo de reação para medida de BCase. As quantificações dos produtos foram realizadas em CLAE (Figura 5.1 A) e por DNS (MILLER, 1959) (Figura 5.1 B).

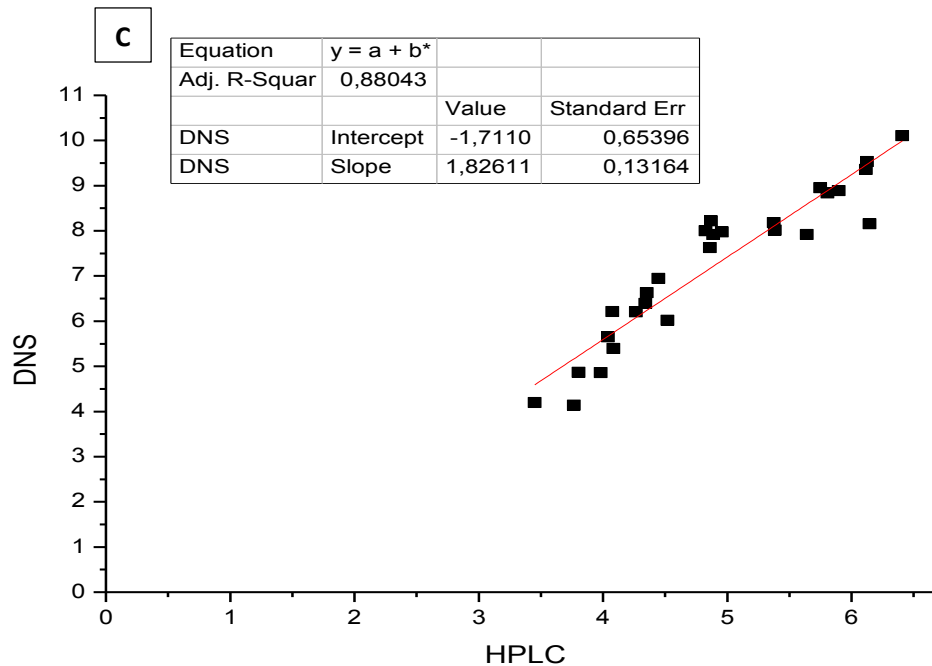
A quantificação dos açúcares por CLAE e pelo método de DNS estão correlacionadas para o extrato utilizado, possuindo um ajuste de correlação de 0,88 (Figura 5.1C).

Figura 5.1: Verificação do tempo ideal para a atividade de BCase, utilizando o extrato produzido pela cepa P49P11. **A)** Quantificação em g/L de glicose, celobiose e xilose em CLAE, e o somatório destes três açúcares. **B)** Quantificação em g/L dos açúcares redutores pelo método de Miller (1959). **C)** Correlação da soma dos açúcares totais quantificados por CLAE com os açúcares redutores totais quantificados por DNS pelo método de Miller (1959).



B





A correlação entre os dados do CLAE (Figura 5.1 A) e do DNS (Figura 5.1 B) foi confiável para as três horas e meia de hidrólise, sendo escolhido o tempo de duas horas para a medida das atividades em bagaço de cana-de-açúcar no método proposto. A análise do produto da atividade de BCase, somente pela quantificação dos açúcares redutores, mostra uma quantificação superficial do potencial de hidrólise do extrato, pois o mesmo quantifica o conjunto de açúcares redutores liberados da hidrólise, não havendo distinção dos mesmos (Figura 5.1). Embora a quantificação em CLAE seja de maior custo, quando as amostras são quantificadas apenas por DNS (Figura 5.1B) perdemos as informações da quantidade de glicose, xilose e celobiose em separado que o CLAE é capaz de elucidar (Figura 5.1A). Entretanto, devido ao alto custo das análises em HPLC e levando em conta a correlação entre as medidas feitas por HPLC e DNS (Figura 1C), o método proposto usa a quantificação de açúcares por DNS.

5.3.2. Correlação entre FPase e BCase medido para bagaços de cana-de-açúcar submetidos a diferentes pré-tratamentos

Este item discute a existência da correlação entre a atividade clássica de FPase e a atividade de BCase.

Devido as diferenças nas características físicas e químicas entre os substratos, a hipótese de que não haveria correlação entre estes métodos foi estabelecida como pressuposto.

Esta hipótese foi testada medindo-se as atividades dos complexos enzimáticos produzidos por diferentes linhagens de *T. harzianum* (P49P11, 1PCE10, 2PCE43 e 3PCE6 e P49P11) pelos métodos FPase e BCase. Neste experimento foram utilizados como substratos para hidrólise, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por diversos métodos (BED, BEX, BHD, BH) e Celufloc 200 como um substrato controle.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados das correlações entre a atividade de FPase e BCase utilizando diferentes substratos. Os resultados de correlações são visualizados pelo valor de ajuste da reta, que está representado por R^2 na Tabela 5.2, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a correlação entre os métodos. Os valores de correlações representam o quanto a atividade de BCase esta interligada com a atividade de FPase. Segundo a Tabela 5.2, de fato, a hipótese apresentada se concluiu, não havendo correlação entre a atividade dos coquetéis enzimáticos medidos em FPase, e as capacidades hidrolíticas destes coquetéis enzimáticos testados na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar submetidos a diversos tipos de pré-tratamento: BH, BHD e BEX. Por outro lado, parece haver uma forte correlação entre a FPase e o método de BCase quando o substrato utilizado e o bagaço pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação com NaOH.

Tabela 5.2: Correlações entre a atividade de FPase e BCase utilizando diferentes substratos.

| Composição dos diferentes substratos | Correlação entre as Metodologias | Equação da Reta | R² |
|---|---|---------------------------|----------------------|
| BED (77,89 % de celulose; 7,09 % de hemicelulose; 16,22 % de lignina) | BCase com BED (g AR/L) x FPase (FPU/mL) | $y = 15,868 * x - 1,0845$ | 0,9461 |
| CEL (98 % de celulose; 2 % de hemicelulose; 0 % de lignina) | BCase com CEL (g AR/L) x FPase (FPU/mL) | $y = 14,947 * x + 6,6142$ | 0,6423 |
| (84,1 % de celulose; 2,87 % de hemicelulose; 8,56 % de lignina) | BCase com BHD (g AR/L) x FPase (FPU/mL) | $y = 15,47 * x + 2,00$ | 0,7642 |
| (60,43 % de celulose; 5,3 % de hemicelulose; 32,62 % de lignina) | BCase com BH (g AR/L) x FPase (FPU/mL) | $y = 4,1579 * x + 5,2774$ | 0,06 |
| (56,88 % de celulose; 10,84 % de hemicelulose; 29,26 % de lignina) | BCase com BEX (g AR/L) x FPase (FPU/mL) | $y = 6,6842 * x + 2,52$ | 0,2937 |

AR: açúcares redutores medido por DNS (Miller, 1959)

A atividade de BCase utilizando o substrato BED obteve um melhor R² (0,94) de correlação com a atividade de FPase (Tabela 5.2). Para os substratos CEL e BHD, a atividade de BCase teve correlação com a atividade de FPase com R² acima de 0,6 (Tabela 5.2). As piores correlações foram verificadas para os bagaços BH e BEX, que tiveram R² abaixo de 0,3 (Tabela 5.2). As correlações baixas podem ser explicadas pelos tipos de pré-tratamento dos materiais, onde foram utilizados BH e BEX. Esses materiais não passaram pelo processo de deslignificação, por isso as enzimas encontram maior

dificuldade para acessar as suas fibras, enquanto o papel de filtro não possui lignina em sua composição. Isso poderia explicar as altas correlações que a atividade de FPase teve com a atividade de BCase utilizando o BED, CEL e BHD como substrato. Esses materiais passaram pelo processo de deslignificação e suas fibras são mais acessíveis às enzimas celulolíticas contidas no extrato (Tabela 5.2), sendo hidrolisado de forma mais parecida com o papel de filtro.

Esses valores de correlações não querem dizer que esses substratos são ruins para a aplicação desta metodologia, eles apenas nos informam o quanto que a atividade de FPase pode ser correlacionada com a atividade utilizando esses materiais. Alguns materiais são mais parecidos com o papel de filtro e sua hidrólise é semelhante a hidrólise do mesmo (correlações altas), outros materiais principalmente os lignificados, a sua hidrólise não corresponde com a hidrólise do papel de filtro (correlações baixas) (Tabela 5.2).

Na composição da celufloc existe 98 % de celulose e 2 % de hemicelulose, sendo este substrato o mais puro em termos de celulose, até mais que o papel de filtro comumente utilizado na literatura (94 % de celulose e 2,4 % de hemicelulose).

Todos os bagaços utilizados foram hidrolisados de forma satisfatória, dentro das necessidades de aplicação desta metodologia, com o que se pode concluir que qualquer um destes bagaços pode ser utilizado para a aplicação desta metodologia, podendo estender ao material a ser hidrolisado em cada unidade industrial.

De uma forma geral, podemos perceber que a hidrólise em materiais diferentes nos mostra resultados diferentes. No entanto, deve-se escolher materiais que serão utilizados para hidrólise em escala maior, podendo ser diferente para cada unidade de aplicação desta metodologia, de acordo com a disponibilidade de cada unidade industrial.

5.3.3. Aplicação do método de BCase para selecionar diferentes cepas

Os resultados apresentados na Tabela 5.3 mostram que o método proposto, BCase, possui melhor capacidade de diferenciação de cepas que possuem pequenas diferenças de atividade das glicohidrolases quando comparadas com os métodos

utilizados na literatura. A cepa 1PCE10 apresentou melhores resultados em todas as metodologias de atividade utilizadas, de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança. Este resultado mostra que a substituição dos métodos tradicionais pela atividade de BCase não leva a perda de informações a respeito do potencial do extrato enzimático para selecionar cepas com pequenas diferenças na produção de glicohidrolases, apresentando resultados até melhores com relação a sensibilidade. Novamente a análise do hidrolisado em CLAE nos leva a uma informação mais detalhada a respeito do extrato, porém, a análise somente dos açúcares redutores também levou a escolhas corretas de extratos com melhores potenciais de hidrólise do bagaço (Tabela 5.3). Os resultados da Tabela 5.3 indicam também que a atividade de FPase é a pior escolha para selecionar cepas que possuem poucas diferenças de produção, verificando que todas as médias são iguais a 95 % de confiança de acordo com o teste de Tukey.

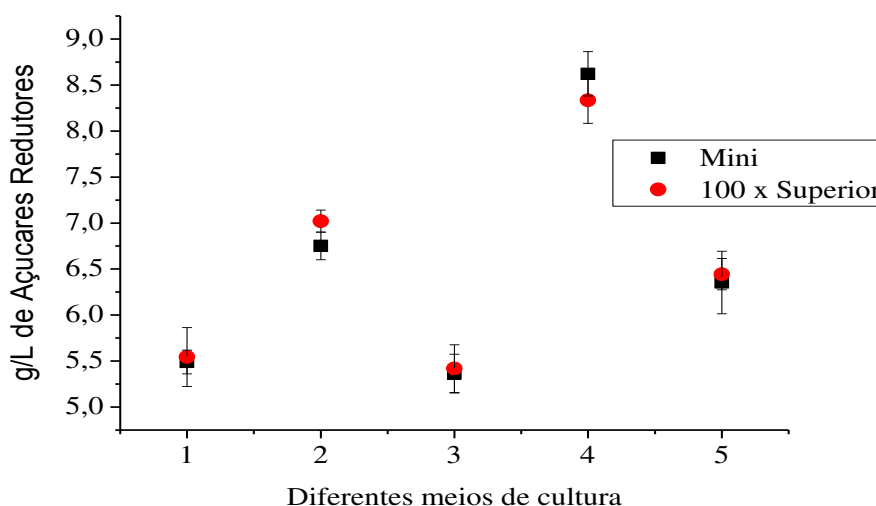
Tabela 5.3: Atividades comumente utilizadas pela literatura comparada com a atividade de BCase em BED, para seleção de diferentes cepas com pequenas diferenças nas atividades das glicohidrolases. Comparação da análise dos resultados da atividade de BCase quantificada em CLAE e pelo método de Miller (1959). Médias iguais na mesma coluna possuem a mesma letra de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança.

| Cepas Testadas | BCase | | | | Literatura | | |
|----------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| | Miller (1959) | CLAE | | | Atividades mais comuns | | |
| | Açúcares Redutores (g/L) | Celobiose (g L ⁻¹) | Glicose (g L ⁻¹) | Xilose (g L ⁻¹) | β-glu mL ⁻¹ | Xil mL ⁻¹ | FPu mL ⁻¹ |
| P49P11 | B 5,00 ±0,06 | B 0,71 ±0,06 | B 2,39 ±0,04 | B 0,25 ±0,01 | A 0,60 ±0,10 | AB 14,37 ±3,46 | A 0,21 ±0,02 |
| 1PCE10 | A 6,40 ±0,18 | A 1,05 ±0,08 | A 2,93 ±0,03 | A 0,33 ±0,01 | A 0,70 ±0,05 | A 14,99 ±0,88 | A 0,24 ±0,02 |
| 3PCE6 | B 4,96 ±0,06 | B 0,73 ±0,03 | B 2,38 ±0,02 | B 0,26 ±0,01 | A 0,61 ±0,02 | AB 12,89 ±1,90 | A 0,20 ±0,01 |
| 2PCE43 | B 4,84 ±0,16 | B 0,69 ±0,04 | B 2,39 ±0,14 | B 0,26 ±0,02 | A 0,47 ± 0,21 | AB 12,11 ±0,54 | A 0,21 ±0,00 |

5.3.4. Verificação da reprodutibilidade do método em uma escala cem vezes superior

A Figura 5.2 mostra a atividade de BCase, em escala mini e em escala cem vezes superior, visando à escolha de um meio de cultura para o cultivo do P49P11 que apresente melhor atividade de BCase. Este experimento foi importante pois uma boa aproximação dos resultados de hidrólise nas duas diferentes escalas nos abre a possibilidade de correlacionar resultados da escala mini para uma escala de pelo menos cem vezes superior. Neste caso, a melhor composição de meio de cultura é a de número 4, alcançando um valor de quase 9 g/L de açúcares redutores liberados em duas horas de hidrólise com esse extrato enzimático, para as duas escalas da atividade de BCase.

Figura 5.2: Resultado da atividade de BCase utilizando o BED como substrato, em g/L de açúcares redutores liberados em duas horas de hidrólise (BCase). Extratos advindo do cultivo submerso do fungo selvagem, em diferentes meios de culturas (1, 2, 3, 4, 5). Verificação da reprodutibilidade do método em escala cem vezes superior à escala do método proposto.



Esta atividade é mais sensível que a atividade de FPase, conseguindo diferenciar cepas que possuem pequenas diferenças na capacidade de produção das glicohidrolases, a 95 % de confiança. Esta característica é importante para aplicação em processos de

melhoramento genético onde a atividade vai melhorando aos poucos, no decorrer das etapas de mutação.

A possibilidade de se utilizar diferentes materiais lignocelulósicos como substrato para essa atividade nos abre um leque de opções, podendo cada unidade industrial optar pelo seu material de interesse. Além disso, pode abrir um olhar mais crítico com relação ao entendimento do processo de hidrólise atrelado a produção enzimática do fungo. Esta possibilidade faz com que o processo seja mais unificado e direcionado ao material de interesse, que será mais parecido com o utilizado no processo de produção de etanol de segunda geração (SILVEIRA, *et. al.*, 2014).

A reprodutibilidade da atividade em uma escala maior é de grande importância industrial, pois somente com os valores de atividades, em baixa escala, pode-se fazer previsões reais dos potenciais de hidrólise dos extratos produzidos para escalas industriais (pelo menos cem vezes), formando assim um banco de dados realista, que pode ser de grande importância para programar processos mais parecidos com a realidade industrial.

5.4. Conclusão

Através deste trabalho podemos concluir que o método de BCCase pode ser utilizado para determinação da potencialidade de extratos enzimáticos com a mesma certeza que os métodos convencionais de atividades enzimáticas atualmente realizados, se os substratos forem bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados e submetidos ao processo de deslignificação. A atividade de FPase não teve correlação com a atividade de BCCase para os pré-tratamentos sem a etapa de deslignificação, para a linhagem trabalhada. Entretanto, a realização da atividade de BCCase utilizando qualquer um dos bagaços testados nesse trabalho, de acordo com a disponibilidade de cada unidade industrial, pode ser realizada. O aumento de escala em cem vezes produziu resultados parecidos e iguais conclusões a respeito do potencial de hidrólise dos extratos testados. A seleção de mutantes ou escolha de melhores meios de cultura pela atividade de BCCase, método proposto, possui grande relevância. Isto possibilita a escolha de um possível mutante ou

um meio de cultura cujo extrato do cultivo se sobressai no substrato real a ser utilizado no processo de hidrólise em uma escala superior.

CAPÍTULO 6

6. OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA O FUNGO *T. HARZIANUM* PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE GLICOHIDROLASES RESPONSÁVEIS POR HIDROLISAR MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

RESUMO

O objetivo deste capítulo foi aumentar a atividade das glicohidrolases produzidas por *Trichoderma harzianum* P49P11 utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional. Para isso, foram utilizados como indutores das glicohidrolases a celulose (CEL) (0-20 g/L), a sacarose (SAC) (0-10 g/L), o farelo de soja (FS) (0-15 g/L) e o farelo de trigo (0-15 g/L) e foram avaliadas as atividades das glicohidrolases nos tempos de 48, 72 e 96 horas de cultivo. Foi desenvolvida uma nova proporção de reagentes necessários para melhorar a indução das glicohidrolases produzidas pelo fungo em estudo. A melhor composição resultante das otimizações foi 14,37 g/L de bagaço pré-tratado e deslignificado (BED ou BHD), 15 g/L de farelo de trigo, 0,1 % de extrato de levedura, 0,1 % (v/v) de *Tween 80* e 10 % (v/v) de solução salina 20 vezes concentrada. Esta composição induziu melhor o conjunto de enzimas responsáveis por hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e deslignificado, apresentando atividade maiores se comparada com as composições anteriormente estudadas pela literatura, em frascos agitados. Este trabalho pode auxiliar outros trabalhos de melhoramento de meios de cultura para fungos filamentosos, pois elucida uma nova e simples estratégia de aplicação desta metodologia.

6.1. Introdução

A concentração, a natureza, bem como a forma de adição das fontes de carbono tem profundo impacto no desempenho do processo de produção das celulasas (REESE, *et. al.*, 1969; PRADELLA, *et. al.*, 2009; MARGEOT, *et. al.*, 2009; MAYRINK, 2010; DELABONA, *et. al.*, 2012 a; COSTA, *et. al.*, 2016).

Existe uma grande quantidade de trabalhos utilizando materiais lignocelulósicos como potenciais indutores de glicohidrolases. Esses materiais, como o bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana, farelo de soja, farelo de trigo, são de baixo custo quando comparados a outras fontes industriais de nutrientes. Esses materiais contém porções de celulose e hemiceluloses, que são moléculas essenciais no meio de cultivo de microrganismos produtores de glicohidrolases pois induzem a produção destas enzimas, responsáveis por hidrolisar os mesmos (REESE, *et. al.*, 1969; MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b; KASAN, *et. al.*, 2008; DILLON, *et. al.*, 2011; DELABONA, *et. al.*, 2013; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b).

Delabona *et. al.*, (2012) propuseram um meio de cultura para o fungo *Trichoderma harzianum* P49P11, onde a produção relatada pela autora foi de 80 UI/mL de xilanase, 17 UI/mL de β -glicosidase e 0,8 FPU/mL de celulase. O meio de cultura otimizado pelos autores resultou em uma composição de 7 g/L de BED, 3 g/L de sacarose, 10 % de sais e 0,1 % de *Tween 80*. Dados mais recentes reportados pelos mesmos autores, mostram uma nova proporção de componentes de meio onde as maiores atividades encontradas foram de 150 IU/mL de xilanase, 25 IU/mL de β -glicosidase e 1,3 FPU/mL de celulase (DELABONA *et. al.*, 2013). Os autores concluíram que o meio mais indicado era composto por 30 g/L de celulose, 10 % de sais e 0,1 % de *Twee 80* (DELABONA, *et. al.*, 2013 (1)), que levou às seguintes atividades: 1,3 FPU/mL, 75,7 IU/mL de xilanase, 23,6 IU/mL de β -glicosidase. Embora os autores tenham encontrado altas atividades de xilanase e β -glicosidase, não se encontra no trabalho um único meio de cultura que possui tais produtividades, sendo que estas atividades estão em três diferentes meios de cultura. Embora os autores tenham encontrado atividades muito altas de β -glicosidase, foi relatado um erro no cálculo da atividade desta enzima, e com isso os dados mais recentes de atividade desta enzima são inferiores aos que eram determinados antes (DELABONA, *et. al.*, 2012 e 2013).

A presença de fontes de nitrogênio orgânico, como extrato de levedura no meio de cultura tem sido descrita como um melhorador da síntese de celulase (AHAMED e VERMETTE, 2009; DOMINGUES *et. al.*, 2000), embora seu mecanismo de ação seja desconhecido. Ilmén *et. al.* (1997) atribuíram este melhoramento ao aumento da quantidade de massa celular.

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi o de aumentar a atividade das FPases, xilanases e β -glicosidases por *Trichoderma harzianum* P49P11 utilizando dois Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais, com o intuito de determinar uma única composição de meio que melhor induza o conjunto de enzimas responsáveis por hidrolizar o bagaço. Foram testados como indutores das glicohidrolases a celulose (CEL), a sacarose (SAC), o farelo de trigo (FT) e o farelo de soja (FS), sendo avaliadas as atividades das glicohidrolases nos tempos de 72 e 96 horas de cultivo, para o planejamento utilizando farelo de trigo e nos tempos de 48, 72 e 96 horas, para o planejamento utilizando farelo de soja.

A indução da atividade provocada por farelos pode ser devida às altas cargas de proteínas verificadas na composição dos mesmos, sendo então fonte de aminoácidos para a produção de massa e proteína pelo fungo (AHAMED & VERMETTE, 2008; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b).

A estratégia de estudar esses quatro ingredientes para a indução de um coquetel completo foi baseada nas suas composições (REESE, *et. al.*, 1969). A celulose como o principal indutor de endoglucanase e celobiohidrolase, a sacarose como potencial indutor de β -glicosidase e o farelo de trigo e farelo de soja como os potenciais indutores das hemicelulases como a xilanase e arabinofuranosidase, dentre outras (REESE, *et. al.*, 1969; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Este trabalho é o primeiro que estuda a otimização da produção das glicohidrolases pela otimização da composição do meio de cultura utilizando os ingredientes celulose, sacarose, farelo de trigo e farelo de soja para o *Trichoderma harzianum* P49P11 em cultivo em frascos agitados.

6.2. Metodologia

6.2.1. Microrganismos

O fungo empregado neste projeto é o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* P49P11 (DELABONA, *et. al.*, 2012 a). O fungo é armazenado em geladeira e em PDA e repicado periodicamente a cada 2 meses ou esporulado e mantido em freezer em glicerol 30 % a -80 °C.

6.2.2. Cultivo submerso

O fungo foi repicado em ágar-celulose (somente para o item 6.2.6 foi utilizado PDA para o crescimento e desenvolvimento dos esporos) e incubado em estufa a 29 °C por sete dias, para o desenvolvimento dos esporos. Em seguida, 20 mL de solução de *Tween 80* 0,1 % estéril foram utilizados para a captação dos esporos na placa de Petri e 20 mL dessa suspensão de esporos foi inoculada em 200 mL de meio de inóculo (celufloc 200 10 g/L, glicose 10 g/L, peptona 1 g/L, 10 % de solução salina 20 vezes concentrada empregada por Mandels e Reese (1957), 0,1 % de *Tween 80*). Os inóculos foram mantidos em estufa rotativa a 29 °C a 200 rpm por 72 horas (COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Posteriormente 20 mL foram inoculados em frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL dos diferentes meios de culturas avaliados por esse trabalho, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. Todos os experimentos foram conduzidos em estufas rotativas utilizando frascos de 500 mL contendo 200 mL dos diferentes meios de culturas, testados ao longo do trabalho, em uma temperatura de 29 °C a 200 rpm em pH 5,0 controlado com tampão biftalato de potássio (COSTA, *et. al.*, 2016 b).

Para todos os meios testados, as concentrações de solução salina (20 x concentrada, segundo Mandels e Reese (1957)) foram fixadas em 5 % e a quantidade de extrato de levedura e *Tween 80* em 0,1 %.

6.2.3. Otimização do meio de cultura

Visando otimizar e estudar a influência de quatro componentes de meio de cultura para aumentar a atividade das glicohidrolases produzidas pelo *T. harzianum* foram realizados dois Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR). Foram avaliadas diferentes concentrações de farelo de soja (0-15 g/L), sacarose (0-10 g/L) e celulose comercial Celuflok (0-20 g/L) no primeiro, e as concentrações de farelo de trigo (0-15 g/L), sacarose (0-10 g/L) e celulose (0-20 g/L) no segundo, sendo a resposta a atividade de FPase, β -glicosidase e xilanase. No presente estudo, realizaram-se 18 ensaios experimentais para cada planejamento, contendo quatro repetições do ponto central.

A Tabela 6.1 apresenta a matriz de planejamento com 4 pontos centrais para os dois DCCRs realizados.

Tabela 6.1: Composição dos meios de cultura no DCCR visando o desenvolvimento de um meio de cultura otimizado para aumentar a atividade das glicohidrolases responsáveis por hidrolisar o BED para *T. harzianum*. O DCCR1 foi realizado utilizando o farelo de soja e o DCCR2 utilizando o farelo de trigo. Todos os dois planejamentos foram realizados de forma idêntica, variando apenas os componentes farelo de soja e de trigo para os dois planejamentos.

| Frascos | Sacarose (g/L) | Celulose (g/L) | Farelo de Soja (g/L) (DCCR 1) ou Farelo de Trigo (DCCR 2) |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--|
| 1 | 2,02 | 4,05 | 3,04 |
| 2 | 7,97 | 4,05 | 3,04 |
| 3 | 2,02 | 15,94 | 3,04 |
| 4 | 7,97 | 15,94 | 3,04 |
| 5 | 2,02 | 4,05 | 11,95 |
| 6 | 7,97 | 4,05 | 11,95 |
| 7 | 2,02 | 15,94 | 11,95 |
| 8 | 7,97 | 15,94 | 11,95 |
| 9 | 0,00 | 10,00 | 7,50 |
| 10 | 10,00 | 10,00 | 7,50 |
| 11 | 5,00 | 0,00 | 7,50 |
| 12 | 5,00 | 20,00 | 7,50 |
| 13 | 5,00 | 10,00 | 0,00 |
| 14 | 5,00 | 10,00 | 15,00 |
| 15 | 5,00 | 10,00 | 7,50 |
| 16 | 5,00 | 10,00 | 7,50 |
| 17 | 5,00 | 10,00 | 7,50 |
| 18 | 5,00 | 10,00 | 7,50 |

Alíquotas de 5 mL foram coletadas nos tempos de 48, 72 e 96 horas para o experimento utilizando farelo de soja e nos tempos de 72 e 96 horas para o experimento utilizando farelo de trigo, e centrifugadas (10000 rpm, 10 °C, 15 minutos). O

sobrenadante foi reservado para posteriores análises das atividades enzimáticas nos substratos papel de filtro, xilana e pnpG.

As análises do planejamento foram realizadas pelo programa *Statistica 7.0*. Os modelos foram determinados pela técnica de “*backward elimination*”. O nível de confiança utilizado foi de 95 % utilizando o erro puro das quadruplicatas do ponto central (COSTA, *et. al.*, 2016 b).

6.2.4. Validação dos modelos gerados em experimentos de cultivo submerso

Os modelos significativos a 95 % de confiança foram validados em cultivo submerso, já descrito no item 6.2.2, em triplicata biológica. Os tempos de amostragem foram de 48, 72 e 96 horas para os meios advindo da otimização com farelo de soja, e nos tempos de 72, 96 e 120 horas para os meios advindo da otimização com farelo de trigo. O extrato foi centrifugado (10000 rpm, 10 °C, 15 minutos) e o sobrenadante reservado para uma posterior quantificação da atividade de β -glicosidase, FPase, xilanase de acordo o objetivo de cada modelo. A determinação de BCase foi realizada para todos os modelos obtidos em todos os tempos de cultivo. Para os meios otimizados para farelo de soja foi realizado o cultivo em pH 5 e em pH 4,2 controlado pelo tampão biftalato de potássio 0,1 M. Para os meios otimizados utilizando farelo de trigo utilizou-se somente o pH 5 pois nestas concentrações esse farelo não desregula o pH do meio (COSTA, *et. al.*, 2016 b). As composições destes meios estão descritas nas Tabelas 2 e 3, sendo que para todas essas composições são adicionados 0,1 % de extrato de levedura, 0,1 % (v/v) de *Tween 80* e 10 % (v/v) de solução salina 20 vezes concentrada empregada por Mandels e Reese (1957).

6.2.5. Hidrólise do BED (Bagaço pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado com NaOH) pelos melhores extratos pré-selecionados

Os meios que apresentaram maiores valores de BCase de acordo com os resultados verificados na Figura 1 e 2, deste capítulo, foram novamente cultivados de forma idêntica ao item 6.2.2.

Os meios (2FT, 4 FT, 5FT, 3FS e 3FS) (estes meios estão descritos na Tabela 2 e 3 na sessão de resultados deste trabalho) foram cultivados por 120 horas em estufas rotativas a 29 °C em 200 rpm, posteriormente o extrato enzimático foi separado da massa de células por centrifugação e 150 mL do sobrenadante foi reservado para a realização da hidrólise. A hidrólise foi realizada em frascos de 500 mL utilizando 150 mL dos sobrenadantes dos meios a serem selecionados. Foi utilizado 7,5 g de BED para a hidrólise que ocorreu durante 29 horas. A reação foi incubada a 50 °C a 200 rpm. Foram retiradas amostras em diferentes tempos de hidrólise, esse hidrolisado foi centrifugado a 4000 x g e o sobrenadante analisado em termos dos açúcares redutores totais liberados, para os diferentes tempos de cultivo submerso, quantificado pelo método de Miller (1959), empregando glicose como padrão. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

6.2.6. Substituição da fonte de celulose comercial do melhor meio selecionado por bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

O meio otimizado que melhor se sobressaiu quanto a hidrólise do BED (Figura 3) no experimento do item 6.2.5, foi selecionado para este experimento. Estudos anteriores realizados por Delabona *et. al.*, (2013 e 2012) nos mostram vantagens da substituição da fonte indutora de celulase, a celulose pura (*Celluflok200*) por material lignocelulósico BED, para o mesmo fungo utilizado neste trabalho. Neste trabalho foram utilizados dois substratos lignocelulósicos deslignificados (BED e BHD) para substituir a CEL do meio otimizado. Além disso, para definir corretamente qual meio de cultura

final seria escolhido para trabalhar com esse fungo, foram cultivadas todas as formulações ótimas relatadas por Delabona *et. al.*, (2012 e 2013).

Os extratos advindos desses cultivos, nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas foram centrifugados (10000 rpm, 10 °C, 15 minutos) e o sobrenadante dessas amostras utilizado para a medida de BCase. Os cultivos submersos foram idênticos aos descritos no item 6.2.2, porém os meios de culturas utilizados neste tópico possuem as composições descritas abaixo:

- Melhor meio definido no tópico anterior, CEL FT4 (Modelo 4 do planejamento utilizando farelo de trigo, Tabela 3) (14,37 g/L de celulose, 15 g/L de farelo de trigo, 0,1 % de extrato de levedura, 0,1 % de *Tween 80* e 10 % de solução salina 20 vezes concentrada, empregado por Mandels e Reese (1957)).
- FT4 (Modelo 4 do planejamento utilizando farelo de trigo) substituindo CEL por BED;
- FT4 substituindo CEL por BHD;
- Delabona *et. al.*, (2012) (7 g/L de BED, 3 g/L de sacarose, 0,1 % de peptona, 10 % de solução salina 20 vezes concentrada empregado por Mandels e Reese (1957) e 0,1 % de *Twee 80*);
- Delabona *et. al.*, 2013 (1) (30 g/L de celulose, 0,1 % de peptona, 10 % de solução salina 20 vezes concentrada empregado por Mandels e Reese (1957) e 0,1 % de *Twee 80*);
- Delabona *et. al.*, 2013 (2) (40 g/L de BED 10 % de solução salina 20 vezes concentrada desenvolvida por Mandels e Reese (1957), 0,1 % de peptona e 0,1 % de *Twee 80*);
- Delabona *et. al.*, 2013 (3) (40 g/L de BED, 1,7 g/L de sacarose e 1,7 g/L de farelo de soja, 0,1 % de peptona, 10 % de solução salina 20 vezes concentrada empregado por Mandels e Reese (1957) e 0,1 % de *Tween 80*);

6.2.7. Cultivo em Biorreator

Os experimentos foram conduzidos utilizando 1 L de volume de trabalho no biorreator (Bioflo 115, New Brunswick Scientific Co., EUA), equipado com controle automático de temperatura (29 °C), pH (5,0), velocidade de agitação (200-500 min⁻¹) e taxa de aeração (0,3-1,0 L min⁻¹). O pH foi controlado por adição automática de H₂SO₄ (0,4 M) ou NH₄OH: H₂O (1:3, v/v), e o nível de O₂ dissolvido foi mantido acima de 30 % de saturação de ar através do ajuste automático de aeramento e agitação. A formação de espuma foi controlada manualmente, conforme necessário, usando agente antiespumante poliglicólico (Fluente Cane 114, Dow Chemical, Brasil) previamente esterilizado. O biorreator foi inoculado com 100 mL (v/v) do inóculo, preparado como descrito anteriormente. As amostras foram periodicamente retiradas, centrifugadas a 10.000 x g durante 15 min a 10 °C, e analisadas quanto ao teor de proteínas totais e as atividades de β-glicosidase, xilanase, FPase e BCCase.

6.2.8. Determinação das atividades enzimáticas

A quantificação das atividades dos sobrenadantes enzimáticos, expressas em unidades internacionais (IU), foram realizadas utilizando diferentes substratos.

A xilana (Sigma Aldrich e Megazyme) foi utilizada na concentração de 0,5 % (p/v) por 10 minutos a 50 °C de reação. A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados, pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando xilose como padrão.

A β-glicosidase foi medida a partir dos resíduos de p-nitrofenol (pNP) correspondentes (Sigma-Aldrich, EUA). As reações foram conduzidas utilizando 20 μL do sobrenadante diluído e 80 μL do respectivo pnpG (0,5 mM diluído em 50 mM de tampão). As reações foram realizadas por 10 minutos e finalizadas pela adição de 100 μL de Na₂CO₃ (1M). A absorbância foi determinada a 400 nm em leitor de placas *Tecan Infinite*® 200 (Männedorf, Suíça).

Para todas as dosagens utilizou-se tampão citrato de sódio pH 5,0 (50 mM de tampão). Todas as reações foram conduzidas a 50 °C.

A proteína total foi medida em micro placas utilizando *Bio-Rad* reagente de ensaio de proteína (Bio-Rad Laboratories, EUA), utilizando um procedimento baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976). Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

A atividade enzimática no papel de filtro (*filter paper activity* – FPA) foi realizada segundo Ghose (1987), modificada de forma a reduzir a escala de reação em 10 vezes. O açúcar redutor foi medido pelo método de Miller (1959) utilizando o reagente DNS, empregando glicose como padrão.

A medida de ART liberada após hidrólise de BED pelos diferentes extratos enzimáticos (BCase) foi realizada utilizando 1,5 mL dos sobrenadantes dos extratos otimizados para os diferentes tempos de cultivo submerso. A medida foi determinada em micro tubos do tipo *Eppendorfs* de 2 mL contendo 0,075 g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação (BED). A reação foi incubada a 50 °C a 400 rpm no tempo de 2 horas, segundo o capítulo 5 deste trabalho. O hidrolisado foi centrifugado a 4000 x g e o sobrenadante analisado em termos dos açúcares redutores totais medidos pelo método de Miller (1959) utilizando o reagente DNS, empregando glicose como padrão. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

6.3. Resultados

6.3.1. Otimização do meio de cultura

A parte proteica do farelo é fonte de aminoácidos requeridos no processo de produção das enzimas produzidas pelo fungo (AHAMED & VERMETTE, 2008; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). As mais citadas fontes de nitrogênio orgânico são extrato de levedura, água de maceração de milho, peptonas, farelos de soja, farelo de trigo e de caroço de algodão (KADAM, *et. al.*, 1996).

Os modelos mostrados na Tabela 6.2 e 6.3 foram determinados usando o software *Statistica 7* com base na matriz de planejamento mostrada na Tabela 6.1. Foi utilizada a

técnica de “*backward elimination*,” na qual iniciamos com o modelo completo e eliminamos um termo de cada vez, do menos significativo para o mais significativo. Esta técnica está detalhada no trabalho publicado por Costa, *et. al.*, (2016 b).

Tabela 6.2: Resumo dos resultados do ensaio de otimização do meio de cultura para as atividades de FPase, β -glicosidase e xilanase. Estão apresentados os modelos que obtiveram os melhores R^2 -ajustados para cada atividade testada em 48, 72 e 96 horas de cultivo submerso, a atividade prevista pelo modelo, a atividade da validação do modelo, as composições otimizadas calculadas. 1: Sacarose; 2: Celulose; 3: **Farelo de Soja**. Valores reais em g/L.

| Validação no pH correto para cada meio | | | | | | | | |
|--|--|---------------------------|----------------------------|------|-------|-----------------------------------|-----------|---------|
| Meio | Modelos gerados pela análise estatística | Atividade ótima calculada | Composição otimizada (g/L) | | | Atividade ótima Experimentalmente | R-ajust % | R-Sqr % |
| | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 1 | β -glicosidase 48h = $1,66 - 0,21 * x_1 - 0,15 * x_2 - 0,18 * x_2^2 - 0,18 * x_3 - 0,13 * x_3^2 - 0,29 * x_1 * x_3 + 0,19 * x_2 * x_3$ | 2,22 U/mL | 0,0 | 12,0 | 14,02 | 0,46 U/mL $\pm 0,14$ | 44,86 | 65,17 |
| 2 | β -glicosidase 72h = $1,68 - 0,21 * x_1 - 0,15 * x_2 - 0,19 * x_2^2 - 0,18 * x_3 - 0,13 * x_3^2 - 0,29 * x_1 * x_3 + 0,19 * x_2 * x_3$ | 2,22 U/mL | 0,0 | 11,5 | 13,41 | 2,06 U/mL $\pm 0,23$ | 44,30 | 67,23 |
| 3 | β -glicosidase 96h = $2,27 - 0,31 * x_2^2 - 0,21 * x_3 - 0,03 * x_3^2 + 0,19 * x_1 * x_2 - 0,16 * x_1 * x_3 + 0,17 * x_2 * x_3$ | 2,98 U/mL | 10,0 | 10,4 | 0,03 | 1,31 U/mL $\pm 0,33$ | 69,56 | 80,30 |
| 4 | Xilanase 48h = $106,04 - 4,99 * x_2 - 15,99 * x_2^2 - 3,82 * x_3 - 5,36 * x_3^2 - 15,05 * x_1 * x_3 + 11,22 * x_2 * x_3$ | 129,97 U/mL | 0,0 | 12,5 | 15,0 | 82,54 U/mL $\pm 0,18$ | 84,30 | 90,19 |
| 5 | Xilanase 72h = $106,71 + 5,81 * x_1 - 8,99 * x_2^2 + 5,23 * x_3^2 + 6,33 * x_1 * x_2 + 4,30 * x_2 * x_3$ | 140,12 U/mL | 10,0 | 15,9 | 15,0 | 94,85 U/mL $\pm 4,94$ | 57,38 | 70,70 |
| 6 | Xilanase 96h = $106,54 + 17,00 * x_1 - 10,91 * x_2^2 + 6,96 * x_3^2$ | 135,05 U/mL | 10,0 | 10,0 | 7,5 | 181,37 U/mL $\pm 7,32$ | 57,07 | 65,11 |

| | | | | | | | | |
|---|--|----------------|-----|------|-----|-----------------------|-------|-------|
| 7 | $\text{FPase 48h} = 0,50 - 0,05*x_1 + 0,05*x_1^2 - 0,07*x_2^2 - 0,07*x_3 - 0,05*x_3^2 - 0,09*x_1*x_3 + 0,06*x_2*x_3$ | 0,72 FPU/mL | 0,0 | 10,0 | 7,5 | 0,42 FPU/mL ± 0,21 | 57,07 | 65,11 |
| 8 | $\text{FPase 72h} = 0,65 - 0,025*x_1 - 0,02*x_1^2 + 0,04*x_2 - 0,08*x_2^2 - 0,09*x_3 - 0,02*x_3^2 + 0,11*x_1*x_2 + 0,02*x_2*x_3$ | 0,82 FPU/mL | 0,0 | 3,5 | 0,0 | 0,33 FPU/mL ± 0,12 | 84,18 | 91,62 |
| 9 | $\text{FPase 96h} = 0,76 + 0,02*x_1 + 0,04*x_1^2 + 0,15*x_2 - 0,05*x_2^2 - 0,02*x_3 - 0,02*x_3^2 + 0,06*x_1*x_2 + 0,05*x_1*x_3$ | 0,95 FPU/mL | 0,0 | 13,1 | 0,0 | 0,88 FPU/mL ± 0,23 | 73,67 | 86,06 |

Tabela 6.3: Resumo dos resultados do ensaio de otimização do meio de cultura para as atividades de FPase, β-glicosidase e xilanase. Estão apresentados os modelos que obtiveram os melhores R-ajustados para cada atividade testada em 72 e 96 horas de cultivo submerso, a atividade prevista pelo modelo, a atividade da validação do modelo, as composições otimizadas calculadas. 1: Sacarose; 2: Celulose; 3: **Farelo de Trigo**. Valores reais em g/L.

| Meio | Modelos gerados pela análise estatística | Atividade prevista pelo modelo | Composição otimizada (g/L) | | | Atividade Validada Experimentalmente | R-ajust % |
|------|---|--------------------------------|----------------------------|-------|-------|--------------------------------------|-----------|
| | | | 1 | 2 | 3 | | |
| 1 | $\text{FPase 72 h} = 0,57 - 0,02*x_1 - 0,02*x_1^2 + 0,08*x_2 - 0,08*x_2^2 - 0,05*x_3 - 0,03*x_3^2 - 0,03*x_1*x_3$ | 0,62 FPU/mL | 5,49 | 15,13 | 0,47 | 0,66 ± 0,14 FPU/mL | 89,55 |
| 2 | $\text{FPase 96 h} = 0,52 + 0,13*x_2 - 0,03*x_2^2 - 0,02*x_3 + 0,02*x_3^2 + 0,05*x_1*x_2 - 0,04*x_1*x_3 + 0,02*x_2*x_3$ | 0,98 FPU/mL | 0,00 | 20,00 | 15,00 | 0,96 ± 0,21 FPU/mL | 86,9 |
| 3 | $\beta\text{-glicosidase 72 h} = 1,24 - 0,05*x_1 - 0,07*x_1^2 - 0,05*x_2 - 0,24*x_2^2$ | 1,24 U/mL | 3,25 | 8,88 | 0,00 | 2,54 ± 0,33 U/mL | 68,22 |

| | | | | | | | |
|---|---|-------------|------|-------|-------|-------------------|-------|
| 4 | $\beta\text{-glicosidase 96 h} = 1,63 + 0,16*x_2 - 0,22*x_2^2 + 0,08*x_3 + 0,08*x_3^2 + 0,11*x_2*x_3$ | 2,15 U/mL | 0,00 | 14,37 | 15,00 | 2,24 ± 0,18 U/mL | 80,11 |
| 5 | $\text{Xilanase 72 h} = 100,40 - 5,28*x_1 - 5,15*x_1^2 - 5,37*x_2 - 10,31*x_2^2 + 3,15*x_3$ | 107,75 U/mL | 2,43 | 7,40 | 15,00 | 92,00 ± 4,94 U/mL | 71,25 |

No procedimento adotado, os coeficientes foram sendo eliminados do modelo enquanto o valor do coeficiente de determinação ajustado (R^2 ajustado) aumentava. Neste caso, os melhores valores de R^2 ajustado dos modelos foram os apresentados nas Tabelas 6.2 e 6.3. Todos os modelos apresentados nas Tabelas 6.2 e 6.3 passaram por dois testes F (da regressão e da falta de ajuste), sendo considerados significativos a 95 % de confiança. O uso dos modelos para maximizar as atividades foi realizado com o auxílio da sub-rotina *SOLVER* do Excel (COSTA, *et. al.*, 2016 b). Após a otimização dos modelos codificados, apresentados nas Tabelas 6.2 e 6.3, foi realizada a decodificação das concentrações ótimas ditadas pelo modelo otimizado através da equação de decodificação ($x=(v-pc)/\delta$; onde x é o valor codificado ótimo gerado; v é o valor decodificado calculado; pc é o ponto central; e δ é o valor de variação). Os valores de δ são calculados como a diferença entre os níveis e o ponto central) (Tabela 6.2 e 6.3). Os valores de concentrações de ingredientes apresentados nas Tabelas 6.2 e 6.3 são os valores otimizados e decodificados derivado dos modelos codificados apresentados também nas Tabelas 6.2 e 6.3.

Na Tabela 6.2, o meio 1, determinado pela otimização do modelo para maximizar a atividade de β -glicosidase em 48 h, é composto por 0, 12 e 14,03 g/L de sacarose, celulose e farelo de soja, respectivamente. O modelo prediz que o cultivo deste meio leva à atividade de β -glicosidase de 2,22 U/mL em 48 h. A realização do ensaio experimental usando esta composição de meio levou à uma atividade de β -glicosidase de 0,46 U/mL em 48 h de cultivo.

Em muitos meios contendo farelo de soja (Tabela 6.2) foi observada uma variação muito grande no pH do meio de cultivo, de forma que em muitos casos o valor experimental não reproduz a predição do modelo (valores de pHs não apresentados). Já

foi reportado pela literatura que a presença de farelo de soja desregula de forma significativa o pH em meios de cultivo com o mesmo fungo (COSTA, *et. al.*, 2016 b). Isto não aconteceu quando se usou farelo de trigo (Tabela 6.3) e na Tabela 6.2 os ensaios cujos meios otimizados não tinham farelo de soja tendem a ter valores experimentais mais próximos aos preditos.

O farelo de trigo melhor induziu a produção das glicohidrolases se comparado com o farelo de soja, pois ele possui em sua composição 40,59 % de celulose, contra 14,93 % para o farelo de soja. A fração proteica contida no farelo de soja é de 44,13 % enquanto que a fração proteica do farelo de trigo é de 15,52 %, sendo a principal vantagem do farelo de soja com relação ao farelo de trigo (ROSTAGNO, *et. al.*, 2005). Porém, a grande quantidade de proteínas encontrada no farelo de soja contribuiu para desregular o pH do meio, e isso afetou de forma negativa a produção de enzimas (COSTA, *et. al.*, 2016 b).

Nas Tabelas 6.2 e 6.3 é possível observar que a celulose (x_2) é necessária para a indução de todas as atividades em todos os tempos de cultivo, demonstrando a importância de fontes que contêm alta concentração de celulose no cultivo destes microrganismos para melhorar a indução das glicohidrolases (Tabela 6.2 e 6.3).

Farelo de soja é importante no tempo de 48 horas para a atividade de FPase, porém em 72 e 96 horas de cultivo sua presença não demonstrou influência (Tabela 2).

Para a indução de xilanase, o farelo de soja é muito importante, sendo requerido nos tempos iniciais e tardios de cultivo, sugerindo que sua presença esteja relacionada com a indução direta desta enzima, provavelmente porque em sua composição está presente uma representativa porcentagem de hemiceluloses (12,58 %) (ROSTAGNO *et. al.*, 2005). A presença de hemicelulases é crucial para induzir as hemicelulases, neste caso direcionada para a atividade de xilanase, sendo que a fonte de celulose (CEL) utilizada não possui fração hemicelulósica. Para a atividade de β -glicosidase o farelo de soja foi requerido somente nos tempos de 48 e 72 horas de cultivo, não sendo necessário no tempo de 96 horas de cultivo (Tabela 6.2).

Nos meios otimizados para a atividade de xilanase, tanto utilizando o farelo de trigo como o farelo de soja, a presença destes farelos se fez necessária (Tabela 6.2 e 6.3).

Este resultado corrobora os apresentados por Costa *et. al.*, (2016 a), mostrando que a parte hemicelulolítica destes farelos é importante para a indução das xilanases.

Na literatura, a utilização de sacarose como indutor de algumas celulases não segue uma regra e varia de acordo com o microrganismo analisado. Por exemplo, em *T. harzianum*, Delabona *et. al.*, (2012 a e b) encontraram um efeito positivo da sacarose para a indução de β -glicosidases. Porém, o efeito da sacarose foi negativo para indução de atividades celulolíticas para o fungo *P.echinulatum* (COSTA *et. al.*, 2016 a). Neste caso, a sacarose não entrou na composição do melhor meio de cultura obtido por esse trabalho.

Assim como para a indução de FPase e xilanase, para a indução de β -glicosidase a celulose é importante em todos os tempos, sugerindo a presença de celulose pura como um forte indutor de celulases. Este resultado se reproduz em outros trabalhos encontrados na literatura, para esse mesmo fungo (DELABONA, *et. al.*, 2012 a e b e 2013).

A sacarose induziu somente a produção de β -glicosidase e xilanase em tempos tardios de cultivo (Tabela 6.2).

No meio contendo farelo de trigo (Tabela 6.3), a sacarose é requerida somente nos primeiros tempos de cultivo, em tempos maiores ela não é requerida, provavelmente pois a quantidade de glicohidrolases no meio, neste tempo, já é a suficiente para a liberação dos açúcares da hidrólise da celulose. Neste caso, a sacarose não foi necessária para atender a demanda energética do fungo, não requerendo adição de sacarose para o crescimento e manutenção deste fungo.

Para a indução de β -glicosidase a adição de farelo de trigo não foi importante nos primeiros tempos de cultivo. Em tempos maiores, este ingrediente foi importante, resultado parecido à indução da atividade de FPase (Tabela 6.3). O que sugere novamente que a contribuição do farelo de trigo, neste caso, está mais relacionada com a sua carga proteica e não com o seu conteúdo celulósico (AHMED & VERMETTE, 2008; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Para a indução de xilanase o farelo de trigo é muito importante, sendo requerido nos tempos iniciais e tardios de cultivo, na maior concentração testada por esse trabalho. É importante ressaltar que a principal

porcentagem de hemiceluloses dentre os componentes usados está contido nos farelos de trigo e de soja.

O meio otimizado para a atividade de β -glicosidase em 96 horas de cultivo foi o mais eficiente para hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar BED, concordando com as conclusões de Costa *et. al.*, (2016 a), onde foi realizada essa metodologia para o fungo filamentososo do gênero *Penicillium* e verificado que os meios melhorados direcionados pela atividade de β -glicosidase alcançaram melhores potenciais de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado BED. Este resultado sugere que o mecanismo de indução destas enzimas está relacionado com a composição do meio, e pode ser parecido para diferentes gêneros de fungos filamentosos. Mostra também que o direcionamento da metodologia para atividades chaves do processo pode melhorar os resultados finais de aplicação desta técnica e facilitar o trabalho.

Para escolher apenas um meio de cultura cujos componentes induzam uma maior quantidade de glicohidrolases que possuem um maior potencial de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar, foram usados os valores de BCase para todos os modelos apresentados nas Tabelas 6.2 e 6.3, nos tempos de 48, 72 e 96 horas de cultivo submerso (Figuras 6.1 a 6.2).

Figura 6.1: Valores de BCase dos sobrenadantes dos meios otimizados com farelo de soja, em diferentes tempos de cultivo. Numerações de 1-9, meios apresentados na Tabela 6.2 para o planejamento utilizando farelo de soja. Numeração 10, meio otimizado por Delabona *et. al.*, (2012). A) Cultivo em pH 5. B) Cultivo em pH 4,2.

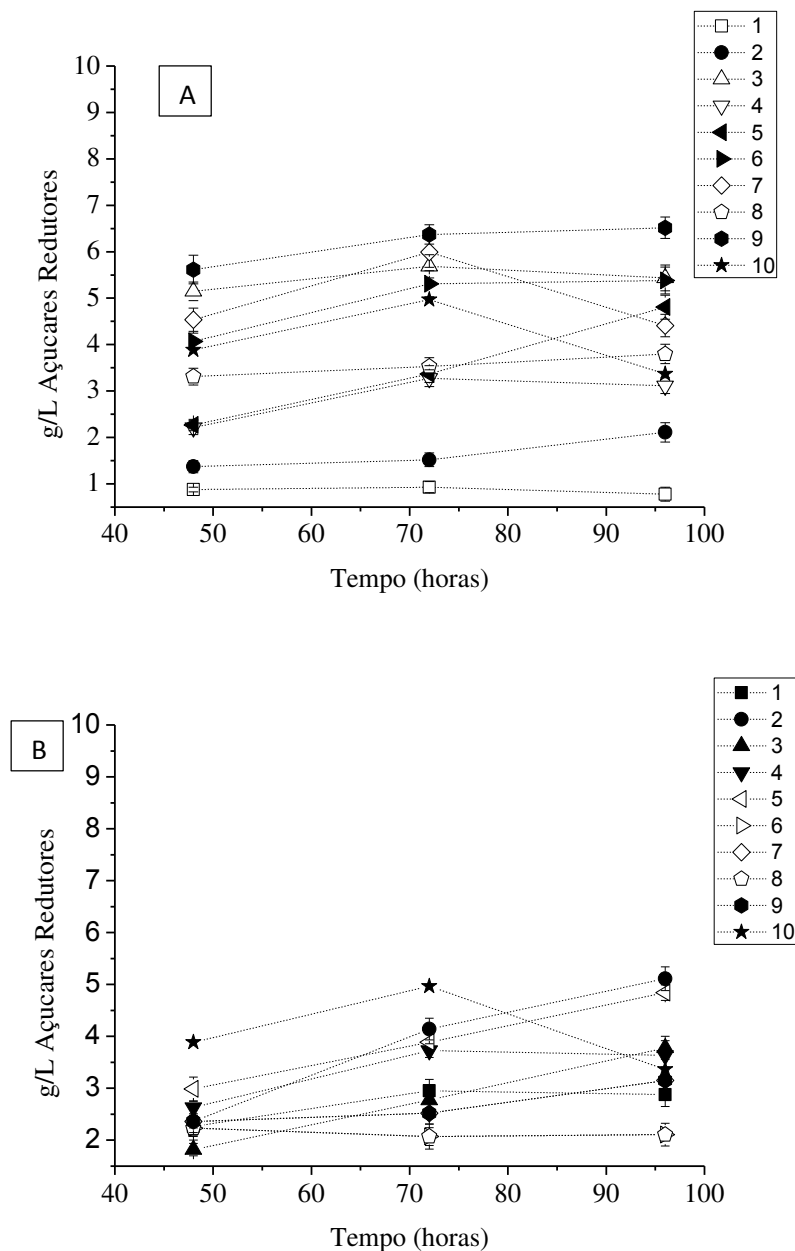
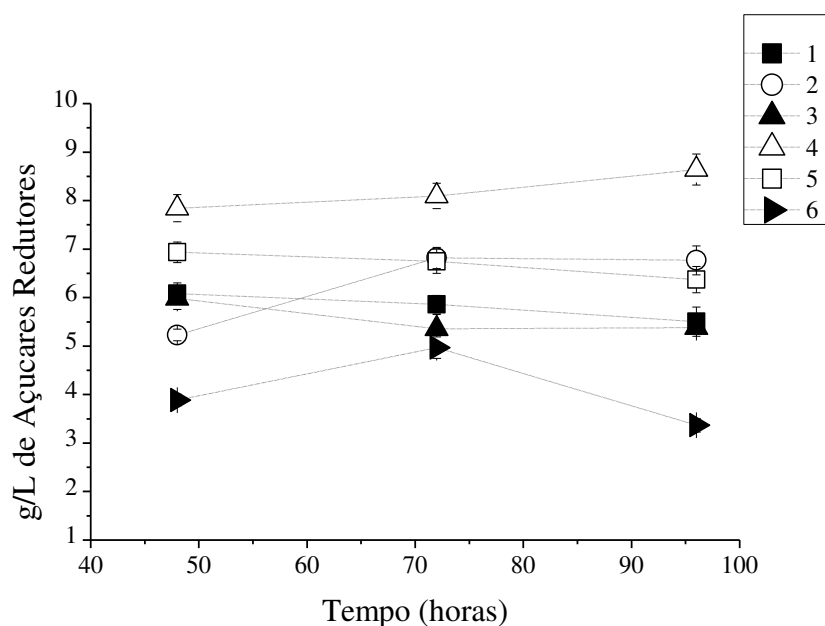


Figura 6.2: Valores de BCase dos sobrenadantes dos meios otimizados com farelo de soja, em diferentes tempos de cultivo, em pH 5. Numerações de 1-5, meios apresentados na Tabela 6.3 para o planejamento utilizando farelo de trigo. Numeração 6, meio otimizado por Delabona *et. al.*, (2012).



A Figura 6.1 apresenta o resultado do cultivo dos meios otimizados apresentados na Tabela 6.2. Os meios 3 e 9 apresentaram os melhores resultados em valor de BCase nos diferentes tempos de cultivo submerso, para o cultivo em pH 5 (Figura 6.1 A). A composição destes meios (Tabela 3.2) é basicamente celulose e sacarose no meio 3, e somente celulose no meio 9. Neste caso, os meios que apresentaram o componente farelo de soja em sua composição, tiveram baixo valor de BCase, consequência da desregulação do pH de cultivo causado por excesso de proteínas contidos nesse ingrediente. Nestes meios o pH subiu para valores acima de 6 e com isso o valor de BCase foi baixo (dados de pH não apresentados) (Figura 6.1 A). A desregulação do pH pelo componente farelo de soja foi também evidenciada por Costa *et. al.* (2016 b).

Para confirmar a escolha dos meios 3 e 9 foram feitos cultivos com os 9 meios e também com o otimizado por Delabona *et. al.*, (2012), objetivando melhores resultados quando se começa o cultivo em pH ajustado para 4,2 (Figura 6.1 B).

Foi verificado que o cultivo utilizando um pH inicial de 4,2 aumentou o valor de BCase para os meios 1, 2 e 4 (Figura 6.1 A e B), porém diminuiu fortemente a liberação de ART alcançada nos meios 3 e 9 (Figura 6.1 A e B). Embora o cultivo em pH 4,2 tenha melhorado o valor de BCase de vários meios otimizados utilizando o farelo de soja, o cultivo em pH 5 para os meios 3 e 9 ainda permaneceram com melhores resultados quanto a liberação de açúcares redutores (BCase), acima de 5 g/L, em 48 h de cultivo. Enquanto que em pH igual a 4,2 a atividade não ultrapassou 5 g/L de ART, para todos os cultivos testados nesta condição.

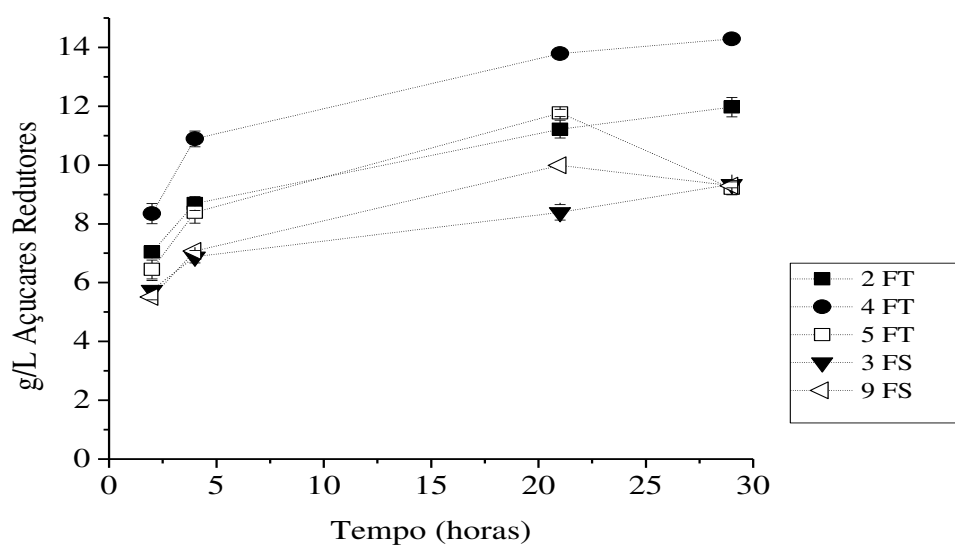
Os meios otimizados utilizando o farelo de trigo levaram a melhores resultados do que os meios otimizados por Delabona *et. al.*, (2012) (Figura 6.2). Todos os meios otimizados apresentaram liberação acima de 5 g/L de açúcares redutores, neste caso não houve alteração do pH do cultivo (Figura 6.2). A Figura 6.2 revela que o meio 4 é o que leva a maior liberação, 8 g/L, de ART comparado aos outros meios estudados por este trabalho (Figura 6.2). Este meio possui em sua composição farelo de trigo e celulose.

6.3.2. Hidrólise dos melhores meios em uma escala cem vezes maior

Pela não definição de um único meio de cultura ótimo para esse fungo, alguns dos meios de cultura foram escolhidos para serem reproduzidos em escala maior, sendo que agora a hidrólise foi realizada por mais tempo. A Figura 6.3 mostra os resultados da hidrólise de BED para os diferentes meios de cultura.

Na Figura 6.3 pode-se ver que, assim como na Figura 6.2, o meio 4 apresentou o melhor resultado de hidrólise obtido neste trabalho. Portanto este será o meio escolhido para o cultivo deste microrganismo nos próximos trabalhos. O extrato de 120 horas de cultivo do fungo no meio 4 apresentou uma liberação de 14 g/L de açúcares redutores em aproximadamente 20 horas de hidrólise (Figura 6.3), enquanto que os demais não atingiram 12 g/L de açúcares redutores liberados no mesmo tempo de hidrólise.

Figura 6.3: Evolução da hidrólise do BED dos extratos dos melhores meios otimizados, com farelo de trigo (2 FT; 4FT; 5FT; Tabela 6.3) e com farelo de soja (2 FS; 9 FS; Tabela 6.2), em 120 horas de cultivo em pH 5. Hidrólise em diferentes tempos, em uma escala 100 vezes maior que a atividade BCase.



6.3.3. Substituição do ingrediente celulose pura do meio de cultura por bagaço de cana de açúcar pré-tratado

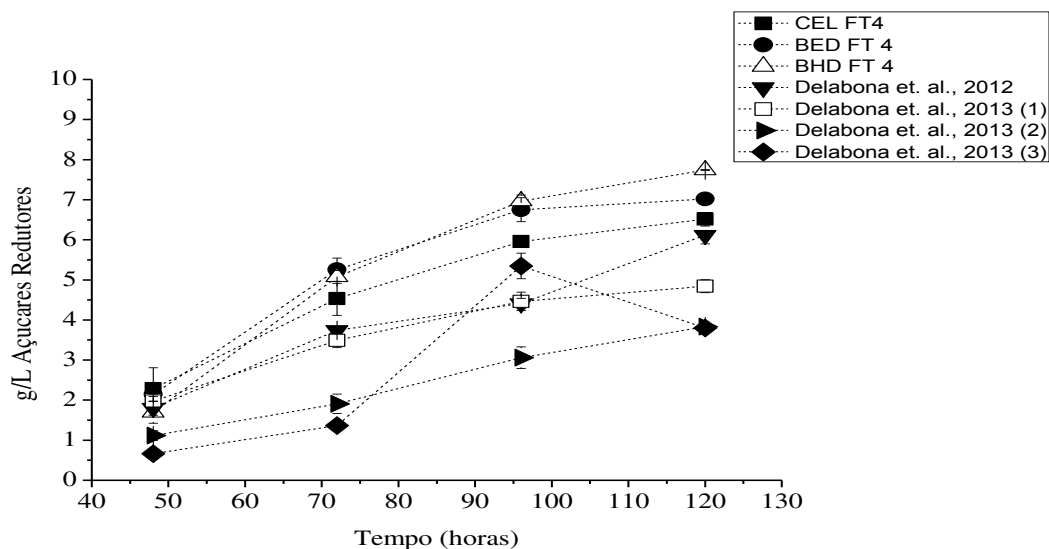
É importante substituir fontes de celulose pura por fontes de materiais lignocelulósicos no meio de cultivo. A substituição diminui o custo do processo e força a maquinaria celular do fungo para a produção de enzimas que degradam o próprio material a ser utilizado na hidrólise. Se o fungo não tiver nenhuma inibição quanto à lignina do meio, a utilização de materiais lignocelulósicos para a indução da produção só traz vantagem, pois a deslignificação do material encarece o processo. Estudos anteriores realizados por Delabona *et. al.*, (2013 e 2012) nos mostram vantagens da substituição da fonte indutora de celulase, celulose pura, por material lignocelulósico BED para o mesmo fungo utilizado neste trabalho. Os trabalhos publicados Delabona *et. al.*, (2013 e 2012) sugerem que este fungo tenha preferência por materiais que não possuem lignina, pois quando o fungo foi

cultivado utilizando bagaços pré-tratados não deslignificados, o mesmo apresentou baixa produção das glicohidrolases. Por isso foi realizado o estudo do cultivo com os materiais BED e o BHD para substituir a CEL do meio otimizado, sendo que esses dois bagaços passaram pela etapa de deslignificação. Além disso, para definir corretamente qual meio de cultura final a ser escolhido para se trabalhar com esse fungo, foram feitos cultivos com todas as formulações ótimas determinadas na literatura por Delabona *et. al.*, (2012 e 2013) para o mesmo fungo em estudo (Figura 6.4).

Os resultados apresentados pela Figura 6.4 confirmam que o melhor meio de cultura foi o desenvolvido por esse trabalho (FT 4, Tabela 6.3), utilizando como fonte de celulose os bagaços BED ou BHD. O meio FT4 utilizando BHD como fonte de celulose levou a maior liberação de ARTs para todos os tempos de cultivo (Figura 6.4).

Foi observado que a liberação de ART nos tempos iniciais de cultivo para esses meios (Figura 6.4) foi bem menor que a apresentada nas Figuras 6.1 e 6.2. Neste caso, a utilização de PDA para o desenvolvimento dos esporos para esse experimento nos evidenciou uma forte mudança no metabolismo de produção das glicohidrolases por esse fungo. Para o resultado da Figura 6.4, o meio para o desenvolvimento dos esporos foi o PDA, enquanto que para os outros cultivos utilizou-se ágar-celulose (Figuras 6.1, 6.2 e 6.5), por isso o fungo já começou a produzir nos primeiros tempos de cultivo uma grande quantidade de glicohidrolases.

Figura 6.4: Atividade de BCase do sobrenadante dos diferentes meios de cultura em diferentes tempos de cultivo para o fungo em estudo



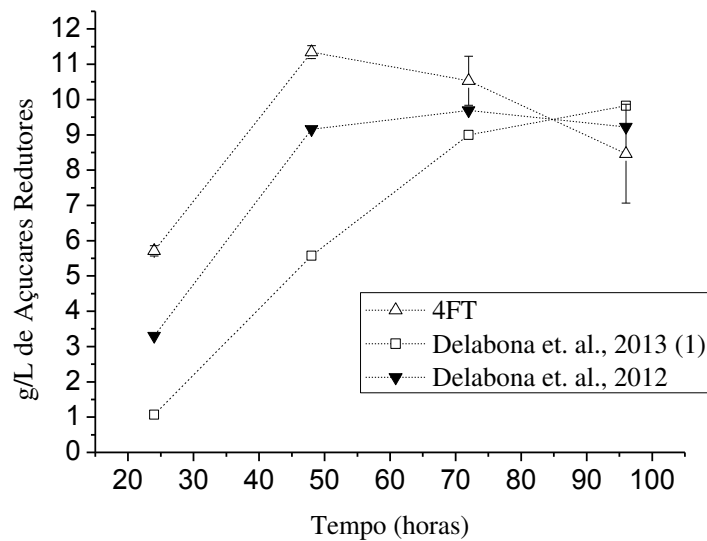
6.3.4. Cultivo em biorreator para definir o melhor meio de cultura

O cultivo em biorreator é necessário para ampliar a escala do processo e controlá-lo de forma mais eficiente. Foi realizado o cultivo do melhor meio de cultura selecionado nos itens anteriores, o meio FT4 (meio 4, Tabela 6.3). Foram realizados experimentos com o meio de cultivo otimizado por Delabona *et. al.* (2013 (1) e 2012), como descrito anteriormente. Foi verificado que o meio FT4 desenvolvido nesse trabalho teve melhor desempenho para induzir as enzimas glicohidrolases (Figura 6.5 A-D). Para todas as atividades testadas, o meio FT4 obteve melhor desempenho (Figura 6.5 A-D), produzindo também uma maior quantidade de proteínas totais (Figura 6.5 E). O perfil de produção em biorreator foi um pouco diferente que o perfil em frascos agitados para o meio FT4, sendo que em biorreator o pico de liberação de ART foi em 48 e 72 horas, liberando 11 g/L de ART, em duas horas de hidrólise (BCase), enquanto que em frascos agitados o pico de atividade alcançou no máximo 8 g/L de ART liberados da atividade de BCase para todos os tempos de cultivo.

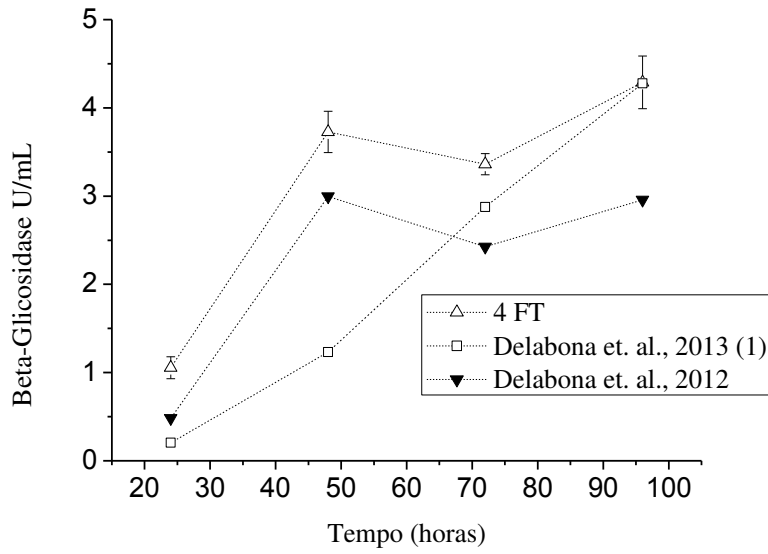
Para a escolha do melhor meio de cultura pôde-se chegar à mesma conclusão para os experimentos realizados em frascos agitados e em biorreator, porém os experimentos realizados em biorreator alcançaram uma maior atividade das glicohidrolases (Figura 6.4 e 6.5).

Figura 6.5: Atividades quantificadas em diferentes tempos de cultivo para o cultivo do fungo *T. harzianum* estudo em biorreatores de cultivos submersos, para os diferentes meios de cultura (4FT, Delaboba *et. al.*, 2012 e 2013). Substratos: BCCase (A), PNPg (B), xilana (C), papel de filtro (D) e da produção de proteína totais (E).

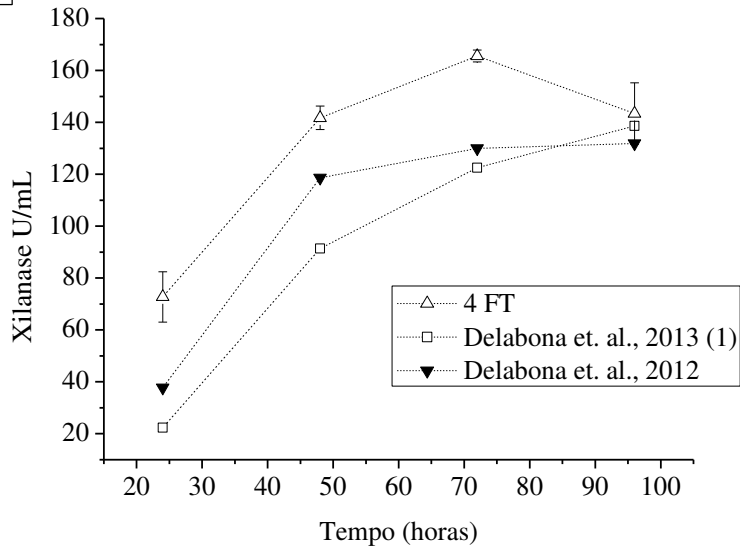
A

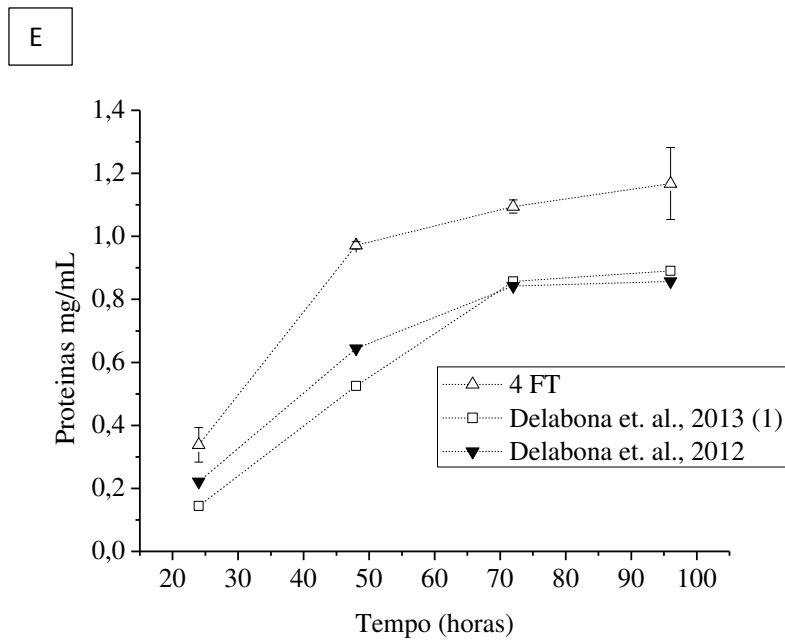
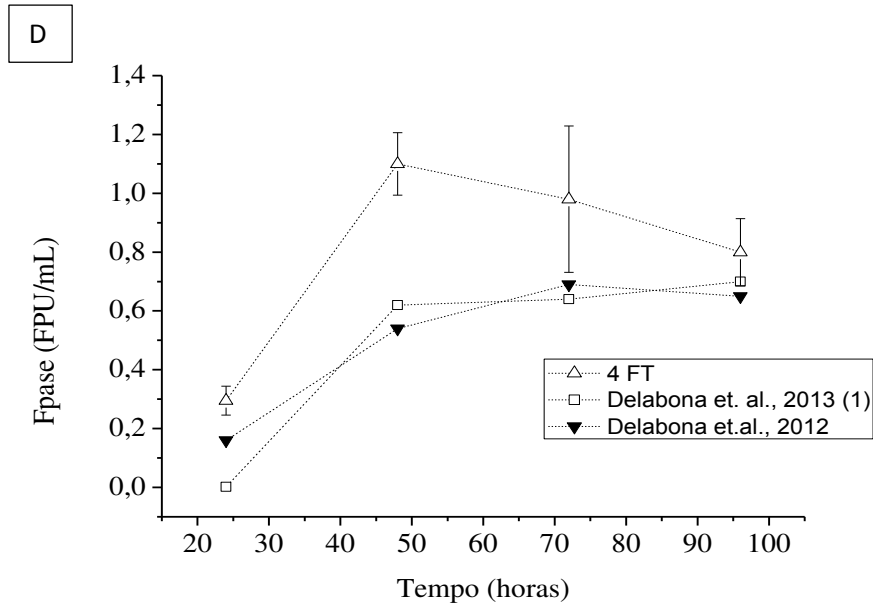


B



C





A sensibilidade de captar as formas de indução das glicohidrolases pelos componentes do meio de cultura, com base na composição dos nutrientes e das enzimas que se pretende induzir, fez desta técnica atrativa para se começar a trabalhar com fungos filamentosos indutores de celulases. Percebe-se que conclusões parecidas podem ser alcançadas usando dois diferentes tipos de planejamentos estatísticos, fracionado e completo, respectivamente, para dois diferentes fungos, *Penicillium* (COSTA, *et. al.*, 2016 a) e *T. harzianum*.

Dados mais recentes, encontrados na literatura para *T. harzianum*, nos apresentam resultados relevantes com relação ao processo de produção das celulases. Delabona *et. al.*, (2016) verificou que a realização de um pré-crescimento em glicerol seguido de indução for fontes de celulose seria uma boa alternativa para aumentar a atividade para esse fungo. A autora conseguiu uma atividade de 2,27 FPU/mL com esse processo, em cultivo submerso em Biorreator. Este resultado foi extremamente relevante para esse fungo que não ultrapassava a barreira de 1,2 FPU/mL. A utilização de combinações do processo desenvolvido pela autora em conjunto com o meio ótimo aqui desenvolvido poderia ser uma alternativa para alcançar resultados ainda mais relevantes para essa cepa.

A seleção de componentes de meio no estado inicial do melhoramento do meio de cultura para um fungo novo é de grande importância. Essa técnica permite que grandes quantidades de nutrientes sejam testadas em conjunto, em um mesmo bloco de experimentos. Isso não é possível quando se utiliza reatores de bancada, sendo a realização em frascos agitados de maior praticidade, possibilitando trabalhar com um alto número de experimentos onde se pode chegar em conclusões mais rápidas e reprodutíveis em maiores escalas.

6.4. Conclusão

Foi desenvolvida uma nova proporção de reagentes necessários para melhorar a indução das glicohidrolases produzidas pelo fungo em estudo. O meio que resultou em uma maior atividade de BCCase possui em sua composição 14,37 g/L de BED ou BHD, 15 g/L de farelo de trigo, 0,1 % de extrato de levedura, 0,1 % (v/v) de *Tween 80* e 10 % (v/v) de solução salina. Esta composição apresentou maior atividade de BCCase em aproximadamente duas vezes, comparada com as proporções anteriormente otimizadas pela literatura para esse fungo. Este trabalho pode auxiliar outros trabalhos de melhoramento de meio de cultura para outros fungos filamentosos.

CAPÍTULO 7

7. MÉTODO DE SELEÇÃO EFICIENTE PARA FUNGOS FILAMENTOSOS DESREPRIMIDOS QUANTO A EXPRESSÃO DE GLICOHIDROLASES

RESUMO

Para a obtenção de mutantes hipercelulolíticos pelo método de melhoramento genético clássico de fungos filamentosos, um dos maiores gargalos está na etapa de seleção. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método viável e eficiente de cultivo submerso, visando a seleção de fungos filamentosos desreprimidos para a produção de celulases. Foi utilizado o *Trichoderma harzianum* e as suas variações mutantes para auxiliar o desenvolvimento deste método. Para isso, foram testadas variáveis importantes como métodos de inoculação, diferentes escalas de cultivo submerso, diferentes formulações de meios de cultivo, diferentes formas de aferição da atividade das glicohidrolases, quantidades de inóculo, modo de inóculo e cultivo na presença de diferentes concentrações do repressor catabólico da produção das glicohidrolases, a glicose. A metodologia otimizada para as necessidades do processo foi utilizando cultivo em escala mini, frascos de 50 mL utilizando 20 mL de volume de cultivo. O desenvolvimento dos esporos, para as cepas, foi realizado em 5 mL de ágar-celulose em placas de petri de 5 cm de diâmetro. Para cepas com diferenças nas produções de esporos foi verificada a necessidade de realização do inóculo que também foi realizado em escala pequena. A utilização de 2 % de glicose no meio de produção permitiu a diferenciação de cepas desreprimidas quanto ao gene que controla a expressão das celulases. Esse trabalho pode contribuir para direcionar outros trabalhos de seleção de fungos filamentosos produtores de celulases, objetivando a viabilização do etanol de segunda geração.

7.1. Introdução

A diversidade de métodos aplicados para a seleção de fungos filamentosos hipercelulolíticos encontrados na literatura sugere a necessidade de se utilizar mais de um método de seleção visando aumentar a probabilidade de selecionar um verdadeiro mutante hipercelulolítico (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b; KASAN, *et. al.*, 2008; DILLON, *et. al.*, 2011).

A maioria das pesquisas cadastradas na literatura estão focadas em aumentar a produção dessas enzimas por diferentes metodologias e selecionar microrganismos com melhores potenciais de produção das glicohidrolases. As metodologias mais citadas na literatura são; melhoramentos genéticos desses microrganismos produtores, otimização dos componentes de meio de cultivo e melhoramento do processo de produção para adequar o sistema a escalas industriais (CHAND, *et. al.*, 2005; AZIN & NOROOZI, 2001; KOVACS, *et. al.*, 2009; SHAFIQUE, 2010; DILLON, *et. al.*, 2011; DELABONA, *et. al.*, 2013 e 2012; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b).

No caso específico de melhoramento dos microrganismos produtores de celulasas, a principal dificuldade de realização deste tipo de metodologia é a seleção dos microrganismos realmente diferentes e melhores (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b; KASAN, *et. al.*, 2008; DILLON, *et. al.*, 2011). Esse tipo de melhoramento gera muitas cepas a serem selecionadas, e um método eficiente e prático de seleção pode criar a possibilidade de poucas pessoas concluírem trabalhos tão dispendiosos quanto o melhoramento genético por mutações clássicas (CHAND, *et. al.*, 2005; DILLON, *et. al.*, 2011).

Uma forma de seleção de potenciais mutantes é a observação do tamanho e velocidade do aparecimento de halos de hidrólise ao redor das colônias em meio sólido com a presença do repressor catabólico, como 2-deoxi-D-glicose e/ou pelo consumo de celulose pura presente no meio (SUTO & TOMITA, 2001; MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977; ADSUL, *et. al.*, 2007; CAMASOLA & DILLON, 2010). Entretanto, esse método não seleciona o mutante que é capaz de utilizar materiais lignocelulósicos, o que é uma desvantagem, pois os métodos devem convergirem sempre para o processo real. Porém, o meio sólido em uma composição adequada é crucial para a pré-seleção

dos mutantes, onde já se pode eliminar uma grande parte das células que apresentam características indesejáveis para o processo (ADSUL, *et. al.*, 2007; CAMASOLA & DILLON, 2010).

Os cultivos em meio líquido são importantes como método de seleção, pois traduzem, mesmo em pequena escala, o processo real de produção destas enzimas, ao contrário da seleção em meio sólido (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b; KASAN, *et. al.*, 2008; DILLON, *et. al.*, 2011; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). A utilização de um meio de cultura apropriado nos auxilia na identificação de um mutante verdadeiro e promissor (CAMASOLA & DILLON, 2010; DILLON, *et. al.*, 2011).

Entretanto, várias divergências são encontradas na literatura a respeito do melhor método de seleção, e a atenção a essas metodologias se deve ao fato de que ao se optar por um método inadequado o trabalho se compromete inteiramente (COSTA, *et. al.*, 2014).

Com base no exposto acima, o presente trabalho busca um método de mini cultivo para seleção eficiente de mutantes vindos de mutações clássicas, que pode ser estendido para a seleção de vários outros mutantes ou fungos filamentosos produtores de celulases. Os fungos utilizados como modelos para o desenvolvimento deste método foi o *T. harzianum* originalmente isolado por Delabona *et. al.*, (2012), e suas variações mutantes desenvolvidas neste trabalho (COSTA *et. al.*, 2014 a).

O trabalho desenvolvido no capítulo 5 demonstra que a seleção de microrganismos pela medida de BCase utilizando o substrato BED possui uma maior capacidade de seleção, a 95 % de confiança de acordo com o teste de Tukey, para cepas com pequenas diferenças na capacidade de produção das glicohidrolases, sendo mais sensível que a atividade comumente realizada utilizando o papel de filtro como substrato (FPase) (GHOSE, 1987). Apresenta ainda, a vantagem de ser um substrato igual ou muito parecido ao substrato que será hidrolisado em escala industrial. Com base neste estudo, este método foi aplicado neste trabalho, para auxiliar o desenvolvimento de um método de seleção totalmente direcionado para as necessidades do processo de hidrólise.

O método desenvolvido visa facilitar o trabalho de muitas pessoas que até hoje utilizam metodologias dispendiosas para realizar essa tarefa. O trabalho demonstra o passo a passo da linha de pensamento utilizada, até determinar uma maneira eficiente

de seleção, para atender a todas as necessidades requeridas para a seleção de um mutante adequado.

7.2. Metodologia

7.2.1. Microrganismos

O fungo empregado neste trabalho é o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* P49P11 (Selvagem) (DELABONA, *et. al.*, 2012 a). As demais cepas utilizadas nesse trabalho foram produzidas por mutação clássica utilizando o reagente químico EMS (Etil Metil Sulfonato) de acordo com Costa *et. al.*, (2014).

7.2.2. Desenvolvimento do método

7.2.2.1. Cultivo utilizando frascos agitados de diferentes tamanhos, diferentes métodos de inoculação e diferentes meios de culturas

Os recipientes utilizados para esse experimento foram *Erlenmeyers* de 500 e 50 mL, sendo testados os volumes de 200 mL e 20 mL, respectivamente, de meio de produção para a seleção em cultivo submerso. Para os dois recipientes foram testadas quatro condições, em triplicata.

A primeira e a segunda condição foi utilizando um inóculo. Para o preparo do inóculo, a cepa foi repicada em placa de Petri, de tamanho padrão, contendo 25 mL de PDA, e incubada a 29 °C em estufa por 7 dias para o crescimento dos esporos. Em seguida, 20 mL da solução de *Tween 80* 0,1 %, estéril, foram utilizados para a captação dos esporos na placa de Petri e 20 mL dessa suspensão de esporos foram inoculados em 200 mL de meio de inóculo (*Celufloc* 200 10 g/L, Glicose 10 g/L, peptona 1 g/L, 10 % de solução salina 20 x concentrada empregada por Mandels e Reese (1957), 0,1 % de *Tween 80*). Este inóculo foi incubado em estufa rotativa por 72 horas a 29 °C a 200 rpm. Posteriormente, 2 mL e 20 mL do inóculo foram inoculados em frascos de 50 e 500 mL,

respectivamente, cujos volumes de cultivo foram de 20 e 200 mL, respectivamente, sendo testados os meios 1 (10 g/L de BED, 3 g/L de extrato de levedura e 50 mL/L de solução de sais 20 x concentrada empregada por Mandels e Reese (1957)) (**Condição 1**) e 2 (7 g/L BED, 3g/L de sacarose, 1g/L de peptona e 50 mL/L de solução de sais 20 x concentrada empregada por Mandels e Reese (1957)) (**Condição 2**).

Na segunda e na terceira condição testou-se o inóculo somente por esporos, sem a etapa de inóculo, para o meio 1 (**Condição 3**) e 2 (**Condição 4**). A captura dos esporos da cepa selvagem crescida em PDA, para inocular no meio de produção diretamente, foi realizada utilizando ponteiras p200 e p1000, com a ponta cortada, tendo diâmetros de 0,5 e 1 cm, respectivamente, de volumes de esporos inoculados. Desta forma, os esporos foram inoculados diretamente no meio de produção das celulases, em frascos *Erlenmeyers* de 50 e 500 mL, utilizando 20 mL e 200 mL de volume de cultivo, respectivamente. Estas culturas foram agitadas em estufa rotativa a 200 rpm por 72 horas à uma temperatura de 29 °C.

Amostras de 2 mL foram retiradas nos tempos de 48 e 72 horas de cultivo submerso e centrifugadas (10000 x g, 20 minutos, 10 °C), sendo o sobrenadante reservado para a quantificação da atividade de FPase segundo Ghose (1987), expressa em FPU/mL. Foram calculadas as médias das atividades das triplicadas dos experimentos e o desvio padrão. Essas medidas foram importantes para a verificação da confiabilidade de reprodução deste método.

7.2.2.2. Inóculo de uma maior quantidade de esporos, substituição do meio sólido de crescimento dos esporos, utilização de uma maior concentração de celulose no meio de cultivo submerso

Nesta etapa foram utilizadas cepas advindas de mutação por EMS, obtidas anteriormente (COSTA *et. al.*, 2014 a). Elas foram repicadas em placas de Petri de tamanho menor que o convencional (5 cm de diâmetro), contendo 5 mL de meio ágar-celulose, e incubadas a 29 °C em estufa por 7 dias para o crescimento dos esporos.

O meio ágar-celulose foi formulado segundo estudos de Camassola & Dillon, (2010), adaptado, tendo em sua composição 1 % (p/v) *Swollen Celufloc* 200 (Celuflok Industrial e Comercial de Celulose Ltda., Brasil), 0,1 % (p/v) extrato de levedura (Sigma-Aldrich), 0,1 % (p/v) sacarose (Alamar Tecno Científica Ltda., Brasil), 10 % (v/v) solução de sais minerais 20 x concentrada empregada por Mandels e Reese (1957), 2 % (p/v) ágar. A celulose utilizada no meio ágar-celulose é a *Swollen celufloc*, que é uma celulose que possui uma homogeneização mais eficiente em solução comparada com a *Celufloc* comum. O preparo da *Swollen* foi realizado da seguinte maneira: 5 g de celulose *Celufloc* 200 (*Celufloc* Industrial e Comercial de Celulose Ltda., Brasil) foram solubilizadas em 200 mL de água destilada, juntamente com 20 g de esferas de vidro e mantidas em frascos agitados a 29 °C e 200 rpm por 7 dias (CAMASSOLA & DILLON, 2010; DILLON, *et. al.*, 2011).

Em seguida, 2 mL de solução de *Tween 80* 0,1 %, estéril, foram utilizados para a captação dos esporos na placa de *Petri* e 2 mL dessa suspensão de esporos foram inoculados em frascos de 50 mL contendo 20 mL do meio 2, descrito anteriormente e selecionado pelo experimento do item 7.2.2.1, agora utilizando o dobro de celulose (BED 14 g/L, sacarose 3 g/L, peptona 1g/L, 10 % de solução salina 20 x, 0,1 % de *Tween 80*), para induzir maior expressão das celulases. Esses cultivos foram agitados em estufas rotativas a 29 °C a 200 rpm por 120 horas e amostras de 2 mL foram retiradas nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo submerso, centrifugadas (10000 x g, 20 minutos, 10 °C), sendo o sobrenadante reservado para a quantificação da atividade de FPase segundo Ghose (1987), expressa em FPU/mL, assumido como medida da capacidade de produção de celulases.

7.2.2.3. Re-Introdução da etapa de inóculo e avaliação da substituição da atividade de FPase por BCase

As cepas utilizadas neste item foram as advindas de mutações clássicas por EMS assim como no item 7.2.2.2. Neste caso, escolheu-se uma menor quantidade de cepas (P49P11, 1PCE10, 3PCE6, 1PCE14, 1PCE30, 3PCE17, 2PCE43, 1PCE70 e 2PCE180)

para utilizar como exemplo para o desenvolvimento desta metodologia. Elas foram repicadas em placas de Petri de tamanho menor que o convencional (5 cm de diâmetro), contendo 5 mL de meio ágar-celulose cuja composição está descrita no item 7.2.2.2, e incubadas a 29 °C em estufa por 7 dias para o crescimento dos esporos. Em seguida, 2 mL de solução de *Tween 80* 0,1 %, estéril, foram utilizados para a captação dos esporos na placa de Petri e 2 mL dessa suspensão de esporos foi inoculada em 20 mL de meio de inóculo (*Celufloc 200* 10 g/L, glicose 10 g/L, peptona 1 g/L, 10 % de solução salina 20 x concentrada empregada por Mandels e Reese (1957), 0,1 % de *Tween 80*) (COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Para esse experimento foram utilizados frascos de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura para as diferentes cepas testadas. Os inóculos foram mantidos em estufa rotativa a 29 °C a 200 rpm por 72 horas. Posteriormente 2 mL de cada inóculo foram inoculados em frasco *Erlenmeyer* de 50 mL contendo 20 mL do meio de cultura otimizado por Delabona *et. al.*, (2012) (BED 14 g/L, sacarose 3 g/L, peptona 1 g/L, 10 % de solução salina 20 x, 0,1 % de *Tween 80*) (meio 2), utilizando o dobro de BED, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Esse inóculo foi agitado em estufa rotativa a 29 °C a 200 rpm por 96 horas, neste tempo os cultivos foram finalizados e centrifugados (10000 x g, 20 minutos, 10 °C), sendo o sobrenadante reservado para a quantificação das atividades enzimáticas nos substratos papel de filtro (FPase) e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação (BED) (BCase). Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados estão apresentados em forma de média e desvio padrão.

7.2.2.4. Avaliação da concentração ideal de glicose a ser utilizada no meio de cultivo submerso

Os fungos utilizados como exemplo para realização deste experimento foram as cepas P49P11 (Selvagem), 1PCE10 (primeira geração), 2PCE43 (segunda geração) e 3PCE6 (terceira geração), advindas de diferentes gerações de mutação por EMS (COSTA, *et. al.*, 2014 a). Os experimentos em mini cultivo foram conduzidos da mesma forma que o realizado no item 7.2.2.3, porém neste experimento para cada cepa foram

testadas diferentes concentrações de glicose (0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % e 5 %). A composição do meio de cultivo foi semelhante à do item 7.2.2.3. Esse cultivo foi agitado em estufa rotativa a 29 °C a 200 rpm por 96 horas, e amostras de 2 mL foram retiradas nos tempos de 72, 96, 120 e 144 horas de cultivo submerso e centrifugadas (10000 x g, 20 minutos, 10 °C). O sobrenadante foi reservado para a quantificação de BCase.

7.2.2.5 Verificação da reprodução do experimento do item anterior em diferentes escalas e meio de cultivo

O objetivo deste experimento foi validar o resultado alcançado para o cultivo em mini escala para uma escala cinco vezes superior. Neste caso foi modificado o meio de cultura, para verificar se o meio de cultura influencia na concentração ideal de glicose a se utilizar.

Os procedimentos de cultivo submerso foram realizados das seguintes maneiras: as cepas utilizadas neste experimento foram repicadas em ágar-celulose e incubadas em estufa a 29 °C por sete dias, para o desenvolvimento dos esporos. Em seguida 10 mL de solução de *Tween 80* 0,1 % (v/v), estéril, foram utilizados para a captação dos esporos na placa de Petri e 10 mL dessa suspensão de esporos foram inoculados em 100 mL de meio de inóculo (*Celufloc* 200 10g/L, Glicose 10 g/L, peptona 1 g/L, 10 % de solução salina 20 x, 0,1 % de *Tween 80*). Os inóculos foram mantidos em estufa rotativa a 29 °C a 200 rpm por 72 horas. Posteriormente, 10 mL de cada inóculo foram inoculados em frasco *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura otimizado no capítulo 6 (14,37 g/L de BHD, 15 g/L de farelo de trigo, 0,1 % de extrato de levedura, 0,1 % de *Tween 80* e 10 % de solução salina). Foi adicionada uma quantidade de glicose 40 % estéril de modo que fossem testadas as concentrações de 0 %, 0,5 %, 1 %, 2 % e 4 %, para as quatro cepas utilizadas como exemplo para o desenvolvimento desta metodologia (P49P11, 1PCE10, 2PCE43, 3PCE6). Amostras de 5 mL foram retiradas nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo submerso. As amostras foram centrifugadas (4000 x g por 10 min) e o sobrenadante reservado para a posterior medida de BCase. O pH do cultivo foi controlado utilizando tampão biftalato de potássio pH 5 0,1 M (COSTA, *et. al.*, 2016 a e b).

7.2.3. Determinação das atividades enzimáticas

A atividade enzimática contra o papel de filtro (filter paper activity – FPA) foi realizada segundo Ghose (1987), modificada de forma a reduzir a escala da reação em 100 vezes. Os açúcares redutores foram medidos pelo método de Miller (1959) utilizando o reagente DNS, empregando glicose como padrão.

Para a determinação de BCase (em BED) foi utilizada a metodologia desenvolvida no capítulo 5 deste trabalho. Vale ressaltar que para todas as atividades foi realizado o branco da reação, que é a quantificação do açúcar redutor que está presente no extrato enzimático e descontado esse valor no valor total de açúcar redutores liberados durante a determinação da BCase. Esta etapa é importante visto que os cultivos apresentam excesso de glicose. A análise dos hidrolisados do método de BCase foi realizada também utilizando CLAE com sistema equipado com um detector RI-1260 (AGILENT), onde foram analisadas as concentrações de glicose, xilose e celobiose usando uma coluna *Aminex HPX-87h* (BIO-RAD, HERCULES, CA, EUA) equipada com um cartucho de Carbo-P micro-guarda. O valor (BCase) é definido como a quantidade em g/L de açúcares liberados em duas horas de atividade enzimática.

As quantificações das atividades de cada amostra também são realizadas em triplicata, e a média da absorbância é utilizada para calcular a atividade de cada amostra.

7.3. Resultados

7.3.1. Cultivo utilizando frascos agitados de diferentes tamanhos, diferentes métodos de inoculação e diferentes meios de culturas

Para os cultivos em meio 2 utilizando o inóculo (**Condição 2**), tanto para ensaios em *Erlen* de 50 como 500 mL foram alcançadas maiores atividades de FPase (Tabela 7.1). Entre os ensaios realizados utilizando o meio 2, os experimentos realizados em *Erlenmeyer* de 50 mL, onde o inóculo foi realizado somente com esporos, em 72 horas de cultivo (**Condição 4**) foi o que apresentou menor desvio padrão, o que indica que esta condição pode ser usada. Esta seria a melhor opção, pois o *Erlenmeyer* de 50 mL

possibilita um menor gasto de meio e o inóculo por esporos, além de resultar em menor uso de materiais, permite realização do ensaio em menor tempo.

Tabela 7.1: Resultado do cultivo submerso em 48 e 72 horas em *Erlenmeyer* de 50 mL e 500 mL para os meios 1 e 2 e dois diferentes métodos de inoculação, inóculo e esporos. O quadro apresenta a atividade em FPU/mL o desvio padrão e a média. Condição 1 e 2 (Meio 1 e Meio 2 utilizando inóculo); Condição 3 e 4 (Meio 1 e Meio 2 utilizando inóculo diretamente por esporos).

| Meio/inóculo | 48 horas | | 72 horas | |
|--|----------|----------|----------|----------|
| | FPU/mL | DESVPADP | FPU/mL | DESVPADP |
| <i>Erlenmeyer de 500 mL (Cultivo padrão)</i> | | | | |
| Condição 1 | 0,140 | ±0,005 | 0,141 | ±0,011 |
| Condição 2 | 0,251 | ±0,005 | 0,293 | ±0,004 |
| Condição 3 | 0,030 | ±0,002 | 0,030 | ±0,001 |
| Condição 4 | 0,143 | ±0,027 | 0,141 | ±0,017 |
| <i>Erlenmeyer de 50 mL (Mini cultivo)</i> | | | | |
| Condição 1 | 0,036 | ±0,002 | 0,050 | ±0,016 |
| Condição 2 | 0,222 | ±0,003 | 0,225 | ±0,017 |
| Condição 3 | 0,030 | ±0,001 | 0,032 | ±0,003 |
| Condição 4 | 0,160 | ±0,006 | 0,170 | ±0,001 |

7.3.2. Inóculo de uma maior quantidade de esporos, substituição do meio sólido de crescimento dos esporos e utilização de uma maior concentração de celulose no meio de cultivo submerso

Na metodologia anterior, resultados do item 7.3.1, foi utilizado o meio de PDA para o crescimento dos esporos para o fungo selvagem. Neste caso, optou-se por modificar essa metodologia substituindo o meio PDA pelo meio ágar-celulose. A presença de celulose, já na etapa de crescimento dos esporos do fungo, pode deixá-los melhores adaptados para o consumo da mesma (ADSUL, *et. al.*, 2007; CAMASOLA & DILLON, 2010).

Outra adaptação que foi utilizada neste item foi a utilização de mini placas de Petri (5 cm de diâmetro) para o crescimento dos esporos em ágar-celulose, sendo que todo o volume de esporos contido neste recipiente foi despejado em mini *Erlens* para a condução dos mini cultivos. Neste caso, não há perda na quantidade de esporos inoculados, o que acontecia quando se utilizavam ponteiras com as pontas cortadas. Além disso, há uma padronização a mais na metodologia, pois as mini placas sempre possuirão o mesmo volume de crescimento, para todos os fungos empregados. Outra vantagem das mini placas de Petri é de se inocular uma maior quantidade de esporos no cultivo, e isso pode contribuir para aumentar a quantidade de celulasas produzidas pelos fungos a serem selecionados por essa metodologia, melhorando a eficácia do método.

Para verificar se essas modificações conseguiram aumentar o título de FPase e perceber maiores diferenças nas produções de cepas mutadas por EMS, os experimentos foram conduzidos e os resultados estão apresentados na Tabela 7.2.

Os títulos das atividades ficaram maiores utilizando as adequações citadas na metodologia, sendo que títulos de 0,17 FPU/mL em média foram alcançados pela metodologia não modificada apresentada na Tabela 7.1. Depois das adaptações realizadas nesse tópico, as atividades alcançadas foram para em média 0,4 FPU/mL (Tabela 7.2), onde já se percebe uma melhora maior que 100 % com relação à resposta do método. Porém, a Tabela 7.2 nos mostra diferenças muito pequenas de atividade de

FPase entre as cepas, sendo ainda um pouco difícil de selecionar os mutantes que realmente se destacaram.

Por essas cepas serem as selecionadas de diferentes rodadas de mutação por EMS, algumas não apresentaram esporos, principalmente as cepas advindas da segunda e terceira geração de mutantes, onde foram propositalmente selecionadas. Cepas que perderam a capacidade de produção de esporos são interessantes pois podem apresentar o seu DNA mais danificado que as demais, devido à importância desses genes para a perpetuação de sua espécie. Com isso, essas cepas (3PCE6 e 2PCE43, em vermelho na Tabela 7.2) apresentaram uma atividade menor que as outras cepas e também do que a selvagem (P49P11). Porém, foram as únicas que possuíam a característica de colônias carecas, não produção de esporos (Tabela 7.2).

Essa variável, diferenças na produção de esporos entre os mutantes, não foi prevista por essa metodologia, sendo necessária a utilização de um inóculo para padronizar o crescimento das hifas e com isso inocular uma massa mais homogênea de hifas crescidas dos fungos, sendo então, resolvido esse problema na metodologia. Assim, ainda que no item anterior tenha sido escolhida a condição 4 (sem inóculo) ao invés da condição 2 (com inóculo), conclui-se que a fase de inóculo é necessária no caso de cepas que não produzem esporos.

Tabela 7.2: Atividade de FPase (FPU/mL) em diferentes tempos de amostragem para o cultivo das cepas mutadas por EMS e da cepa selvagem, dos extratos vindo dos mini cultivos, com uma maior quantidade de esporos no inóculo e utilizando o dobro de celulose no meio de cultura. **Verde:** Selvagem; **Azul:** Primeira geração de mutantes; **Roxo:** Segunda geração de mutantes; **Rosa:** Terceira geração de mutantes.

| Cepas Seleccionadas | FPase 48h (FPU/mL) | FPase 72h (FPU/mL) | FPase 96h (FPU/mL) | FPase 120h (FPU/mL) |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| P49P11 | 0,553 ± 0,19 | 0,422 ± 0,15 | 0,340 ± 0,17 | 0,319 ± 0,14 |
| 1PCE10 | 0,628 ± 0,12 | 0,595 ± 0,18 | 0,399 ± 0,19 | 0,468 ± 0,16 |
| 1PCE89 | 0,643 ± 0,14 | 0,456 ± 0,12 | 0,603 ± 0,18 | 0,564 ± 0,13 |
| 1PCE14 | 0,645 ± 0,12 | 0,528 ± 0,12 | 0,367 ± 0,14 | 0,389 ± 0,12 |
| 1PCE70 | 0,601 ± 0,14 | 0,574 ± 0,18 | 0,421 ± 0,18 | 0,389 ± 0,14 |
| 1PCE301 | 0,614 ± 0,15 | 0,404 ± 0,17 | 0,550 ± 0,12 | 0,506 ± 0,15 |
| 1PCE300 | 0,449 ± 0,16 | 0,535 ± 0,11 | 0,713 ± 0,22 | 0,411 ± 0,15 |
| 1PCE30 | 0,638 ± 0,10 | 0,466 ± 0,18 | 0,380 ± 0,14 | 0,389 ± 0,15 |
| 2PCE76 | 0,438 ± 0,12 | 0,525 ± 0,17 | 0,546 ± 0,19 | 0,391 ± 0,15 |
| 2PCE222 | 0,470 ± 0,14 | 0,550 ± 0,19 | 0,638 ± 0,21 | 0,466 ± 0,18 |
| 2PCE66 | 0,455 ± 0,16 | 0,551 ± 0,21 | 0,385 ± 0,12 | 0,498 ± 0,18 |
| 2PCE43 | 0,423 ± 0,18 | 0,396 ± 0,25 | 0,414 ± 0,15 | 0,380 ± 0,13 |
| 2PCE280 | 0,407 ± 0,10 | 0,443 ± 0,18 | 0,369 ± 0,19 | 0,346 ± 0,18 |
| 2PCE460 | 0,344 ± 0,19 | 0,420 ± 0,22 | 0,746 ± 0,20 | 0,431 ± 0,15 |
| 2PCE13 | 0,555 ± 0,17 | 0,407 ± 0,19 | 0,505 ± 0,22 | 0,386 ± 0,15 |
| 2PCE120 | 0,565 ± 0,11 | 0,507 ± 0,19 | 0,529 ± 0,15 | 0,465 ± 0,14 |
| 2PCE29 | 0,586 ± 0,19 | 0,598 ± 0,12 | 0,369 ± 0,13 | 0,406 ± 0,18 |
| 2PCE52 | 0,574 ± 0,13 | 0,398 ± 0,16 | 0,365 ± 0,19 | 0,431 ± 0,11 |
| 2PCE32 | 0,560 ± 0,15 | 0,593 ± 0,15 | 0,341 ± 0,15 | 0,461 ± 0,18 |
| 2PCE29 | 0,507 ± 0,12 | 0,363 ± 0,11 | 0,752 ± 0,19 | 0,497 ± 0,17 |
| 2PCE33 | 0,574 ± 0,18 | 0,420 ± 0,14 | 0,529 ± 0,18 | 0,491 ± 0,19 |
| 2PCE266 | 0,586 ± 0,19 | 0,503 ± 0,25 | 0,523 ± 0,19 | 0,475 ± 0,16 |
| 2PCE180 | 0,566 ± 0,17 | 0,461 ± 0,22 | 0,475 ± 0,12 | 0,347 ± 0,19 |
| 3PCE6 | 0,361 ± 0,12 | 0,400 ± 0,18 | 0,644 ± 0,17 | 0,444 ± 0,17 |
| 3PCE72 | 0,420 ± 0,19 | 0,446 ± 0,19 | 0,538 ± 0,26 | 0,449 ± 0,19 |
| 3PCE103 | 0,483 ± 0,18 | 0,495 ± 0,13 | 0,754 ± 0,27 | 0,470 ± 0,14 |
| 3PCE17 | 0,460 ± 0,13 | 0,502 ± 0,18 | 0,555 ± 0,25 | 0,496 ± 0,17 |
| 3PCE87 | 0,531 ± 0,19 | 0,593 ± 0,17 | 0,609 ± 0,25 | 0,467 ± 0,19 |
| 3PCE89 | 0,533 ± 0,12 | 0,484 ± 0,10 | 0,398 ± 0,19 | 0,367 ± 0,12 |
| 3PCE13 | 0,527 ± 0,10 | 0,454 ± 0,12 | 0,358 ± 0,18 | 0,500 ± 0,14 |
| 3PEC156 | 0,538 ± 0,14 | 0,464 ± 0,12 | 0,369 ± 0,17 | 0,460 ± 0,13 |
| 3PCE92 | 0,565 ± 0,16 | 0,514 ± 0,10 | 0,612 ± 0,13 | 0,357 ± 0,18 |

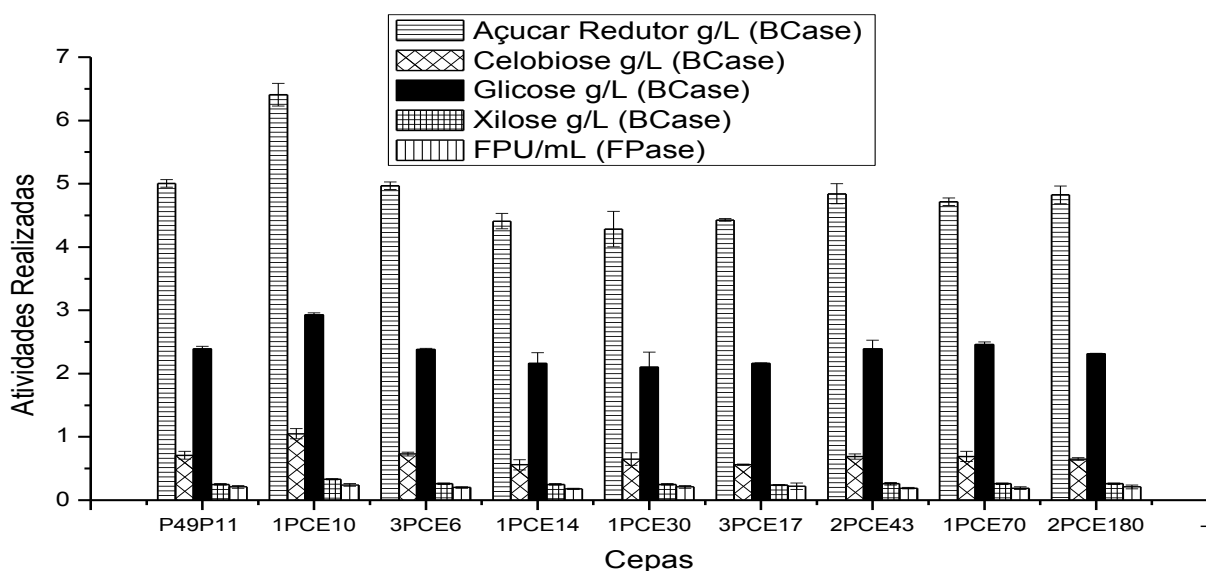
7.3.3. Introdução da etapa de inóculo e avaliação da substituição da atividade de FPase para BCase

A medida apenas de BCase como a única quantificação das glicohidrolases produzidas pelas diferentes cepas é interessante pois direcionará a escolha do mutante para a produção de glicohidrolases específicas para o substrato real do processo. A quantificação somente desta atividade torna o método de seleção mais direcionado e eficiente para a seleção de uma cepa apropriada para a aplicação no processo em escala industrial.

Para esta etapa foram escolhidas algumas cepas que apresentaram as maiores atividades verificadas na Tabela 7.2 (P49P11-selvagem, 1PCE10, 1PCE14, 1PCE30) e as cepas 2PCE43 e 3PCE6, pois as mesmas possuem características fisiológicas de não produção de esporos. As demais cepas foram escolhidas aleatoriamente. Todas as cepas escolhidas estão marcadas em negrito na Tabela 7.2.

Para as duas medidas testadas (FPase e BCase) a cepa 1PCE10 apresentou melhor desempenho nesse meio de cultura, apresentando a liberação de em torno 1,5 g/L de açúcar redutor na atividade de BCase a mais que as outras cepas testadas (Figura 7.1). Tanto para atividade utilizando papel de filtro (FPase) como bagaço de cana de açúcar (BCase), pôde-se escolher a cepa 1PCE10. Porém, a Tabela 7.2 nos indica que para a seleção de cepas com pequenas diferenças na capacidade de produção de celulase, a atividade de FPase é pouco sensível. A medida de BCase consegue captar com maior seletividade e precisão as pequenas diferenças na produção das glicohidrolases, sendo importante para trabalhos de melhoramentos genéticos por mutações em série, pois as atividades vão aumentando de maneira gradual ao longo das acumulações de mutações.

Figura 7.1: Comparação dos resultados, em 96 horas de cultivo, pela quantificação de FPase e BCase para a seleção de mutantes hipercelulolíticos dos extratos vindo dos mini cultivos submersos, introduzindo a etapa de inóculo.



A cepa 1PCE10, para este experimento, apresenta maior medida de BCase (Figura 7.1), porém não podemos saber se haveria alguma diferença se este ensaio fosse realizado em ambiente repressivo, na presença de glicose. No próximo item foi resolvida esta nova necessidade para o método aqui proposto.

7.3.4. Avaliação da concentração ideal de glicose a ser utilizada no meio de cultivo submerso

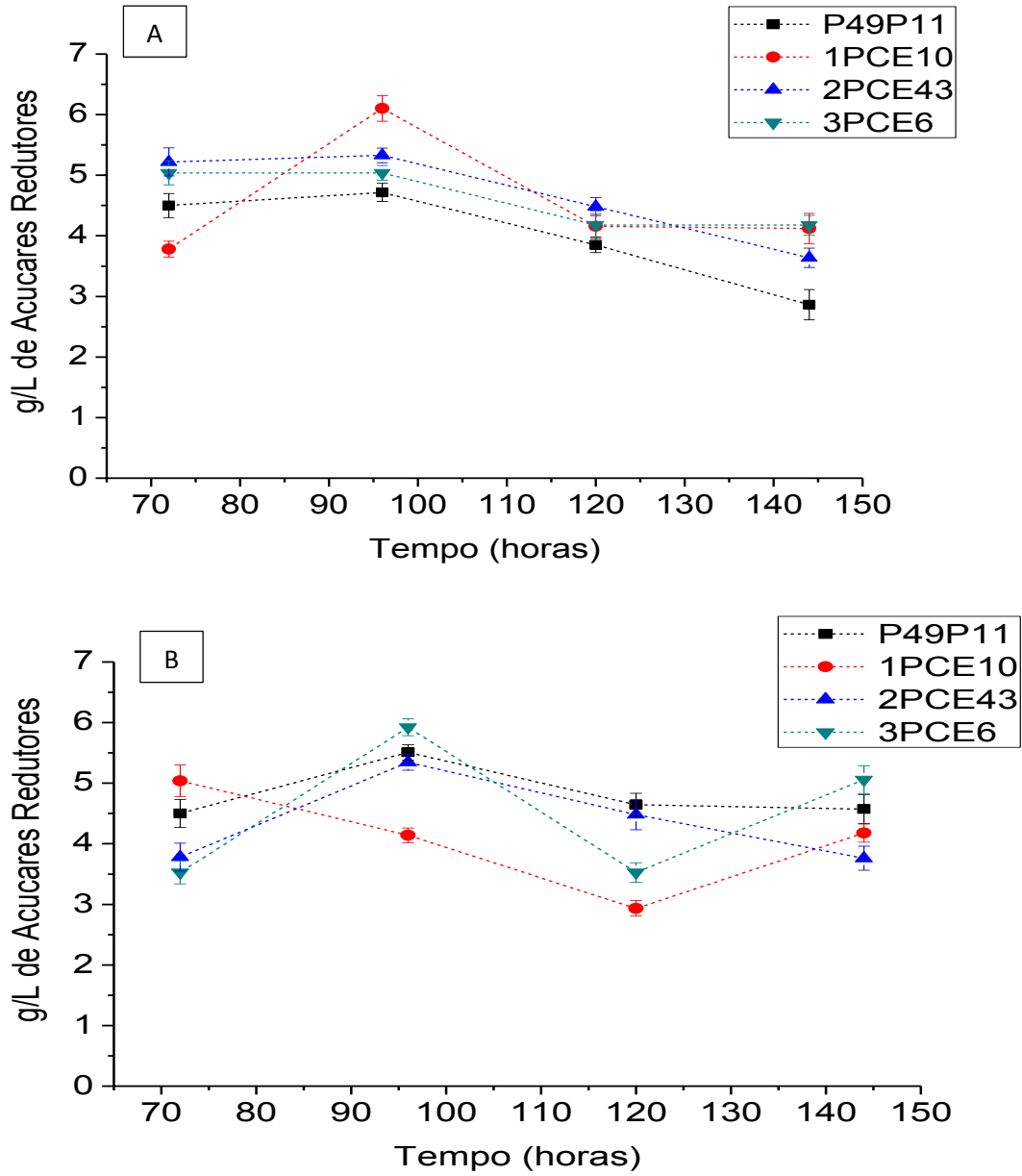
Sabe-se que a molécula de glicose exerce o papel de repressor catabólico, sendo que as cepas mais reprimidas produzem pouca ou nenhuma quantidade de celulase na presença desta molécula (SUTO & TOMITA, 2001; ADSUL, *et. al.*, 2007; CAMASOLA & DILLON, 2010; DILLON, *et. al.*, 2011). A avaliação de diferentes concentrações de glicose no meio de cultivo é importante para determinar a concentração ideal desta molécula que permite a diferenciação de cepas mais desreprimadas quanto à produção de celulases.

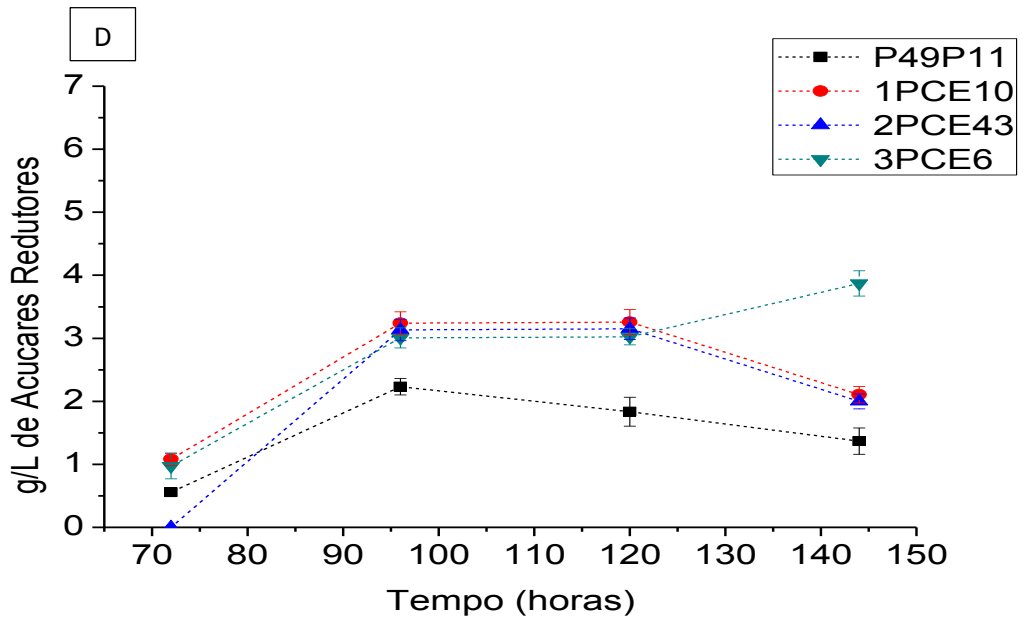
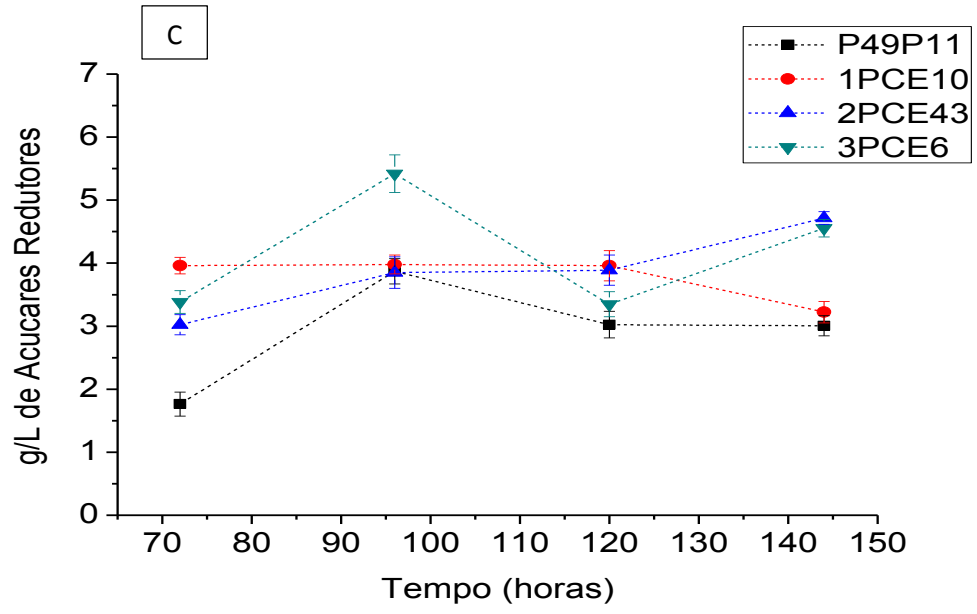
Em 0 % de glicose a cepa 1PCE10 se mostrou mais promissora que as outras cepas testadas nesta condição (Figura 7.2 A), liberando cerca de 6 g/L de açúcar redutor para o extrato enzimático em 96 horas de cultivo, este resultado comprova os resultados apresentados na Figura 7.1. Porém, quando se coleta amostras em diferentes tempos de cultivos, utilizando diferentes concentrações de glicose, podemos perceber perfis diferentes de expressão das celulases responsáveis por hidrolisar o bagaço, para as quatro cepas utilizadas neste tópico (Figura 7.2).

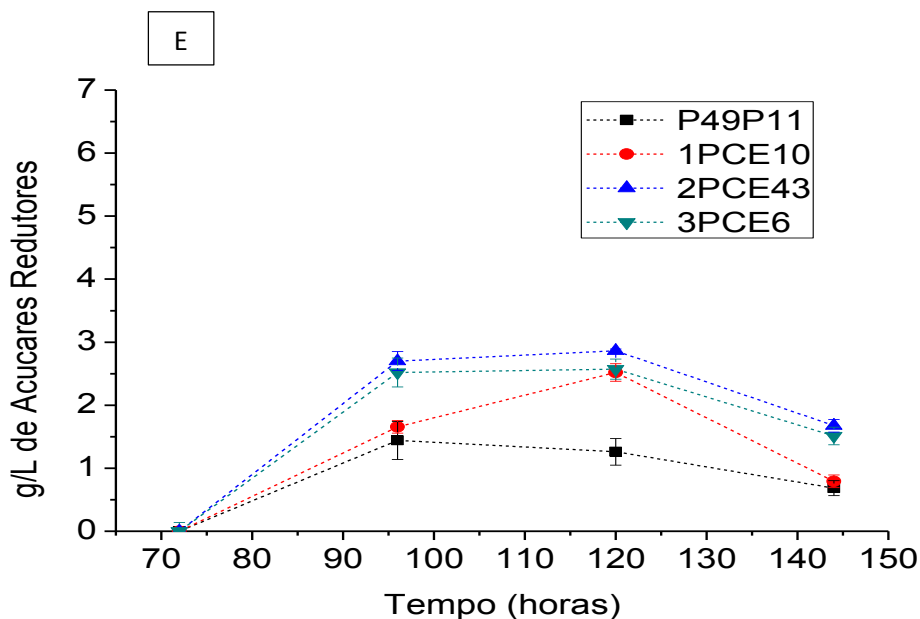
No tempo de 72 horas de cultivo, na concentração de 2 % de glicose, as glicohidrolases produzidas pela cepa P49P11 liberaram 1,5 g/L de açúcares redutores quando hidrolizaram o bagaço, as cepas 2PCE43 e 3PCE6 liberaram cerca de 3,2 g/L de açúcares redutores, já a cepa 1PCE10 liberou aproximadamente 4 g/L de açúcares redutores. Em 96 horas de cultivo, em 2 % de glicose, a cepa 3PCE6 liberou aproximadamente 5,2 g/L de açúcares redutores, enquanto que as cepas 2PCE43, 1PCE10 e a P49P11 liberaram não mais que 3,5 g/L de açúcares redutores (Figura 7.2 C).

Este fato também foi verificado nos experimentos em meio sólido (Capítulo 4). Em meio não contendo glicose, não se percebem as diferenças fisiológicas com relação a produção de glicohidrolases, porém em meio contendo glicose percebem-se as diferenças entre os diferentes mutantes, tanto em meio sólido ou líquido com as concentrações e componentes de meio adequados.

Figura 7.2: Quantificação dos açúcares redutores por DNS. Resultado da medida de BCase utilizando o extrato do mini cultivo em diferentes tempos de cultivo e em diferentes concentrações de glicose: **A)** 0 %; **B)** 1 %; **C)** 2 %; **D)** 3 %; **E)** 4 %.







A cepa P49P11 (selvagem) é a mais reprimida de todas, quando cultivada na presença de 3 % de glicose (Figura 7.2 D). Nos tempos de 96, 120 e 144 horas de cultivo submerso as concentrações de 3 % e 4 % de glicose levaram à mesma medida de BCase para a cepa 2PCE43 (Figura 7.2 D e E) e o valor é bem próximo ao apresentado pela cepa 1PCE10 a 3 % de glicose (Figura 7.3B). A cepa 1PCE10, no entanto, apresentou liberação de açúcares redutores totais bem mais baixa em 4 % de glicose.

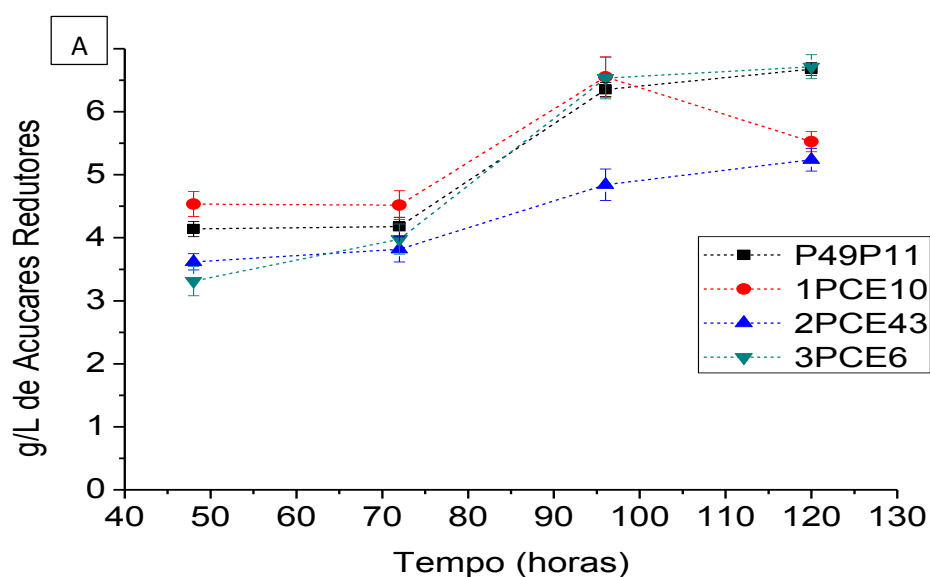
É necessário escolher somente uma concentração de glicose para ser utilizada no meio de cultivo para esta metodologia. A concentração de glicose adequada a ser utilizada tem que estar de acordo com as limitações dessa metodologia como um todo. Escolheu-se trabalhar com 2 % de glicose pela limitação da metodologia de determinação dos açúcares redutores. Em média, cada 0,1 de absorbância corresponde à liberação de em torno de 0,72 g/L de açúcares redutores. Para que a metodologia seja confiável, consideramos absorbâncias de no mínimo 0,2 (JOHN, 1965), o que resulta em uma liberação de aproximadamente 1,44 g/L de açúcares redutores. Assim, trabalhar com 3 % ou 4 % de glicose não é aconselhável, pois a repressão é muito alta e a liberação de açúcares redutores fica muito próxima da faixa em que o método não é tão confiável. Entretanto, utilizando a concentração de 2 % de glicose pôde-se selecionar com clareza a cepa 3PCE6 em 96 horas de cultivo submerso.

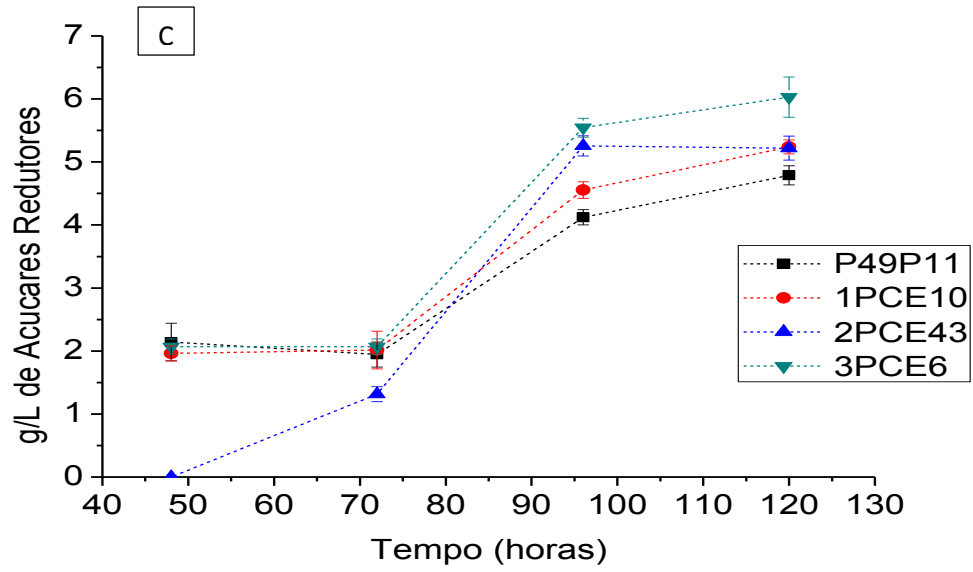
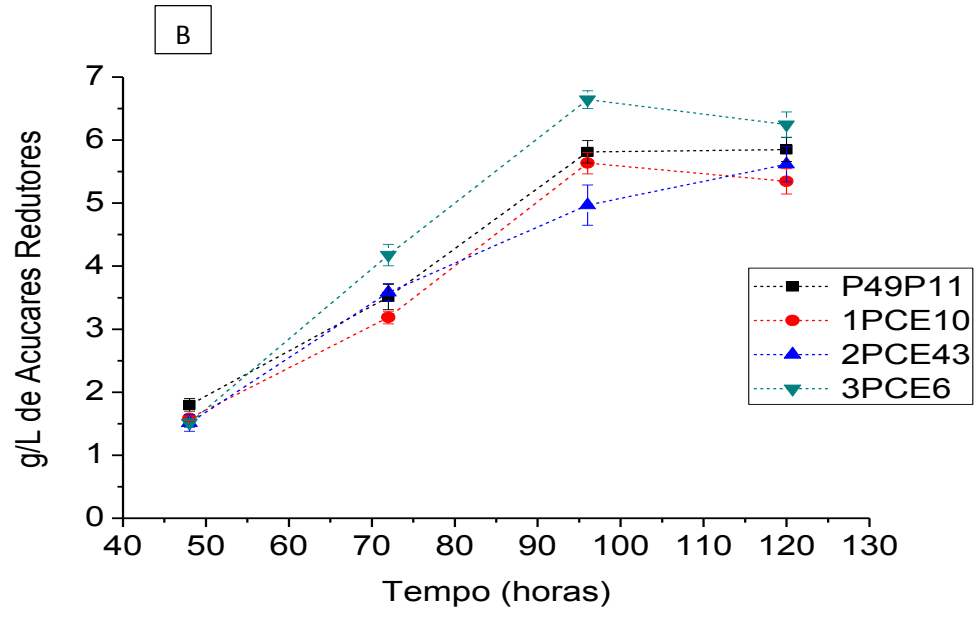
7.3.5. Verificação da reprodução do experimento do item 7.3.4 em escala cinco vezes superior e em outro meio de cultura

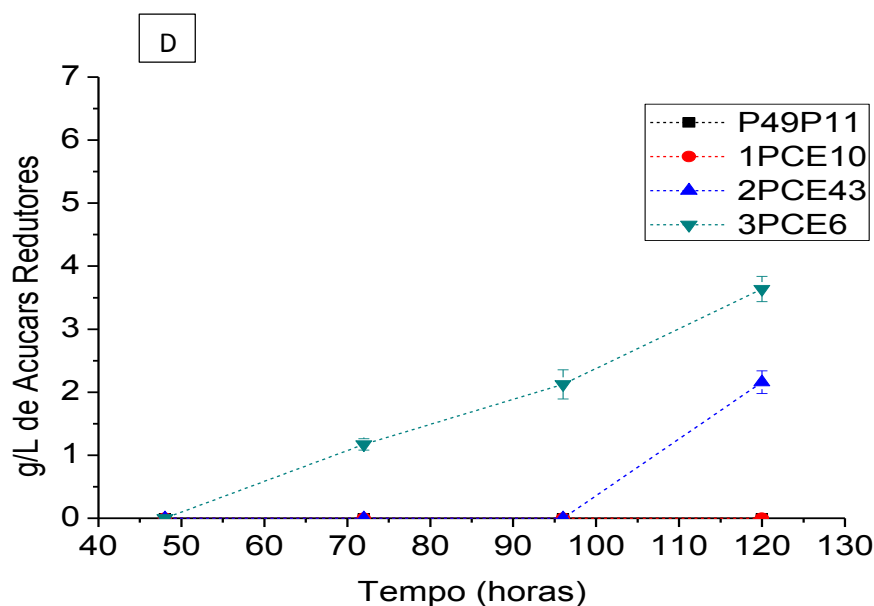
Em 120 horas de cultivo a cepa mutante 3PCE6 (Figura 7.3 A) apresentou a mesma atividade de BCase que a cepa P49P11 (Selvagem, Figura 7.3 A) em 0 % de glicose, neste meio de cultivo. No tempo de 120 horas de cultivo em 2 % de glicose, pôde-se evidenciar com clareza que as cepas mutantes são mais desreprimidas que a selvagem, principalmente para as cepas 2PCE43 e 3PCE6 (Figura 7.3 D).

O potencial da cepa 3PCE6 é evidenciado pelos resultados em 4 % de glicose (Figura 7.3 E). Em seguida vêm os mutantes 2PCE43, 1PCE10 e a selvagem (P49P11). É interessante notar que o grau de desrepressão está se relacionando com as rodadas de mutação (DILLON, *et. al.*, 2011). A cepa 3PCE6 já sofreu três rodadas de mutação, ela é derivada da cepa 2PCE43, que já sofreu duas rodadas de mutação, que por sua vez é derivada da cepa 1PCE10, que sofreu uma rodada de mutação a partir da cepa selvagem.

Figura 7.3: Medidas de BCase dos extratos enzimáticos dos cultivos das diferentes cepas em diferentes tempos e concentrações de glicose: **A)** 0 %; **B)** 0,5 %; **C)** 1 %; **D)** 2 %; **E)** 4 %.







Em 120 horas cultivo, em meio apresentando 2 % de glicose, a medida de BCase para a cepa 3PCE6 e 2PCE43 foi de aproximadamente 5,4 g/L de açúcares redutores, enquanto que a cepa selvagem não ultrapassou 3 g/L. Em 96 horas, em 2 % de glicose, a cepa 3PCE6 liberou 4,5 g/L de açúcares redutores, enquanto que as demais não ultrapassaram a barreira de 2,5 g/L. No tempo de 72 horas de cultivo (em 2 % de glicose), as cepas 3PCE6, P49P11, 2PCE43 e 1PCE10 apresentaram em torno de 1,5 g/L de açúcares redutores liberados. Em 48 horas de cultivo submerso as cepas 2PCE43 e 3PCE6 liberaram 1,5 g/L de açúcares redutores, enquanto que para as cepas 1PCE10 e P49P11 não foi verificada liberação de açúcares redutores neste tempo de cultivo (Figura 7.3 D).

Em 4 % de glicose, somente no tempo de 120 horas de cultivo submerso, pôde-se diferenciar a produção dos mutantes de primeira (1PCE10) e segunda geração (2PCE43). A cepa mutante de terceira geração (3PCE6), no entanto, se destaca desde 72 horas de cultivo, tanto da cepa selvagem quanto das outras cepas mutantes. A utilização de 4 % de glicose, no entanto, produz resultados de BCase, para as cepas exemplificadas, que estão na zona de risco desta metodologia, sendo somente confiável o resultado de 120 horas de cultivo para a cepa 3PCE6. Portanto, para os diferentes meios de culturas e para as diferentes escalas de trabalho a concentração de 2 % de glicose foi a mais indicada a se utilizar.

A Tabela 7.4, abaixo, mostra um resumo da metodologia utilizada para o desenvolvimento do método de mini cultivo otimizado, onde foi possível selecionar com facilidade fungos menos reprimidos quanto à presença de glicose em cultivo submerso. Nesta Tabela estão contidas todas as variáveis estudadas para chegar ao método otimizado desenvolvido por esse trabalho.

Tabela 7.3: Esquemática da linha de pensamento para melhor entendimento do desenvolvimento do método otimizado de seleção em cultivo submerso para fungos celulolíticos, que possuem diferenças nas repressões das celulases por glicose. Caracteres em: **Vermelho:** Etapa ajustada no próximo item; **Verde:** Modificações que melhoraram a eficiência e a sensibilidade da metodologia; **Preto:** Resultados não auxiliaram para o desenvolvimento do próximo item.

| Variáveis estudadas para direcionar a escolha de um melhor método de cultivo submerso para seleção de fungos filamentosos hipercelulolíticos | | | | | | | | |
|--|--|-------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------|--|
| Materiais e métodos item | Meio sólido de crescimento dos esporos | Método de inóculo | Meio de produção das enzimas | Quantidade de inóculo | Tipo de frasco | Atividade Enzimática Quantificada | Linhagem | Resultados para direcionar os protocolos |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| 7.2.2.2 | PDA | Inóculo | Meio 1 | 10 % (v/v) | | | | Atividades enzimáticas baixas Necessidade de melhoramento do método |
| | | Inóculo | Meio 2 | 10 % (v/v) | Erlens | | | |
| | | Esporos | Meio 1 | Disco de 0,5 e 1 cm | 500 e 50 mL | FPase (FPU/mL) | Selvagem | |
| | | Esporos | Meio 2 | Disco de 0,5 e 1 cm | | | | |
| 7.2.2.3 | Ágar-celulose | Esporos | Meio 2 utilizando o dobro de celulose | Mini placa de Petri 5 cm | Erlens de 50 mL | FPase (FPU/mL) | Mutantes EMS e Selvagens | Atividades enzimáticas aceitáveis para a condução do método |

| | | | | | | | | |
|---------|---------------|---------|---|---|----------------|--|-------------------------------------|---|
| | | | | | | | | <p>Seleção não padronizada para cepas com diferenciação na produção de esporos</p> <p>Necessidade de melhoramento do método</p> |
| 7.2.2.4 | Ágar-celulose | Inóculo | Meio 2 utilizando o dobro de celulose | <p>Mini placa de Petri com 5 cm de diâmetro</p> <p>2 mL</p> | Erlen de 50 mL | <p>FPase (FPU/mL)</p> <p>BCase (g/L)</p> | Mutantes EMS e Selvagem | <p>Mesma quantidade de massa inoculado. Seleção padronizada quanto a comparação de produções de cepas com quantidades diferentes de esporos</p> <p>Necessidade de seleção de cepas com maiores capacidades de produção mesmo em ambiente repressivo para a produção das glicohidrolases</p> <p>Necessidade de estudar diferentes concentração do repressor catabólico glicose</p> |
| 7.2.2.5 | Ágar-celulose | Inóculo | <p>Meio 2 utilizando o dobro de BED nas concentrações de 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % e 5 % de glicose</p> | <p>Mini placa de petri de 5 cm de diâmetro</p> <p>2 mL</p> | Erlen de 50 mL | BCase (g/L) | 1PCE 10, 2PCE 43, 3PCE 6 e Selvagem | <p>Foi possível determinar a concentração ideal de glicose para distinguir cepas com diferenças quanto a</p> |

| | | | | | | | | |
|-----------|---------------|---------|---|--|------------------|-------------|-----------------------------------|---|
| | | | | | | | | repressão das celulasas |
| | | | | | | | | Verificação de reprodução do método em escala superior |
| 7.2.2.6 | Ágar-celulose | Inóculo | Novo meio nas concentrações de 0 %, 1 %, 2 % e 5 % de glicose | Placas de petri com 12 cm de diâmetro 10 mL | Erlens de 250 mL | BCase (g/L) | PCE 10, PCE 43, PCE 6 e Selavagem | O método é reprodutível em uma escala cinco vezes maior |
| Conclusão | Ágar-celulose | Inóculo | Meio 2 utilizando o dobro de BED e uma concentração de 2 % de glicose | Mini placa de petri de 5 cm de diâmetro 2mL | Erlens de 50 mL | BCase (g/L) | 3PCE 6 | Método otimizado que selecionou a cepa mutante 3PCE6 |

A coluna denominada 1 na Tabela 7.4 estuda a substituição do meio sólido PDA (item 7.2.2.1) utilizado para o crescimento inicial dos esporos pelo meio sólido ágar-celulose (item 7.2.2.2). A utilização de ágar-celulose em lugar de PDA é interessante pois o objetivo é produzir celulasas e a celulose é conhecidamente um indutor de produção destas enzimas. O crescimento em meio ágar-celulose é importante para forçar o metabolismo das cepas para a produção das enzimas, para degradar a celulose contida no meio sólido, para o desenvolvimento de seus esporos. O PDA é composto por amido de batata, preparando o metabolismo do fungo para a produção de amilase e não celulase que é a enzima de interesse deste trabalho (Tabela 3 itens 7.2.2.2 e 7.2.2.3) (ADSUL, *et. al.*, 2007; CAMASOLA & DILLON, *et. al.*, 2004; DILLON, *et. al.*, 2011).

O modo que o fungo foi inoculado (Tabela 7.4), podendo ser diretamente por esporos no meio de produção (itens 7.2.2.2 e 7.2.2.3) ou primeiramente os esporos são inoculados em um meio de inóculo (7.2.2.3) e crescidos por 72 horas, onde todos possuem uma padronização do crescimento de suas hifas, e depois inocula-se essa massa de hifas no meio de produção (Tabela 7.4). O método de inóculo somente por esporos possui a vantagem de se abolir 72 horas da metodologia. Porém, a utilização do pré-crescimento é importante, pois padroniza o crescimento das hifas à quantidade de

glicose contida no meio. Para cepas que possuem grandes diferenças na quantidade de produção de esporos, a utilização do inóculo possui vantagem de selecionar apenas as cepas que possuem diferenças nas capacidades de produção das celulases (Tabela 7.4). Quando massas celulares semelhantes são adicionadas no meio de produção, para selecionar os mutantes em um mini cultivo submerso, podemos considerar que as diferenças nas atividades são somente devido às suas capacidades de produção.

O meio de cultivo para a seleção das cepas partiu de dados da literatura segundo Delabona *et. al.*, (2012) (item 7.2.2.2), e foi sendo adaptado conforme evolução do método para selecionar, da melhor forma possível, o microrganismo de interesse, sendo modificado por acréscimo de 2 % de glicose (item 7.2.2.5) e dobrada a quantidade de BED (item 7.2.2.3) (Tabela 7.4 item conclusão).

A coluna 3 da Tabela 7.4 apresenta o estudo do meio de cultura. Sabe-se que a glicose, quando em excesso no meio de produção de celulases, reprime a síntese das mesmas (DILLON, *et. al.*, 2011). Os estudos apontam que para fungos filamentosos produtores de celulases o mecanismo de repressão catabólica do metabolismo de carbono, o Cre1, está parcialmente envolvido na repressão dos genes de duas hidrolases (cbh1 e xyn1). Este mecanismo está diretamente relacionado com a bioenergia do sistema celular do fungo, pois em presença do substrato livre, a glicose, não há a necessidade de produzir celulases para degradar a celulose e produzir mais glicose, sendo que o meio de cultura já está rico nesta molécula, que é a base energética para a célula. Porém, na ausência de glicose, e na presença apenas de celulose, o fungo é obrigado a produzir as celulases para que as mesmas degradem a celulose do meio para ele utilizar a glicose para o seu crescimento e manutenção do metabolismo. Um fungo desreprimido é aquele que consegue produzir celulases mesmo na presença de grandes quantidades de glicose, sendo que este provavelmente possui uma mutação no gene relacionado ao Cre 1 (DILLON, *et. al.*, 2011; CAMASOLA & DILLON, 2010; LEHNINGER, *et. al.*, 2006; SUTO & TOMITA, 2001; ZHANG, *et. al.*, 2017).

É de grande interesse obter um organismo desreprimido, pois assim podem-se conseguir altas produtividades dessas enzimas quando utilizadas condições adequadas de cultivo, e assim diminuir o custo do processo de produção (ADSUL, *et. al.*, 2007; CAMASOLA & DILLON, 2010; SUTO & TOMITA, 2001). Para que o método

pudesse selecionar cepas desreprimidas, foi necessário testar diferentes concentrações de glicose, de modo a escolher uma concentração adequada que pudesse selecionar mutantes desreprimidos quanto à presença de glicose. Neste caso escolheu-se a cepa Selvagem, 1PCE10 (primeira geração EMS), 2PCE43 (segunda geração EMS) e 3PCE6 (terceira geração EMS) (Tabela 4 item 2.2.5.). Cepas de diferentes gerações possuem a probabilidade de apresentar maiores diferenças relacionadas com a sua repressão catabólica pela presença de glicose (DILLON, *et. al.*, 2011).

A utilização de 2 % de glicose no meio de produção permitiu a diferenciação de cepas desreprimidas advindas de diferentes gerações do melhoramento genético. Este mesmo resultado foi verificado também em uma escala cinco vezes maior utilizando um outro meio de cultura (item 7.2.2.6).

O objeto que determinará a quantidade de esporos inoculada foi sendo modificado no decorrer do desenvolvimento do método, conforme a necessidade (coluna de numeração 4; Tabela 7.4). Inicialmente foram utilizadas ponteiras cujas pontas são cortadas, obtendo um diâmetro de esporos de 0,5 cm para p200 (para os *Erlens* de 50 mL) e 1 cm para p1000 (para os *Erlens* de 500 mL) (item 7.2.2.2. Tabela 3). Porém, a quantidade de esporos era muito pequena, o que refletia em atividades muito pequenas. A utilização de placas de Petri de 5 cm contendo ágar-celulose para o crescimento dos esporos permitiu que fosse padronizado um recipiente que possui tamanho compatível ao método (item 7.2.2.3) e proporcionando a inoculação de uma maior quantidade de esporos, pois possui um diâmetro de esporos muito maior que as ponteiras cortadas utilizadas anteriormente.

Os volumes de reação testados (coluna de numeração 5; Tabela 4) foram para se determinar o menor volume possível que nos conduza a uma alta confiança nos resultados de produção das celulasas. Os experimentos de seleção têm que possuir a menor porcentagem de erro possível para a seleção de um mutante apropriado. Os frascos *Erlens* de 50 mL foram escolhidos para serem utilizados na metodologia, pois os mesmos possuem um volume acessível, resultando em uma otimização de espaço nas estufas rotativas onde são cultivados os mutantes. Economiza também nas quantidades gastas de meio de cultura e energia, pois se avalia uma maior quantidade de mutantes em um mesmo espaço nas estufas rotativas, gastando uma menor quantidade de

reagentes de meio de cultura. Por esse motivo as variações utilizadas para os *Erlens* de 500 mL não estão demonstradas na Tabela 7.4 (item 7.2.2.2).

As atividades enzimáticas são de grande importância para a qualidade do método (coluna de numeração 6; Tabela 7.4), pois são elas que vão nos conduzir à escolha de um mutante adequado. Desta forma, devem ser práticas, únicas, e bem direcionadas para o processo (item 7.2.2.4; Tabela 7.4). A resposta do método de BCCase é mais sensível para seleção de cepas que possuem pequenas diferenças nas produções de glicohidrolases, se comparada com a seleção utilizando a atividade de FPase (item 7.2.2.4).

A metodologia foi evoluindo de modo que se atingissem atividades de em média 0,4 FPU/mL de FPase e 4,5 g/L de açúcares redutores (BCCase), sendo que esses valores de atividade estão dentro dos valores encontrados na literatura utilizando uma maior escala de trabalho (ADSUL, *et. al.*, 2007; CHANDRA, *et. al.*, 2009; CHENG, *et. al.*, 2009; XING-HUA, *et. al.*, 2009; SHAFIQUE, *et. al.*, 2010; DELABONA, *et. al.*, 2012; COSTA, *et. al.*, 2016 a e b).

Para a seleção de mutantes *T. harzianum* produtores de celulases e com outros fenótipos interessantes para o processo de produção do bioetanol de segunda geração (cepas com baixa esporulação, não produção de espuma durante o cultivo submerso e desreprimidas quanto ao gene das celulases mesmo em presença de glicose), a metodologia desenvolvida por este trabalho contribuiu para aumentar as chances de selecionar um bom mutante e também tornar o processo de seleção menos dispendioso.

7.5. Conclusão

O método desenvolvido pôde ser realizado em escala mini, utilizando frascos de 50 mL com um volume de 20 mL de cultivo. A realização do inóculo foi necessária para adequar o método a cepas que não possuem esporos. Foi escolhido o meio 2 utilizando o dobro de celulose acrescido de 2 % de glicose (14 g/L de bagaço pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado com NaOH (BED), 3 g/L de sacarose, 1 g/L de peptona e 50 mL/L de solução de sais 20 x concentrada empregada por Mandels e Reese

(1957). Porém, podem ser utilizados outros meios de cultura utilizando essa concentração de glicose, como foi verificado no item 7.2.2.6, onde se chegou no mesmo resultado utilizando o meio FT4 otimizado pelo capítulo 6 em uma escala de cultivo cinco vezes superior ao proposto por esse trabalho.

CAPÍTULO 8

8. MUTAÇÃO CLÁSSICA DO FUNGO *TRICHODERMA HARZIANUM* P49P11 POR EMS

RESUMO

O uso de técnicas de mutagênese clássica para fungos filamentosos, desde muitos anos, vem sendo uma estratégia bastante atrativa para incrementar a produção de glicohidrolases. Esse capítulo teve como objetivo a realização da evolução clássica do fungo selvagem *T. harzianum* P49P11, quanto à produção de glicohidrolases, por tratamento mutagênico pelo agente químico EMS seguida de seleção por estratégias otimizadas de seleção. Com base em todos os estudos foi selecionada a cepa 5PCE15, pois a mesma se mostrou mais desreprimida em cultivo submerso em 2 % de glicose, apresentando maior crescimento em meio sólido e maior halo de hidrólise em ágar-celulose na presença de glicose. Além disso, ela apresentou outras características relevantes para o processo de produção em uma escala maior, como não produção de espuma em seu cultivo submerso e pouca produção de esporos. Foi constatado também que dependendo do meio de cultura a cepa mutante possui uma atividade em BEX (bagaço pré-tratado por explosão a vapor) duas vezes superior com relação ao selvagem. Foi selecionada uma proporção de reagentes de meio de cultura que maior induziu a atividade das glicohidrolases, para a desconstrução do BED (bagaço pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado com NaOH) e BEX e este meio foi cultivado em biorreator para as duas cepas (selvagem e mutante). Foi verificado que a cepa mutante não possui nem uma característica desvantajosa para o processo se comparada à cepa selvagem, apresentando entretanto maiores vantagens para o processo. Foi realizada também a caracterização fenotípica do mutante 5PCE15, comparando diferenças visuais a olho nu e em aumento de até 400 x utilizando microscopia óptica com relação a cepa selvagem. Este trabalho mostra a aplicação de todas as metodologias desenvolvidas por essa tese, e pode direcionar outros trabalhos que se utilizem de objetivos parecidos.

8.1. Introdução

Para incrementar os níveis de produção de enzimas, linhagens fúngicas têm sido geneticamente modificadas para tentar obter organismos capazes de produzir elevados níveis de celulasas (CHAND, *et. al.*, 2005; CHENG, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011). As mutações no DNA de qualquer organismo podem surgir espontaneamente ou podem ser induzidas por agentes mutagênicos. Mutagênicos físicos, químicos e biológicos são empregados para aumentar a taxa de mutação. O material genético de um microrganismo pode ser alterado e essa modificação tem que ser capaz de ser transmitida aos descendentes, dando origem aos organismos mutantes. O resultado é o aparecimento de um indivíduo diferente, que pode ser distinguível da linhagem selvagem em uma ou mais características genéticas podendo ser fisiológicas, fenotípicas ou genotípicas (CHENG, *et. al.*, 2009; XING-HUA, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011).

Atualmente diversas técnicas são empregadas para a obtenção de fungos mutantes hipercelulolíticos, como fusão de protoplastos, irradiação por luz UV (XING-HUA, *et. al.*, 2009), emprego de agentes químicos como o etil metil sulfonato (EMS), brometo de etídio (EtBr), 1-metil-3-nitroguanidina (MNNG), dentre outros (CHENG, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011).

O mecanismo de mutação por EMS pode ser resumido da seguinte maneira: o grupo etil ataca guaninas do DNA, conduzindo à formação da base nitrogenada anormal, O-6-etilguanina. Durante a replicação essa base anormal induz um erro no quadro de leitura pela DNA polimerase. Este erro resulta na introdução da base timina, ao invés de citosina, onde o sua complementar natural era a guanina. Assim, um par G:C acaba se tornando, após duas replicações, um par de A:T. Tais mutações aparecem a uma taxa de 5×10^{-4} a 5×10^{-2} por gene (LEHNINGER, *et. al.*, 2006).

A curva de sobrevivência é determinada com a contagem das colônias que sobreviveram após exposição ao agente mutagênico e é uma forma de inferir a quantidade de erros aleatórios provocados no DNA de um organismo. Desse modo, quanto maior a letalidade, maior a variabilidade gerada por mutações, em teoria. Geralmente a maior frequência de mutação é verificada em 5 % de sobrevivência, ou seja, 95 % de mortalidade (AZIN & NOROOZI, 2001; KOVACS, *et. al.*, 2009).

A avaliação da capacidade do mutante em utilizar substratos lignocelulósicos, neste caso o bagaço de cana-de-açúcar, é de grande importância para o direcionamento da escolha de um mutante que induza as enzimas necessárias para a hidrólise do mesmo. O método de seleção por velocidade de crescimento de halos de hidrólise que usa celulose pura (Cellufloc 200) como substrato é vantajoso para se fazer uma pré-seleção, porém somente o cultivo submerso utilizando o material lignocelulósico reproduz em baixa escala um cultivo parecido com uma escala maior (KOVACS, 2009; DILLON, 2010; DILLON, *et. al.*, 2011). No capítulo 7 foi desenvolvido um método de cultivo em escala mini que seleciona de forma eficiente fungos desreprimidos (SUTO & TOMITA, 2001). Este método foi utilizado para a seleção dos melhores mutantes produzidos por esse trabalho.

Os mutantes podem ser selecionados por características visuais também, por exemplo, a não produção de esporos pode estar relacionada com a não produção de espuma durante o cultivo, característica vantajosa para o processo em uma escala industrial.

8.2. Metodologia

8.2.1. Microrganismos

O fungo empregado neste trabalho é o *Trichoderma harzianum* P49P11 (Selvagem) (DELABONA *et. al.*, 2012).

8.2.2. Determinação das curvas de sobrevivência por EMS

Para a determinação da curva de sobrevivência da primeira rodada de mutação para a cepa selvagem, 0,5 mL de uma suspensão de 1000 esporos/mL foram tratados com 0,5 mL do agente mutagênico EMS em diferentes concentrações (Sigma-Aldrich). Para a primeira rodada de mutação foram realizadas duas curvas de sobrevivência. A primeira sob concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/mL,

e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 50, 80 e 100 mg/mL por 60 minutos a temperatura ambiente. Para a segunda curva de sobrevivência foram testadas as concentrações de 0, 55, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78 e 81 mg/mL de EMS também durante uma hora de exposição. Foram feitas duas curvas de sobrevivência, pois neste caso, para cada curva foi utilizado um conjunto de esporos diferentes, realizadas em dias diferentes.

Para a segunda rodada de mutação a concentração de 50 mg/mL de EMS foi fixada e foram testados os tempos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 minutos de exposição ao agente mutagênico para a cepa 1PCE10, mutante de primeira geração.

Para a terceira curva de sobrevivência foi fixado o tempo de 60 minutos e variada a concentração de EMS (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 50 mg/mL) para a cepa 2PCE43, mutante de segunda geração.

Na curva de sobrevivência, que foi confeccionada para o mutante 3PCE6 (terceira geração), foi fixado o tempo de 60 minutos e variada a concentração de EMS (0; 10; 20; 30; 40; 50 mg/mL).

Na quarta curva de sobrevivência, confeccionada para o mutante 4PCE10 (quarta geração), foi fixado o tempo de 60 minutos e variada a concentração de EMS (0; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50 mg/mL).

A paralisação da ação do agente mutagênico foi realizada utilizando 1 mL da solução de neutralização $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 % (p/v), no tempo apropriado de acordo com o experimento. Em seguida, 100 μL das amostras foram plaqueadas em meio sólido de seleção.

O meio ágar-celulose foi formulado segundo estudos de Camassola e Dillon, (2010), adaptado, tendo em sua composição 1 % (p/v) *Swollen Celufloc* 200 (Celuflok Industrial e Comercial de Celulose Ltda., Brasil), 0,1 % (p/v) extrato de levedura (Sigma-Aldrich), 0,1 % (p/v) sacarose (Alamar Tecno Científica Ltda., Brasil), 10 % (v/v) solução de sais minerais 20 x concentrada empregada por Mandels e Reese (1957), 2 % (p/v) Agar e 0,1 % de *Triton X*. A celulose utilizada no meio ágar-celulose é a *Swollen celufloc*. O preparo da *Swollen* foi realizado da seguinte maneira: 5 g de celulose *Celufloc* 200 (*Celufloc* Industrial e Comercial de Celulose Ltda., Brasil) foram solubilizadas em 200 mL de água destilada, juntamente com 20 g de esferas de vidro e

mantidas em frascos agitados a 29 °C e 200 rpm por 7 dias (CAMASSOLA & DILLON, 2010; DILLON, *et. al.*, 2011).

As colônias formadas foram contadas para a construção das curvas de sobrevivência com o intuito de determinar a concentração e o tempo onde se obtêm aproximadamente 95 % de mortalidade.

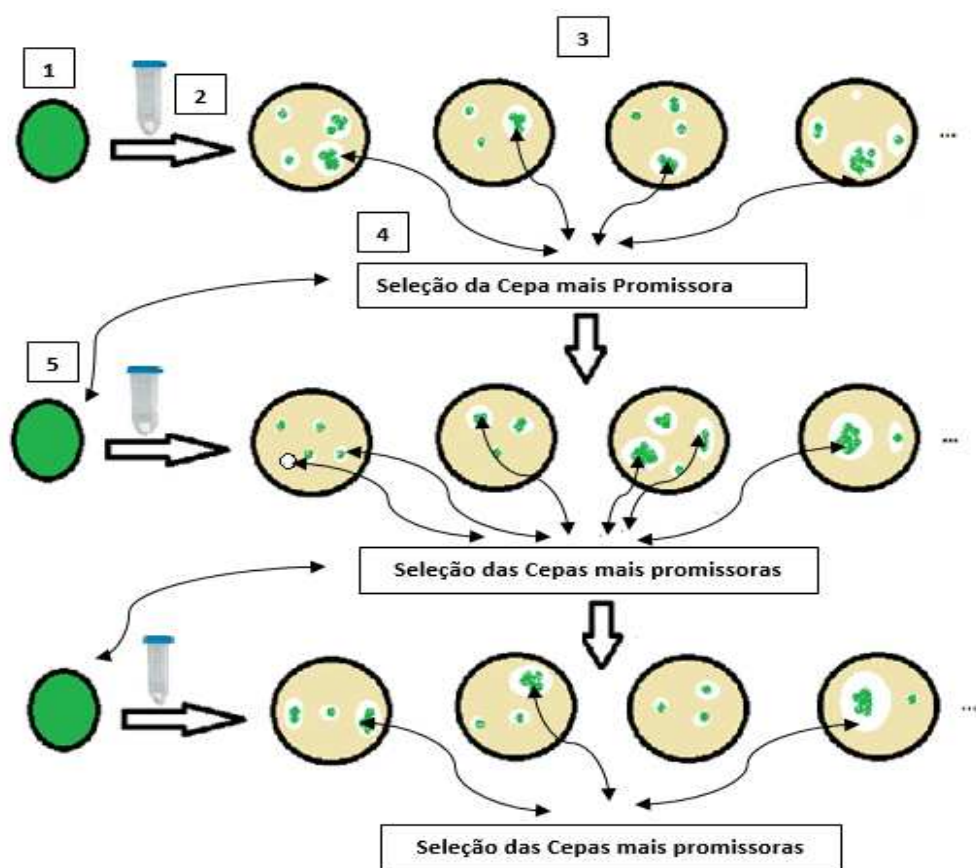
8.2.3. Seleção das cepas modificadas com EMS

8.2.3.1. Pre-seleção das cepas modificadas com EMS

Os mutantes produzidos foram pré-selecionados pelo tamanho do diâmetro do halo de hidrólise em meio ágar-celulose. A suspensão de esporos, no tempo e na concentração de EMS adequados para atingir o índice de 95 % de mortalidade, foi espalhada em placas de petri de 40 cm de diâmetro contendo 40 mL de meio ágar-celulose (Figura 8.1).

As cepas que cresceram na placa de petri depois da exposição ao agente mutagênico e apresentaram os maiores diâmetros de halo de hidrólise foram selecionadas, e seguiram para a próxima etapa de seleção, em mini cultivo submerso de acordo com o Capítulo 7.

Figura 8.1: Esquema da pré-seleção em placas de ágar-celulose pelo tamanho do diâmetro do halo de hidrólise. 1) Crescimento dos esporos em ágar-celulose. 2) Diluição dos esporos na concentração de 1000 esporos por mL e adição de EMS, na concentração e tempo adequado, anteriormente estudada. 3) Seleção das colônias que formaram maiores diâmetros de halos de hidrólise em ágar-celulose. 4) As cepas pré-selecionadas são encaminhadas para a seleção em cultivo submerso otimizado desenvolvido por esse trabalho.



8.2.3.2. Seleção em mini cultivo submerso das cepas pre-selecionadas pelo item anterior

Os possíveis mutantes pré-selecionados pelo tamanho do diâmetro do halo de hidrólise em ágar-celulose, assim como esquematizado pela Figura 8.1, foram selecionados pela metodologia desenvolvida no CAPÍTULO 7, descrita a seguir. As cepas foram repicadas em placas de Petri, de tamanho menor que o convencional (5 cm

de diâmetro), contendo 5 mL de meio ágar-celulose e incubadas em estufa a 29 °C por sete dias, para o desenvolvimento dos esporos. Em seguida 1 mL de solução de *Tween 80* 0,1 % (v/v), estéril, foi utilizado para a captação dos esporos na placa de Petri e 2 mL dessa suspensão de esporos foi inoculada em 20 mL de meio padrão de inóculo (10 % de glicose, 10 % de celulose, 0,1 % extrato de levedura, 10 % de solução de sais). Os inóculos foram mantidos em estufas rotativas a 29 °C a 200 rpm por 72 horas (COSTA, *et. al.*, 2016 a e b). Posteriormente 2 mL de cada inóculo foram inoculados em frasco *Erlenmeyer* de 50 mL contendo 20 mL dos meios de cultura (BED 14 g/L, sacarose 6 g/L, peptona 1g/L, 2 % de glicose, 10 % de solução salina 20 x, 0,1 % de *Tween 80*). Esse inóculo foi agitado em estufa rotativa a 29 °C a 200 rpm por 120 horas e foram retiradas amostras de 2 mL nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo submerso. As amostras foram centrifugadas (4000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante reservado para posteriores análises da liberação de açúcares redutores em bagaço de cana-de-açúcar (BCase).

Para realização da atividade de BCase foram utilizados 1,5 mL do sobrenadante dos mini cultivos, e adicionados em micro tubos do tipo *Eppendorf* de 2 mL contendo 0,075 g de BED. A reação ocorreu em *Thermomix* a 50 °C a 400 rpm por 2 horas, em seguida os tubos foram centrifugados e o sobrenadante coletado. A desnaturação das enzimas foi realizada em *Thermomix* a 95 °C a 200 rpm por 15 minutos. Os açúcares redutores deste hidrolisado foram quantificados pelo método desenvolvido por Miller (1959) utilizando o reagente DNS, utilizando glicose como padrão.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão apresentados em forma de média e desvio padrão.

8.2.4. Comparação da fisiologia de secreção das glicohidrolases responsáveis por hidrolisar BHD e BEX em função dos componentes presentes no meio de cultura para o selvagem e para o mutante

Visando estudar a influência de três componentes de meio de cultura para aumentar a atividade das glicohidrolases produzidas pelo *T. harzianum* selvagem e mutante foi

realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para cada cepa. Esta etapa permite determinar diferenças na fisiologia de secreção das glicohidrolases para os dois fungos. Foram avaliados diferentes concentrações de sacarose (0-10 g/L), celulose (0-20 g/L) e farelo de trigo (0-15 g/L), sendo a resposta a atividade de celulase em bagaço BHD e BEX, sendo que a vantagem desta atividade é direcionar, desde a atividade, um meio que melhore a eficiência de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Estes ingredientes foram escolhidos de acordo com os resultados apresentados no capítulo 6, onde a utilização destes componentes para otimizar o meio para a cepa selvagem foi o que resultou em maior potencial de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. No presente estudo, realizaram-se 18 ensaios experimentais, contendo quatro repetições do ponto central.

A Tabela 8.1 apresenta a matriz do planejamento com 4 pontos centrais. A quantidade de extrato de levedura, solução de sais 20 vezes concentrada empregada por Mandels e Reese (1957), *Tween 80* e o volume de tampão pH 5 foram fixados, variando somente as concentrações de farelo de trigo, celulose e sacarose.

Alíquotas de 5 mL foram coletadas nos tempos de 24 e 48 horas de cultivo, centrifugadas (10000 rpm, 10 °C, 15 minutos) e o sobrenadante foi reservado para posteriores análises das atividades das celulases em bagaço de cana-de-açúcar de acordo com o capítulo 5 deste trabalho. As análises do planejamento foram realizadas pelo programa *Statistica 7.0*. Os modelos foram determinados pela técnica de “*backward elimination*”. As análises foram realizadas com 95 % de confiança utilizando erro puro das quadruplicatas do ponto central (NETO BB, SCARMINIO IS & RE BRUNS, 2010).

Tabela 8.1: Composição dos meios de culturas ditadas pelo DCCR para *T. harzianum* selvagem e mutante.

| Componentes estudados | | | |
|------------------------------|---------------------------|--|--------------------------------------|
| Frascos | Sacarose (g/L) | Celulose Celufloc (g/L) | Farelo de trigo (g/L) |
| 1 | 2,02 | 4,05 | 3,04 |
| 2 | 7,97 | 4,05 | 3,04 |
| 3 | 2,02 | 15,94 | 3,04 |
| 4 | 7,97 | 15,94 | 3,04 |
| 5 | 2,02 | 4,05 | 11,95 |
| 6 | 7,97 | 4,05 | 11,95 |
| 7 | 2,02 | 15,94 | 11,95 |
| 8 | 7,97 | 15,94 | 11,95 |
| 9 | 0,00 | 10,00 | 7,50 |
| 10 | 10,00 | 10,00 | 7,50 |
| 11 | 5,00 | 0,00 | 7,50 |
| 12 | 5,00 | 20,00 | 7,50 |
| 13 | 5,00 | 10,00 | 0,00 |
| 14 | 5,00 | 10,00 | 15,00 |
| 15 | 5,00 | 10,00 | 7,50 |
| 16 | 5,00 | 10,00 | 7,50 |
| 17 | 5,00 | 10,00 | 7,50 |
| 18 | 5,00 | 10,00 | 7,50 |

8.2.5. Caracterização fenotípica do mutante selecionado

Foram realizadas comparações das diferentes características visuais entre o selvagem e o mutante 5PCE15. Foram observadas diferenças no crescimento em meio ágar-celulose com a presença de 2 % e 0,5 % de glicose e verificadas diferenças nas produções de esporos. Foi verificado também, diferença na produção de espuma em cultivo submerso em bioreator. Para isso foram utilizadas fotografias em máquina fotográfica comum. Foram realizadas também micrografias com aumento de 400 x (microscópio óptico), obtendo imagens das hifas em cultivo submerso em biorreator para as cepas selvagem e mutante.

8.2.6. Cultivo em Biorreator

Os experimentos foram conduzidos utilizando um litro de volume de trabalho no biorreator (Bioflo 115, New Brunswick Scientific Co., EUA), equipado com controle automático de temperatura (29 °C), pH (5,0), velocidade de agitação (200-500 min⁻¹) e taxa de aeração (0,3-1,0 L min⁻¹). O pH foi controlado por adição automática de H₂SO₄ (0,4 M) ou NH₄OH: H₂O (1:3, v/v), e o nível de O₂ dissolvido foi mantido acima de 30 % de saturação de ar através do ajuste automático de aeramento e agitação. A formação de espuma foi controlada manualmente, conforme necessário, usando agente antiespumante poliglicólico (Fluente Cane 114, Dow Chemical, Brasil) previamente esterilizado. O biorreator foi inoculado com 100 mL (v/v) do inóculo preparado como descrito anteriormente. O meio de cultura utilizado para os dois fungos foi o meio 2 de acordo com a Tabela 1 deste capítulo. As amostras foram periodicamente retiradas, centrifugadas a 10.000 x g durante 15 min a 10 °C, e analisadas pelo método de BCase usando BEX como substrato.

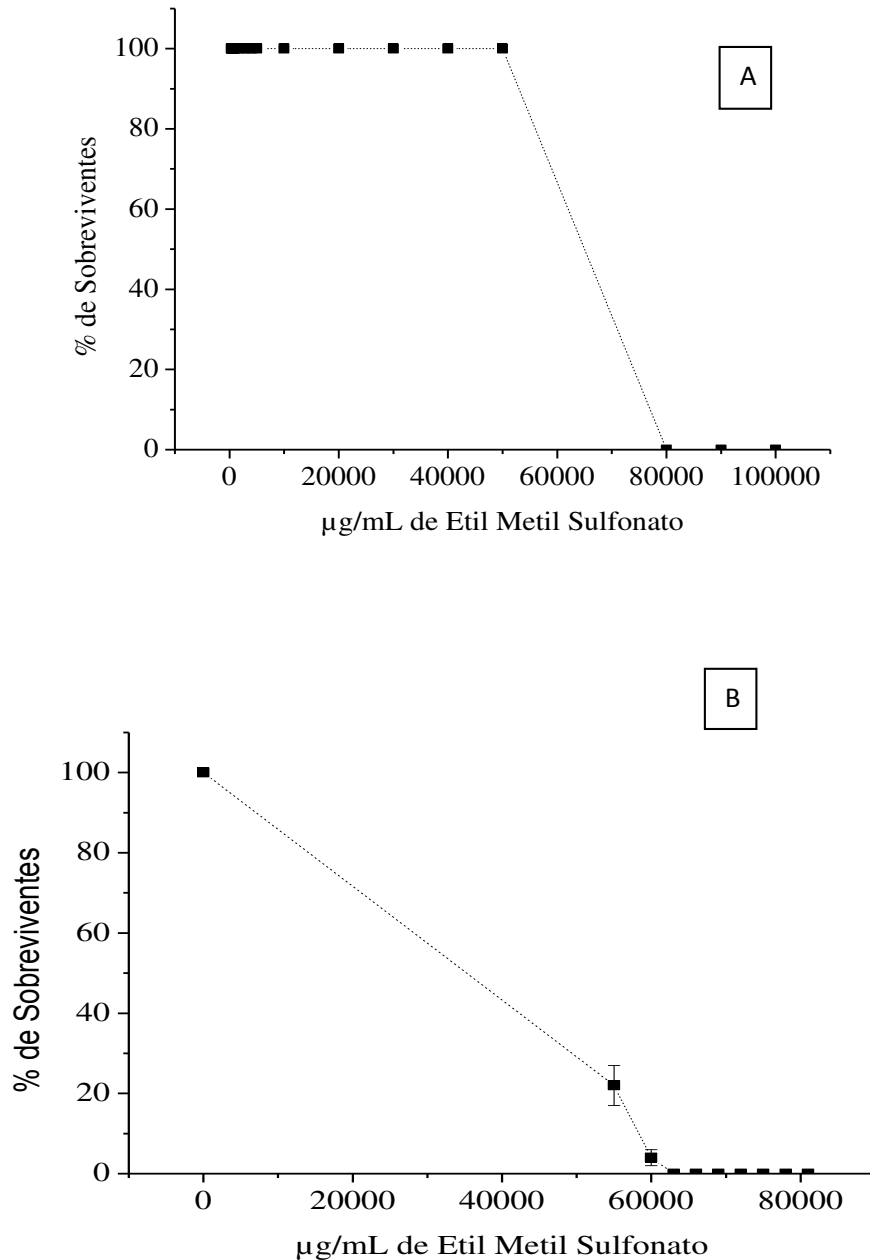
8.3. Resultados

8.3.1. Curvas de mortalidade

A Figura 2 A nos mostra que a concentração letal de EMS para o fungo selvagem está compreendida entre 50 e 80 mg/mL de EMS. Com isso, foi possível diminuir o intervalo de concentrações para determinar com maior facilidade a concentração em que se atinge 95 % de mortalidade, resultado apresentado pela Figura 8.2 B. A concentração onde se têm 95 % de mortalidade está compreendida entre 55 mg/mL (80 % de mortalidade) e 60 mg/mL (96 % de mortalidade). Neste caso, foi realizada uma interpolação para se determinar a faixa de 95 % de mortalidade, que foi de 58 mg/mL de EMS.

A alta concentração de EMS requerida pode ser justificada pela não combinação com outros agentes químicos durante a mutagênese ou com rodadas de mutação UV, o que pode ser visto na literatura (EL-BONDKLY, *et. al.*, 2007; RADHA, *et. al.*, 2012). Outro fator a ser considerado é o tempo de exposição ao agente mutagênico, que em incubações maiores que 60 min poderão requerer menores concentrações de EMS para realização da mutagênese, além das características fisiológicas próprias do fungo *T. harzianum* (MARIYAM, *et. al.*, 2011; LEONARD, *et. al.*, 2013; RIBEIRO, *et. al.*, 2013). Porém, nesta primeira rodada foi escolhida a concentração de 58 mg/mL de EMS em contato com os esporos por um tempo de 60 minutos (Figura 8.2 B). As cepas que obtiveram maiores halos de hidrólise da celulose em meio ágar-celulose foram selecionadas para o mini cultivo submerso, em 2 % de glicose, onde foi selecionada a cepa 1PCE10.

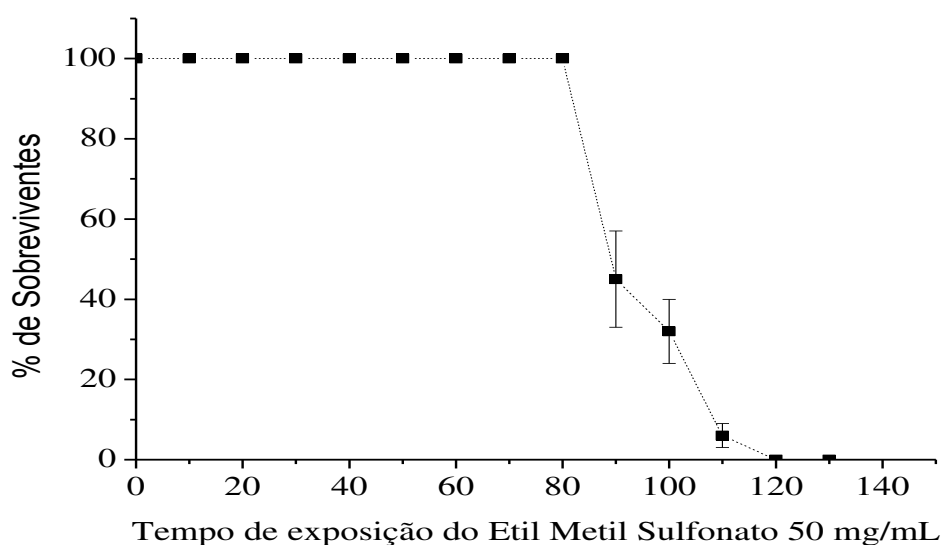
Figura 8.2: Curva de sobrevivência de mutantes EMS para o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11 (selvagem). **A)** Primeira curva **B)** Segunda curva.



A Figura 8.3 mostra a curva de sobrevivência que foi confeccionada para o mutante 1PCE10, selecionado pela primeira rodada de mutação, onde foi fixada uma concentração de 50 mg/mL e foi variado o tempo de exposição ao agente mutagênico, para se atingir os 95 % de mortalidade.

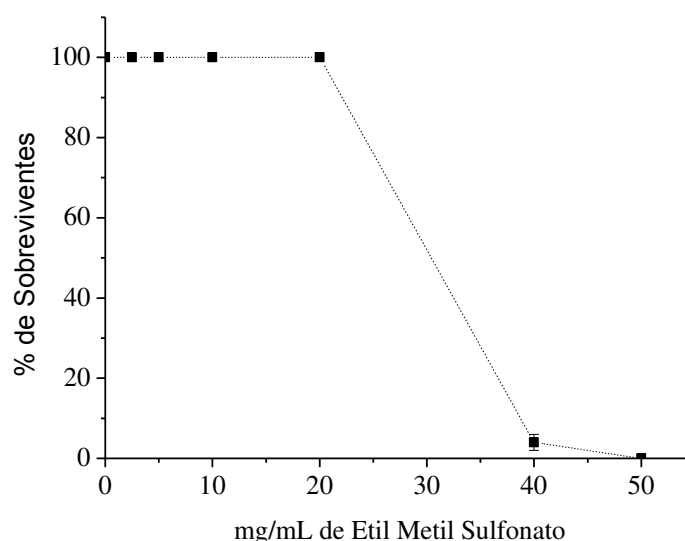
O tempo de exposição para atingir um índice de mortalidade próximo a 95 % é de 110 minutos (Figura 8.3). As cepas que apresentaram os maiores diâmetros de halos de hidrólise no ágar-celulose, neste tempo de exposição, foram selecionadas para o mini cultivo submerso. Foi possível selecionar a cepa 2PCE43, que apresentou maior medida de BCase que a sua parental 1PCE10, quando cultivada em 2 % de glicose. A cepa selecionada ainda apresenta o fenótipo de baixa produção de esporos, conhecida como colônia careca. Na literatura a particularidade das colônias carecas é a não produção de espuma quando cultivadas em reatores em maiores escalas. Esta característica é muito importante, visto que nos cultivos utilizando a cepa selvagem uma das limitações para aumento de escala é a alta produção de espuma (P.CHAND, *et. al.*, 2004; CHAND, *et. al.*, 2005; CHENG, *et. al.*, 2009; DILLON, *et. al.*, 2011; DELABONA, *et. al.*, 2012 e 2013; ZHANG, *et. al.*, 2017). A alta produção de espumas em cultivo submerso é uma grande limitação do processo de produção destas enzimas por fungos filamentosos, pois causa transbordamento do reator, perda de enzimas e consequente redução da eficiência de produção das mesmas pois as enzimas são carregadas pelas espumas que transbordam do reator.

Figura 8.3: Curva de sobrevivência para cepa parental 1PCE10 advinda da mutação por EMS da cepa selvagem *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11.



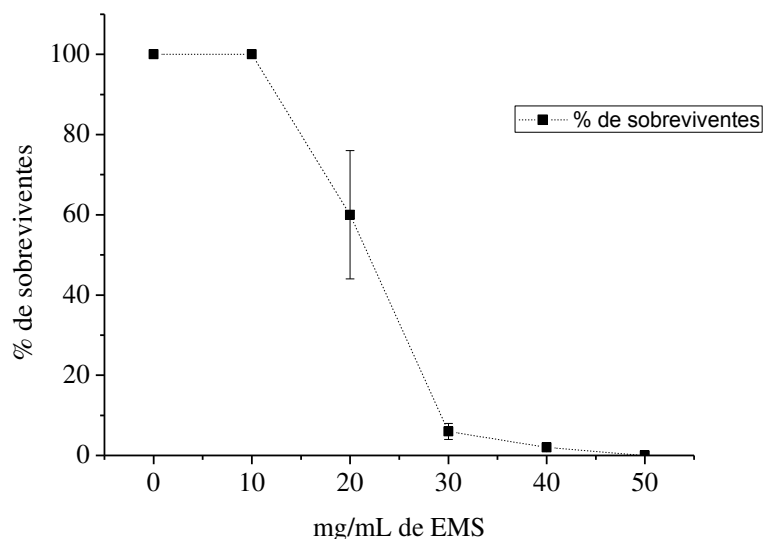
Na Figura 8.4 se encontra a curva de sobrevivência que foi confeccionada para o mutante 2PCE43, selecionado pela segunda rodada de mutação. A concentração onde foi atingida 98 % de mortalidade foi em 40 mg/mL, em 50 mg/mL observou-se 100 % de mortalidade e concentrações abaixo de 20 mg/mL observou-se 0 % de mortalidade, em 60 minutos de exposição.

Figura 8.4: Curva de sobrevivência para a cepa parental 2PCE43 advinda da mutação por EMS da cepa 1PCE10.



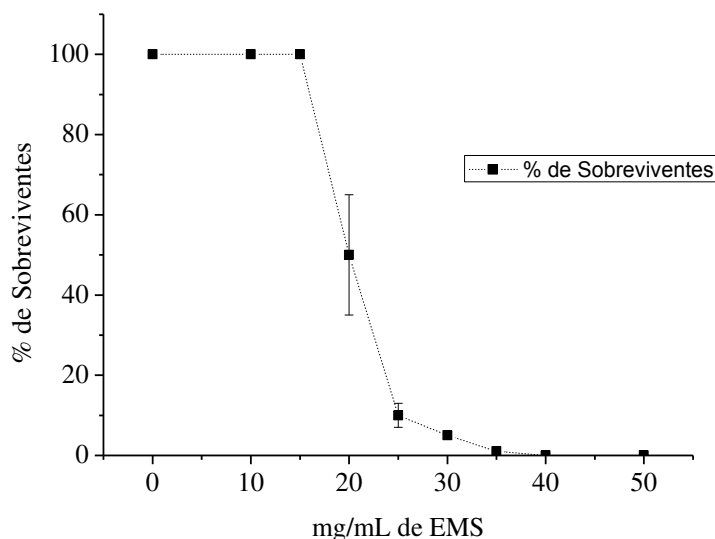
Na Figura 8.5 se encontra a curva de sobrevivência que foi determinada para o mutante 3PCE6. A concentração onde foi atingida 97 % de mortalidade foi em 30 mg/mL. Em 40 mg/mL observou-se 100 % de mortalidade e concentrações abaixo de 10 mg/mL apresentou 0 % de mortalidade, em 60 minutos de exposição. Foram realizadas várias tentativas de mutação nesta concentração com o objetivo de buscar uma cepa que produzisse mais enzimas que a sua parental (2PCE43). Foi selecionado o mutante 4PCE10 que apresentou maior BCase que a sua parental, quando cultivada em meio contendo 2 % de glicose.

Figura 8.5: Curva de sobrevivência para cepa parental 3PCE6 advinda da mutação por EMS da cepa 2PCE43.



Na Figura 8.6 se encontra a curva de sobrevivência que foi confeccionada para o mutante 4PCE10. A concentração onde foi atingida 95 % de mortalidade foi em 25 mg/mL, em 35 mg/mL observa-se 100 % de mortalidade e concentrações abaixo de 15 mg/mL resultou em 0 % de mortalidade. Foram realizadas várias tentativas de mutação nesta concentração com o objetivo de buscar uma cepa que produzisse mais enzimas que a sua parental (4PCE10). Foi selecionado o mutante 5PCE15, que apresentou maior BCase comparado com o seu parental, quando cultivada em meio contendo 2 % de glicose.

Figura 8.6: Curva de sobrevivência para cepa parental 4PCE10 advinda da mutação por EMS da cepa 3PCE6.



8.3.2. Seleção dos mutantes mais promissores das rodadas de mutações por EMS em mini cultivo submerso acrescido de 2 % de glicose

A Tabela 8.2 apresenta o resumo dos melhores resultados alcançados pelas três rodadas de mutação realizadas para a cepa selvagem e suas derivadas mutantes. Os resultados estão expressos em g/L de açúcares redutores (BCase), para as diferentes amostras retiradas nos diferentes tempos de cultivo submerso, para as diferentes cepas. Percebe-se que a cepa 3PCE6 apresentou maior produção de celulases que as demais cepas, apresentando o melhor perfil de produção de celulases, mesmo em cultivo apresentando 2 % de glicose. A cepa 3PCE6 obteve o melhor resultado, dentre as demais cepas testadas, liberando 5,85 g/L de açúcar redutor em 120 horas de cultivo submerso, maior média encontrada de atividade neste tempo de cultivo de acordo com o Teste de Tukey a 95 % de confiança (Tabela 8.2).

Tabela 8.2: Atividade de BCase dos melhores mutantes selecionados das cinco rodadas de mutação e pela cepa selvagem. Letras iguais dentro de cada coluna de tempo de produção relaciona produção iguais e letras diferentes relaciona produções diferentes, de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança.

| Cepas | Tempo (horas) | | | |
|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
| Selvagem | B 0,37 ±0,05 | B 3,43 ±0,15 | C 4,19 ±0,24 | D 3,97 ±0,23 |
| 1PCE10 | D 0,07 ±0,01 | A 4,23 ±0,35 | C 4,34 ±0,32 | C 4,64 ±0,25 |
| 2PCE14 | C 0,27 ±0,02 | C 3,06 ±0,012 | C 4,46 ±0,02 | B 5,22 ±0,11 |
| 2PCE6 | BC 0,30 ±0,02 | E 2,05 ±0,02 | D 3,84 ±0,19 | D 3,74 ±0,01 |
| 2PCE43 | E 0,00 ±0,00 | E 2,23 ±0,23 | B 4,88 ±0,12 | C 4,57 ±0,16 |
| 3PCE6 | C 0,28 ±0,04 | A 4,21 ±0,01 | AB 5,26 ±0,16 | A 5,85 ±0,13 |
| 3PCE7 | E 0 ±0,00 | A 4,23 ±0,16 | B 4,89 ±0,25 | B 5,11 ±0,32 |
| 3PCE1 | C 0,28 ±0,08 | BC 3,06 ±0,18 | A 5,65 ±0,24 | C 4,84 ±0,25 |
| 3PCE9 | B 0,37 ±0,06 | B 3,76 ±0,2 | BC 4,55 ±0,29 | AB 5,02 ±0,2 |
| 3PCE22 | A 0,50 ±0,08 | E 1,92 ±0,16 | D 3,42 ±0,23 | AB 5,27 ±0,32 |
| 3PCE15 | B 0,36 ±0,00 | B 3,45 ±0,12 | B 4,66 ±0,23 | C 4,57 ±0,21 |
| 3PCE2 | C 0,25 ±0,01 | E 1,71 ±0,08 | C 4,3 ±0,1 | B 5,09 ±0,24 |

A Tabela 8.3 apresenta o resumo dos melhores resultados alcançados pela quarta e quinta rodada de mutação. As cepas 5PCE15, 5PCE19 e 4PCE10 apresentaram maior produção de celulases (BCase), de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança, que as demais cepas. Foi escolhido a cepa 5PCE15 pois a mesma não apresenta produção de espuma em seu cultivo e apresentou uma atividade em bagaço na ordem de 90 % maior que a cepa selvagem, quando cultivada em 2 % de glicose.

Tabela 8.3: Atividade de BCase dos melhores mutantes selecionados das cinco rodadas de mutação e pela cepa selvagem P49P11. Letras iguais dentro de cada coluna de tempo de produção relaciona produção iguais e letras diferentes relaciona produções diferentes, de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança.

| Cepas | Tempo (horas) | | | |
|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 48 | 72 | 96 | 120 |
| Selvagem | BC 0,37 ±0,02 | B 3,43 ±0,15 | AB 4,39 ±0,25 | B 3,97 ±0,23 |
| 3PCE6 | BC 0,28 ±0,05 | B 3,85 ±0,16 | A 5,22 ±0,18 | A 5,67 ±0,24 |
| 4PCE3 | BC 0,46 ±0,01 | C 2,19 ±0,16 | AB 4,42 ±0,19 | B 4,01 ±0,24 |
| 4PCE10 | D 0,00 ±0,00 | A 5,92 ±0,23 | A 5,32 ±0,29 | A 5,11 ±0,18 |
| 4PCE7 | A 1,06 ±0,23 | B 3,20 ±0,25 | AB 4,35 ±0,25 | AB 4,15 ±,24 |
| 4PCE1 | CD 0,21 ±0,08 | C 2,71 ±0,01 | AB 4,78 ±0,23 | AB 4,48 ±0,25 |
| 4PCE2 | D 0,00 ±0,00 | BC 3,02 ±0,12 | C 2,82 ±0,14 | A 5,22 ±0,25 |
| 4PCE6 | C 0,18 ±0,02 | B 3,74 ±0,12 | AB 4,82 ±0,16 | A 5,09 ±0,22 |
| 5PCE18 | C 0,07 ±0,02 | C 2,57 ±0,12 | B 3,54 ±0,23 | AB 4,5 ±0,28 |
| 5PCE19 | C 0,14 ±0,02 | A 5,79 ±0,25 | A 5,38 ±0,01 | AB 4,64 ±0,23 |
| 5PCE22 | D 0,02 ±0,12 | C 2,64 ±0,25 | B 4,62 ±0,24 | AB 4,53 ±0,13 |
| 5PCE15 | C 0,14 ±0,02 | A 6,53 ±0,25 | A 5,59 ±0,24 | A 4,87 ±0,21 |
| 5PCE11 | B 0,50 ±0,08 | C 1,99 ±0,11 | C 1,94 ±0,15 | AB 4,39 ±0,25 |
| 5PCE14 | BC 0,34 ±0,09 | C 2,62 ±0,14 | A 5,07 ±0,22 | AB 4,59 ±0,25 |

A mutação clássica vem sendo aplicada há décadas, sobre linhagens de *Trichoderma reesei* (teleomorfo *Hypocrea jecorina*), gerando diversas linhagens, geralmente agrupadas em séries, dentre as quais a mais reportada é a linhagem Rut C30. Esta linhagem teve seu potencial celulolítico incrementado devido à mutação do gene *cre1* (acarretando menor efeito de repressão catabólica da glicose pelas células durante a expressão das enzimas) e ao aumento da quantidade de retículo endoplasmático (promovendo aumento nas taxas de O-glicosilação das proteínas, que é de extrema importância para sinalizar a secreção das mesmas) (LYND *et. al.*, 2002).

O uso de metanossulfonato de etila também foi reportado como agente mutagênico em células de *T. citrinoviride*, proporcionando três vezes mais atividade de

endoglucanase e quatro vezes mais atividade de β -glicosidase (CHANDRA *et. al.*, 2009).

Foi verificado ao longo de todo o trabalho que a medida que a cepa foi sofrendo acumulações de mutações ela foi adquirindo maior desrepreção quanto a produção de células em ambiente repressivo. Atividades maiores poderiam ser obtidas se fossem realizadas maiores números de rodadas de mutações. Porém, o objetivo principal de todo o trabalho foi desenvolver as metodologias de mutação, seleção e otimização do meio para a cepa em estudo. Trabalhos futuros podem ser realizados no sentido de melhorar ainda mais a produção de celulases para essa cepa, onde pode ser alcançado resultados muito mais promissores com base na metodologia aqui elucidada para essa cepa.

8.3.3. Comparação da fisiologia de secreção das glicohidrolases responsáveis por hidrolisar BHD e BEX em função dos componentes presentes no meio de cultura para o selvagem e para o mutante

A Tabela 3 apresenta os resultados da atividade de BCCase em BED e BEX para os sobrenadantes dos diferentes meios de culturas estudados neste tópico para o mutante e o selvagem. Pode-se verificar que a secreção de enzimas pelos dois fungos, de acordo com o meio de cultura não varia drasticamente, tendo um perfil geral bem parecido para os dois fungos, principalmente quando se utiliza BED como substrato para a atividade de BCCase. Entretanto, quando se utiliza BEX como substrato para a atividade foi verificado que o mutante teve um desempenho melhor que o selvagem, principalmente nos pontos centrais do planejamento, sendo que o mutante apresentou uma liberação de em média 4 g/L de açúcares redutores contra 2 g/L para o selvagem. Este resultado foi interessante pois sugere que o mutante consegue secretar de forma mais eficiente enzimas que hidrolisam bagaços lignificados. Este resultado demonstra que a mutação conseguiu acessar genes do complexo lignocelulolítico.

Tabela 8.4: Atividade de BCase em BEX e BHD para os extratos enzimáticos advindo do cultivo do selvagem e do mutante nos diferentes meios de culturas no tempo de 24 e 48 horas de cultivo submerso. Meios definidos na Tabela 1.

| Frascos | g/L de açúcar redutor utilizando BHD como substrato | | | | g/L de açúcar redutor utilizando BEX como substrato | | | |
|---------|---|-------|----------------|-------|---|------|----------------|------|
| | Selvagem P49P11 | | Mutante 5PCE15 | | Selvagem P49P11 | | Mutante 5PCE15 | |
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| 1 | 13,75 | 14,66 | 15,58 | 16,00 | 4,35 | 4,15 | 4,38 | 4,23 |
| 2 | 14,78 | 15,13 | 16,27 | 16,34 | 4,50 | 4,69 | 4,22 | 4,53 |
| 3 | 5,62 | 10,97 | 6,12 | 10,92 | 2,74 | 1,88 | 3,52 | 3,34 |
| 4 | 5,68 | 11,08 | 5,90 | 11,25 | 1,82 | 1,67 | 3,39 | 3,25 |
| 5 | 11,88 | 14,41 | 7,05 | 15,74 | 3,49 | 2,04 | 3,79 | 4,49 |
| 6 | 11,75 | 13,84 | 9,07 | 17,49 | 3,58 | 3,05 | 4,00 | 4,49 |
| 7 | 4,35 | 9,17 | 4,52 | 8,64 | 1,55 | 1,56 | 2,53 | 2,33 |
| 8 | 4,57 | 8,81 | 4,82 | 8,62 | 1,47 | 1,58 | 2,28 | 2,52 |
| 9 | 7,93 | 14,33 | 6,43 | 16,85 | 2,80 | 1,88 | 4,11 | 4,58 |
| 10 | 9,39 | 15,33 | 6,53 | 17,20 | 2,75 | 1,87 | 4,23 | 5,23 |
| 11 | 6,28 | 6,91 | 6,20 | 8,65 | 2,09 | 1,83 | 1,99 | 2,69 |
| 12 | 4,95 | 5,56 | 4,34 | 6,32 | 1,46 | 1,38 | 1,02 | 2,44 |
| 13 | 10,84 | 13,95 | 8,94 | 13,90 | 3,17 | 1,99 | 3,80 | 4,02 |
| 14 | 4,86 | 12,34 | 5,46 | 15,50 | 2,46 | 1,96 | 3,38 | 4,73 |

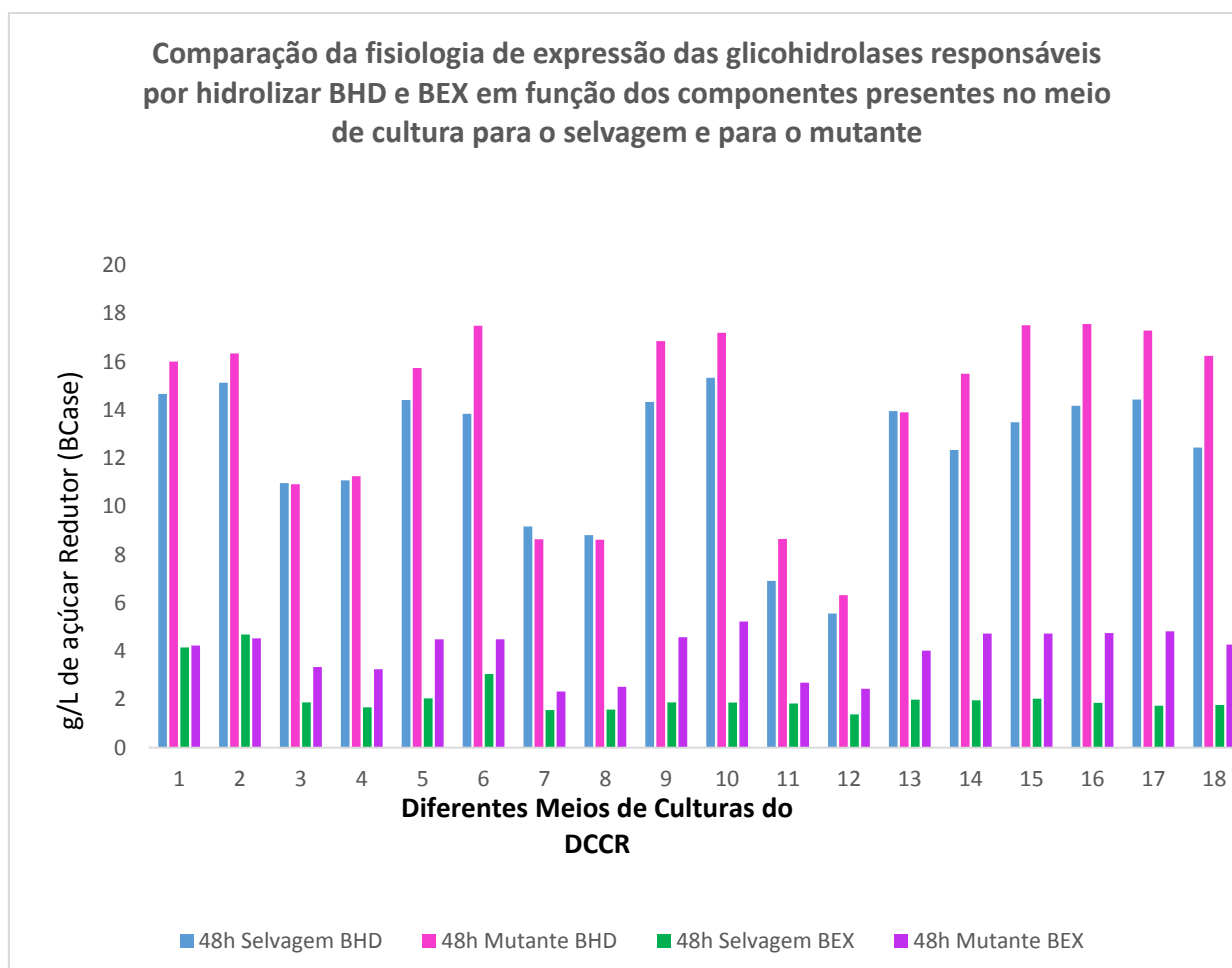
| | | | | | | | | |
|-----------|------|-------|------|-------|------|------|------|------|
| 15 | 5,40 | 13,49 | 6,92 | 17,51 | 2,74 | 2,03 | 4,15 | 4,73 |
| 16 | 4,34 | 14,17 | 6,17 | 17,56 | 2,73 | 1,86 | 3,65 | 4,75 |
| 17 | 5,08 | 14,43 | 6,00 | 17,29 | 1,78 | 1,74 | 4,04 | 4,82 |
| 18 | 5,88 | 12,44 | 5,99 | 16,24 | 1,84 | 1,77 | 4,11 | 4,27 |

A Figura 8.4 abaixo é um resumo dos resultados da Tabela 3 em 48 horas de cultivo, que foi confeccionada para se observar de forma mais clara as diferenças fisiológicas de secreção das glicohidrolases produzidas pela cepa selvagem e para o mutante nos dois substratos testados, BED e BEX. De uma forma geral, o mutante se sobressaiu na maioria dos meios testados com relação ao selvagem e a sua melhor produção está enfatizada quando se utiliza o substrato BEX, principalmente para os meios 5, 6, 9, 10, 13-18, onde se pode verificar que a atividade do mutante é duas vezes maior com relação a atividade do selvagem.

Neste caso foi escolhido o meio 2 para continuar esse trabalho pois este mesmo meio induziu uma melhor produção de enzimas para ambos os fungos testados já em 24 horas de cultivo. O meio 2 induziu a secreção de enzimas em 24 horas de cultivo e foi capaz de liberar 14,8 g/L de açúcares redutores para o selvagem e 16,27 para o mutante, utilizando o substrato BED. Este resultado foi bastante significativo se lembrarmos que a hidrólise foi de apenas 2 horas e o cultivo de apenas 24 horas.

Reese *et. al.* (1969) afirmaram que o complexo celulolítico é induzido pelos substratos relacionados com a sua atividade. Ou seja, para induzir enzimas celulolíticas devem se utilizar substratos celulolíticos como fonte de carbono para o crescimento de fungos filamentosos. Por outro lado, produtos da hidrólise como celobiose e glicose produziram inibição da síntese de celulasas em *Trichoderma*, sendo esses bons indutores de crescimento de biomassa.

Figura 8.7: Comparação da fisiologia de expressão das glicohidrolases responsáveis por hidrolizar BHD e BEX em função dos componentes presentes no meio de cultura para o selvagem e para o mutante, em 48 horas de cultivo submerso.

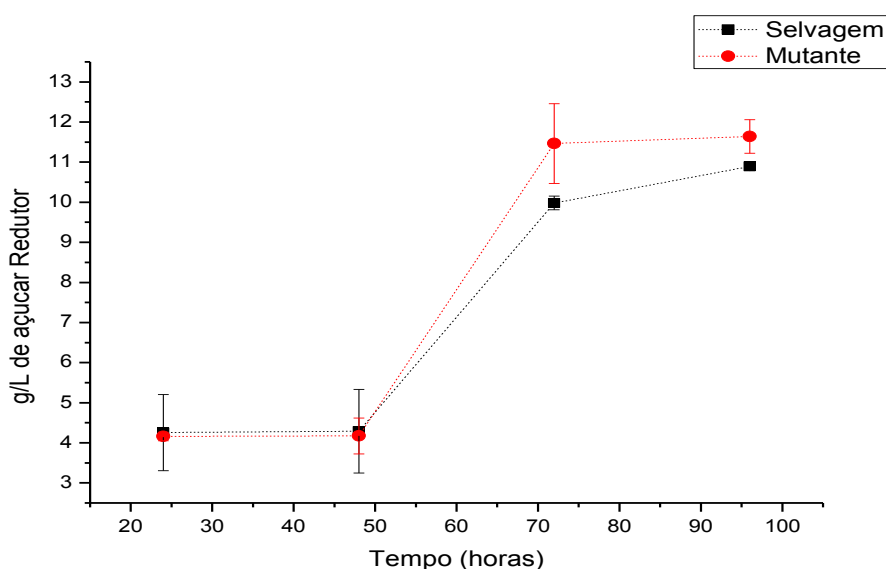


8.3.4. Cultivo em Biorreator

A figura 8.5 representa a cinética de produção das glicohidrolases em cultivo submerso para o selvagem e para o mutante cultivados com o melhor meio obtido pelo planejamento (7,97 g/L de SAC; 4,05 g/L CEL e 3,04 g/L de FT) (meio 2). O material escolhido para ser o substrato do método de BCase foi o BEX, pois é um material de menor custo com relação a materiais deslignificados. Podemos perceber que nestas condições a atividade do mutante e do selvagem foram bem parecidas sendo que o mutante teve um pequeno destaque em tempos tardios de cultivo. Entretanto, o

cultivo do selvagem apresentou uma elevada produção de espumas, o que não foi verificado para o cultivo do mutante.

Figura 8.8: Atividade do mutante e selvagem em BEX (BCse) em diferentes tempos de cultivo submerso em Biorreator com controle automático de temperatura, agitação, oxigênio dissolvido e pH.



8.3.4. Caracterização Fenotípica

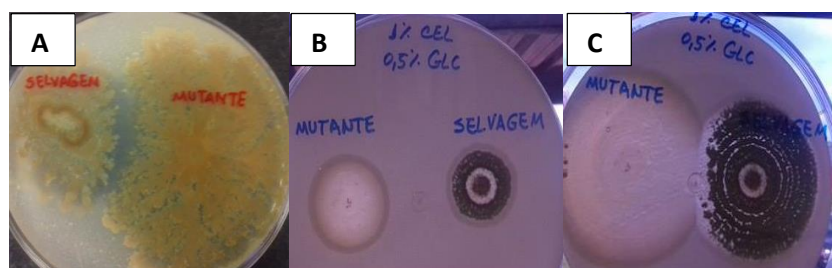
A caracterização morfológica foi realizada fazendo registros das características visuais observadas para o selvagem e para o mutante. Com base nestas observações foi possível direcionar a seleção para as necessidades do processo (MONTENECOURT e EVELEIGH *et. al.*, 1977 b; DILLON *et. al.*, 2012).

A Figura 8.6 mostra a diferença do crescimento em meio sólido, entre o selvagem e o mutante em diferentes condições. A Figura 6 A mostra a diferença do crescimento em meio sólido utilizando 2 % de celulose e glicose. Percebe-se que nesta condição não é formado halo de hidrólise em celulose, provavelmente pois a alta concentração de glicose no meio de cultura já é suficiente para a manutenção do crescimento das cepas, entretanto percebe-se que a cepa mutante apresentou melhor crescimento que a

selvagem nesta condição. A Figura 8.6 B e C mostra o crescimento em meio sólido para as duas cepas na presença de 0,5 % de glicose e em 1 % de celulose em diferentes tempos de crescimento. Percebe-se que nessa condição pôde ser observado a formação de halo de hidrólise da celulose, zona transparente. Neste caso foi observado que o mutante 5PCE15 apresenta uma maior expressão de celulasas, nesta condição, podendo ser confirmada pelo maior diâmetro do halo de hidrólise da celulose presente no meio. Nesta condição pôde-se observar a nítida diferença na produção de esporos entre as duas cepas, sendo a mutante caracterizada como uma colônia careca.

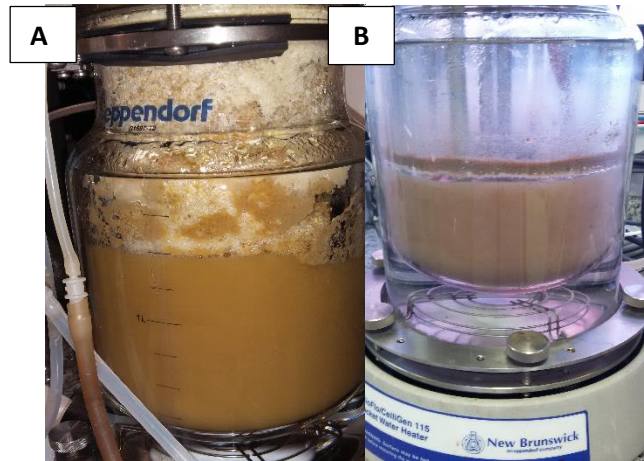
Ilmén *et. al.* (1997) demonstraram que a glicose utilizada como fonte de carbono promoveu bom crescimento de *T. reesei* QM9414, mas exerceu uma forte repressão da síntese de celulasas, este acontecimento também foi verificado para a cepa em estudo.

Figura 8.9: Comparação do crescimento em meio sólido para o selvagem (P49P11) e mutante (5PCE15). **A)** Meio ágar-celulose utilizando 2 % de celulose e 2 % de glicose em 14 dias de crescimento. **B)** Meio ágar-celulose utilizando 1 % de celulose e 0,5 % de glicose em 5 dias de crescimento. **C)** Meio ágar-celulose utilizando 1 % de celulose e 0,5 % de glicose em 14 dias de crescimento.



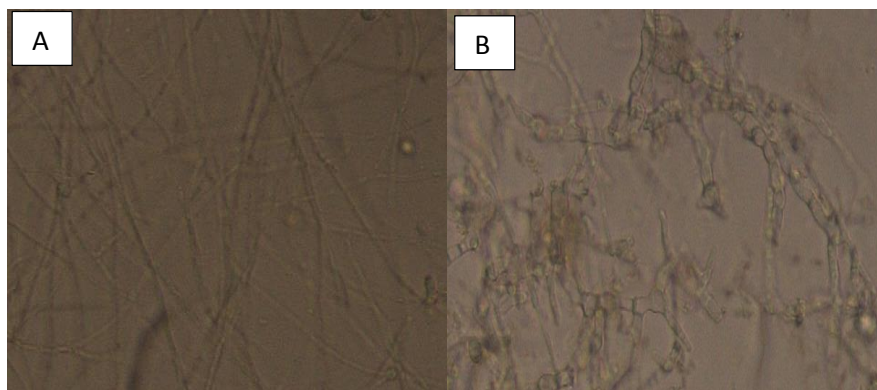
A Figura 8.7 relata a diferença na produção de espumas em cultivo em biorreator de bancada, para as duas cepas. Uma das dificuldades de levar esta cepa selvagem para uma escala maior é a alta produção de espumas que gera muitos problemas de controle e manutenção do processo. Percebe-se que a cepa mutante 5PCE15 (**B**) não apresenta a produção de espumas em seu cultivo, o que é muito verificado para a cepa selvagem (**A**).

Figura 8.10: Comparação da produção de espumas em cultivo submerso em biorreator utilizando 1 L de meio de cultivo para o selvagem (P49P11) (A) e mutante (5PCE15) (B).



A Figura 8.8 representa as micrografias com aumento de 400 x para o selvagem (B) e para o mutante (A), do cultivo em biorreatores de bancada no tempo de 48 h. Percebe-se que o mutante possui as hifas menos ramificadas com relação ao selvagem. O seu cultivo submerso não apresenta produção de esporos sendo que o selvagem já em 48 h pode-se observar uma quantidade razoável do mesmo. Observa-se também que as hifas do mutante são estreitas e alongadas, já o selvagem possui hifas mais espessas, ramificadas e mais curtas. Percebe-se que de fato o mutante possui muitas características visuais e fisiológicas diferentes do selvagem, o que leva a concluir que esta cepa de fato sofreu muitas mutações em seu DNA.

Figura 8.11: Micrografias com aumento de 400 x dos cultivos submersos em Biorreatores de bancada. **A)** Mutante 5PCE15; **B)** Selvagem.



Para os fungos que não produzem esporos ou que possuem uma produção de esporos mais retardada, espera-se que a produção de enzimas se estenda com o tempo, pois provavelmente ele possui deficiência na sinalização celular relacionada com a falta de nutrientes do meio, não acionando assim o seu metabolismo para a produção de esporos. A probabilidade destes fungos também possuírem danos nos genes relacionados a repressão catabólica da produção de celulases é grande, pois os genes relacionados com a sobrevivência e perpetuação da espécie provavelmente são os genes que se encontram em maiores quantidades no DNA. Neste caso, pode-se considerar que também afetou muitas outras partes do seu DNA, tendo uma maior probabilidade de serem afetados as regiões de interesse, relacionadas com a produção de celulases, no nosso caso. Por isso, é necessária uma investigação mais profunda para essas cepas que contêm essas características (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b; SUTO & TOMITA, 2001; LEHNINGER, *et. al.*, 2006; DILLON, *et. al.*, 2011;).

A literatura aponta que fungos que passaram por várias rodadas de mutação foram promissores para a atividade de celulase e foram variando as suas características morfológicas e fisiológicas, ao longo do melhoramento genético, variações essas como a perda de esporos, pigmentação, descontrole da produção das glicohidrolases em ambiente repressivo, dentre outras (MONTENECOURT & EVELEIGH, *et. al.*, 1977 b; SUTO & TOMITA, 2001; LEHNINGER, *et. al.*, 2006; DILLON, *et. al.*, 2011).

A linhagem mutante 5PCE15 apresentou características relevantes para o processo de produção das glicohidrolases, pois a mesma possui maior desrepressão na produção das enzimas na presença do repressor catabólico, a glicose. Foi verificado que a cepa 5PCE15 apresentou baixa produção de esporos e baixa produção de espuma em cultivo submerso, característica valorizada para uma posterior escala pré-industrial. Em posteriores trabalhos será realizada a análise do DNA genômico da cepa mutante 5PCE15 contra a cepa selvagem.

8.4. Conclusão

Com base em todos os estudos foi selecionada a cepa 5PCE15, pois a mesma se mostrou mais desreprimida em cultivo submerso em 2 % de glicose, apresentando maior crescimento em meio sólido e maior halo de hidrólise em ágar-celulose na presença de glicose. Além disso, ela apresenta outras características relevantes para o processo de produção em uma escala maior, como não produção de espuma em seu cultivo submerso e pouca produção de esporos. Foi constatado também que dependendo do meio de cultura a cepa mutante possui uma atividade em BEX duas vezes superior com relação ao selvagem.

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar cultivos em biorreatores de bancada com o meio otimizado desenvolvido para a cepa 5PCE15, verificando formas eficientes de alimentação e cultivo.
- Realizar o sequenciamento do genoma do selvagem e do mutante e comparar os genes modificados, para elucidar melhor a interferência das modificações genéticas.
- Estudar o secretoma do selvagem e do mutante.
- Realizar experimentos em escalas superiores em planta piloto.
- Continuar o melhoramento genético da cepa 5PCE15, utilizando as metodologias desenvolvidas nesse trabalho, para melhorar ainda mais a eficiência de produção de celulasas para este fungo.
- Estudar a hidrólise de materiais lignocelulósicos pelo extrato enzimático produzido pelos novos mutantes.

10. PUBLICAÇÕES REFERENTES A TESE

Congressos e Simpósios

O trabalho “*Micro Fermentação Submersa como Método de Seleção de Mutantes de Fungos Filamentosos*” de autoria COSTA, P. S., ROLBL, D., DELABONA, P. S., D. J., PRADELLA, J. G. C. foi apresentado em SESSÃO POSTER durante o XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS. Inst.promotora/financiadora: UFSCAR e UNICAMP e Associação Brasileira de Engenharia Química. Local: Paraná, Brasil; Cidade: Foz do Iguaçu. 2013.

Resumo expandido

O trabalho “*Evolução de linhagens T. harzianum selvagem por irradiação UV seguida de seleção por micro fermentação dos mutantes promissores quanto a produção de glicohidrolases*” de autoria COSTA, P. S., DELABONA, P. S., COSTA, C. B., ROLBL, D., COSTA, A. C., PRADELLA, J. G. C. foi apresentado em SESSÃO POSTER durante o XI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Local: Hotel Windsor Barra; Cidade: Rio de Janeiro. 2014. **Resumo Expandido**

O trabalho “*Evolução da linhagem Trichoderma harzianum P49P11 selvagem quanto à produção de glicohidrolases por tratamento mutagênico pelo Etil Metil Sulfonato (EMS) seguida de seleção por velocidade de formação de halo em Ágar-celulose*” de autoria de COSTA, P. S., COSTA, I. C., COSTA, A. C., DELABONA, P. S., PRADELLA, J. G. C. foi apresentado em SESSÃO PÔSTER durante o XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Florianópolis SC nos dias 19 a 22 de outubro de 2014. **Resumo Expandido**

O trabalho “*Influência do controle do pH na modulação e otimização do meio de cultura para a produção de glicohidrolases por fungos filamentosos*” de autoria de COSTA, P. S., ROBL, D., LIMA, D. J., PRADELLA, J. G. C., foi apresentado em SESSÃO PÔSTER durante o XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Florianópolis SC nos dias 19 a 22 de outubro de 2014. **Resumo Expandido**

O trabalho “*Glycoside hydrolase enhancement activities of Trichoderma harzianum P49P11 for sugarcane pretreated bagasse enzymatic hydrolysis using statistical optimization*” de autoria de COSTA, P. S; LIMA, D. J. S; DELABONA, P. S; COSTA, A. C; PRADELLA, J. G. C., onde foi apresentado no Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (Monday, April 27 – Thursday, April 30 2015, in San Diego, California). **Resumo Expandido.**

O trabalho "*Desenvolvimento de um método de atividade para celulases utilizando bagaço de cana-de-açúcar para direcionar os processos envolvendo etanol de segunda geração*" de autoria de PATRÍCIA S. COSTA, DIOGO ROBL, ALINE C. COSTA, JOSÉ G. C. PRADELLA, foi apresentado de forma **ORAL** no XX Simpósio Nacional de bio processos e XI Simpósio de Hidrólise enzimática e biomassa que foi realizado no dia 01 a 04 de setembro de 2015 em fortaleza, Ceará, Brasil. **Resumo Expandido**

O trabalho "*Determinação da concentração ideal de glicose e 2-deoxi-D-glicose em meios de seleção para mutantes T. harzianum desreprimidos para a produção de celulases*" de autoria de PATRÍCIA S. COSTA, DIOGO ROBL, ALINE C. COSTA, JOSÉ G. C. PRADELLA, foi apresentado em forma **ORAL** no XX Simpósio Nacional de bio processos e XI Simpósio de Hidrólise enzimática e biomassa que foi realizado no dia 01 a 04 de setembro de 2015 em fortaleza, Ceará, Brasil. **Resumo Expandido**

O trabalho "*Cumulative mutation and new selection strategies for Trichoderma harzianum hypercelulolytic mutants*" de autoria de PATRÍCIA S. COSTA, ALINE C. COSTA, JOSÉ G. C. PRADELLA, foi apresentado em forma de POSTER no 2nd International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering em Roma nos dias 20 a 22 de julho de 2016. **Resumo**

O trabalho "*Cumulative mutation and new selection strategies for Trichoderma harzianum 3PCE6 hypercelulolytic mutants*" de autoria de PATRÍCIA S. COSTA, ALINE C. COSTA, JOSÉ G. C. PRADELLA, foi apresentado em forma de POSTER no 17 th European Congress on Biotechnology 2016 em KRAKOW, Polônia nos dias 3 a 6 de Julho de 2016. **Resumo**

O trabalho "*The culture media optimization of the new mutante Trichoderma harzianum 3PCE6 to enhance glycosyl hydrolases production*" de autoria de PATRÍCIA S. COSTA, ALINE C. COSTA, JOSÉ G. C. PRADELLA, foi apresentado em forma de POSTER no 2nd International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering em Roma nos dias 20 a 22 de julho de 2016. **Resumo**

O trabalho "*Otimização do meio de cultura para T. harzianum 5PCE15 estudando a influência de glicose, sacarose e extrato de levedura para aumentar a atividade das glicohidrolases*" de autoria de PATRÍCIA S. COSTA, ALINE C. COSTA, JOSÉ G. C. PRADELLA, foi apresentado em forma de POSTER no 3º Encontro de Biociências e Tecnologia - BITEC no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, no dia 27 de outubro de 2016. **Resumo**

Revista Científica

COSTA, PATRICIA; ROBL, DIOGO; COSTA, ISABELLE; LIMA, DEISE; COSTA, ALINE; PRADELLA, JOSÉ GERALDO. *Potassium biphthalate buffer for pH control to optimize glycosyl hydrolase production in shake flasks using filamentous fungi. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2016.*

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; VARMA, A. J. & GOKHALE, D. V. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology*, 98(7), 1467-1473, 2007.

ANNA J. Politics, ecology, and the new anthropology of energy: exploring the emerging frontiers of hydraulic. Northeastern University, USA. Energy, environment, engagement: encounters with hydraulic fracking", special section of the *Journal of Political Ecology* 21: 222-348, 2014.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, 100 (23), 5979-5987, 2008.

ADEN, A., FOUST, T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. *Cellulose* 16, 535–545, 2009.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev*, v. 29, n. 4, p. 719-39. ISSN 0168-6445, 2005.

ARO, N. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*, v. 276, n. 26, p. 24309-14, Jun 2001. ISSN 0021-9258, 2001.

AZIN, D. A & NOROOZI R. F. Effect of chemicals on the improved gluconate productivity by an *Aspergillus niger* strain. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 61(3): 393-397, 2001.

BALAT, M. Bioethanol as a vehicular fuel: a critical review. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, v. 31(14), p. 1242-1255, 2009.

BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*; 8: 1155-63, 2008.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858-875, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Appl. Energy*, 86: 2273–2282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>, 2009.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 8, 353-368, 1992.

BNDES & CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável/ organização – Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254, 1976.

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

COSTA P. S; BÜCHLI F; ROBL D.; DELABONA P. S; RABELO S. C; PRADELLA J. G. C. Enhancement of *Penicillium echinulatum* glycoside hydrolase enzyme complex. ISSN 1367-5435. *J Ind Microbiol Biotechnol*.DOI 10.1007/s10295-016-1746-6, 2016 a.

COSTA, P. S; ROBL, D; COSTA, I; LIMA, D; COSTA, A C.; PRADELLA, J. G. C. Potassium biphthalate buffer for pH control to optimize glycosyl hydrolase production in shake flasks using filamentous fungi. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2016 b.

COSTA, D. A.; SOUZA, C. J. A.; COSTA, P. S.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; SANTOS, A. F.; LOPES, M. R.; GENIER, H. L. A.; SILVEIRA, W. B.; FIETTO, L. G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. , v.x, p.x, 2014.

CASTRO, A. M & PEREIRA J. R. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues, *Química Nova*, 33(1), 181–188, 2010.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulases and Xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 162, 1889-1900, 2010.

CAMASSOLA, M.; BITTENCOURT, L. R.; SHENEM, N. T.; ANDREAUS, J DILLON, A. J. P. Characterization of cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. Biocatalysis and Biotransformation, London, v. 22 (5-6), p. 391-396, 2004.

CHAND, P.; ARUNA, A.; MAQSOOD, A. M. & RAO, L. V. Novel mutation method for increased cellulase production. Journal of Applied Microbiology, 98(2), 318-323, 2005.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SANGWAN, N. S.; GAURAY, S. S.; DAROKAR, M. P. & SANGWAN, R. S. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. Bioresource Technology, 100(4), 1659-1662, 2009.

CORTEZ, L.A.B.; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. 2008. Biomassa para Bioenergia. UNICAMP [S.I.], 2008.

CHENG, Y.; SONG, X.; QIN. & QU. Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10. Journal of Applied Microbiology ISSN, p. 1364-5072, 2009.

DELABONA, P.S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. Bioresour Technol 107: 517-521, 2012 a.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; LIMA, D. J. S.; PRADELLA, J. G. C. Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation. Bioresour Technol <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.087>, 2012 b.

DELABONA, P. S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; PAIXÃO, D. A. A.; FARIAS, C. S.; CAIRO, J. P. L. F.; LIMA, D. J.; SQUINA, F. M.; RULLER, R.; PRADELLA, J. G. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -arabinofuranosidase. Bioresource Technology 131. P. 500-507, 2013.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H. & QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6), 578, 2009.

DILLON, A. J. P. Celulases: Enzimas como agentes biotecnológicos In.: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Editores). Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa. 243-269, 2004.

DURAND, H. & CLANET, M. & TIRABY, G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(6), 341-346, 1988.

DEMAIN, A. L. Biosolutions to the energy problem. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 36, p. 319-332, 2009.

DILLON, A. J.; BETTIO, M.; POZZAN, F. G.; ANDRIGHETTI, T.; CAMASSOLA, M. 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, 2011.

DOMINGUES, F., QUEIROZ, J., CABRAL, J., FONSECA, L. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5), 394-401, 2000.

EL-BONDKLY, A. M. & Keera, A. A. UV-and EMS-induced mutations affecting synthesis of alkaloids and lipase in *Penicillium roquefortii*. *Arab Journal of Biotechnology*, 10(2), 241-248, 2007.

ENTREKIN, S., M. EVANS-WHITE, B. JOHNSON; E. HAGENBUCH. Rapid expansion of natural gas development poses a threat to surface waters. *Frontiers in Ecology* 9(9): 503–511, 2011.

FAN, L. T.; LEE, Y-H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology Bioengineering*. 22: 177-199, 1980.

FUENTES L. L. G; RABELO S. C; FILHO R. M; COSTA A. C. Kinetics of Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse to Enhance Enzymatic Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology JCR*, v. 163, p. 612-625, 2011.

FERREIRA, S.M.P., DUARTE, A.P., QUEIROZ, J.A., DOMINGUES, F.C. Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(3), 2009.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268, 1987.

GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., & BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 101, 4775-4800, 2010.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, G.; LIDÉN, ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in biotechnology*; 24: 549-556, 2006.

HALL, C. W. Energy sources and conversions relating foods. *Food and energy resources [S.I.]*, Edited by PIMENTEL, D. E HALL, C. W, Academy press, INC., p. 25-42, 1984.

HENDY, N.; WILKE, C.; BLANCH, H. Enhanced cellulase production using solka floc in a fed-batch fermentation. *Biotechnology Letters*. 4, 785-788, 1982.

HOWARTH, R.; R. SANTORO; A. INGRAFFEA. Methane and the Greenhouse-gas footprint of natural gas from shale formations. *Climatic Change* 105(4): 679-690, 2010.

HOLZMAN, D. Methane found in well water near fracking sites. *Environmental Health Perspectives* 119 (7): a289, 2011.

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Current Opinion in Biotechnology*. 10, 358-364, 1999.

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

IKEHATA, H., & ONO, T. The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research*, 52(2), 115-125, 2011.

JOHN R. DYER. Applications of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N. J., 1-20. Versão traduzida por Aurora Giora Albanese, Editôra Edgard Blucher Ltda em 1969, São Paulo, Brasil, 1965.

KADAM, K. Cellulase production. In: Wyman, C, Eds. Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis Publisher, 231-252, 1996.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulase and hemicellulase by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology.v.91. p.153-1153, 2004.

KASAN, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Current Microbiology, v. 57(5), p. 503-507, 2008.

KAZI, K. K; J FORTMAN and R ANEX. Techbo-Economic Analysis of Biochemical Scenarios for Production of cellulosic Ethanol Technical Report NREL/TP – 6A2 – 46588, 2010.

KOVACS, K. Production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma atroviride* mutants for the biomass-to-bioethanol process. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Department of Chemical Engineering, Lund University, Lund, 2009.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solid pretreated by leadings technologies. Biotechnol Bioeng 102:457-467, 2009.

LEONARD, C. A.; BROWN, S. D. & HAYMAN, J. Random Mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* Genome Results in Fungal Antibacterial Activity. International Journal of Microbiology, 2013.

LAUREN KIRIGIN. United Nations Environment Programme. Environmental and Economic Impacts of Fracking and Oil Extraction. ACUMUN, 2015.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H. & PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Review. 66, 506–577, 2002.

LEHNINGER; NELSON. D. L.; COX. M. M. Princípios de Bioquímica. Quarta edição. São Paulo. Sarvier, 2006.

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

MANDELS, M.; FREDERICK, W.; PARRISH, AND ELWYN T. Reese Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. Journal of Bacteriology 83, 400-408, 1962.

MARIYAM, I. Multistep Mutagenesis for the over-expression of cellulase in *Humicola insolens*. Pakistan Journal of. Botany, 43(1), 669-677, 2011.

MARINA O.S. DIAS, MARCELO P. CUNHA, CHARLES D.F. JESUS, GEORGE J.M. ROCHA, JOSÉ GERALDO C. PRADELLA, CARLOS E.V. ROSSELL, RUBENS MACIEL FILHO, ANTONIO BONOMI. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? Bioresource Technology 102. 8964–8971, 2011.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. Current Opinion in Biotechnology, v. 20, p. 372-380, 2009.

MCKENZIE, L.M., R.Z. WITTER, L.S. NEWMAN, and J.L. ADGATE. Human health risk assessment of air emissions from development of unconventional natural gas resources. Science of the Total Environment 424: 79-87, 2012.

MEDVE, J. Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanases II. Tese de Doutorado. Department of Biochemistry, Lund University, Sweden, 1997.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31(3), p. 426-428, 1959.

MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulose production. Applied and Environmental Microbiology. 777-782, 1977.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 426-432, 2007.

MAYRINK, M. I. C. B. Produção de Enzimas Fúngicas e Avaliação do Potencial das Celulases na Sacarificação da Celulose. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 81 p. (Dissertação de Mestrado), 2010.

NIGAM, P. S. & SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable sources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37, 52-68, 2011.

NETO. B. B.; SCARMINIO. I.S. & BRUNS. R. E. Como fazer experimentos. Edição 4ª. Campinas SP. Editora Bookman, 2010.

OSBORN, S.G., A.VENGOSH, N.R. WARNER, R.B. JACKSON. Methane contamination of drinking water accompanying gas-well drilling and hydraulic fracturing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (20): 8172-8176, 2011.

PENG, F.; REN, J. L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R. C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 6305-6317, 2009.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE-LA-RUBIA, T. & MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5, 53–63, 2002.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. Review of the potential public health impacts of exposures to chemical and radioactive pollutants as a result of the shale gas extraction. Public Health England, London, 2013.

PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; SCANDIFFIO, M. I. G.; CUNHA, M. P.; PINHO, M. G. O.; BONOMI, A. Estudo preliminar do custo de produção in house de celulases na biorrefinaria de etanol de segunda geração. In: Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.

PORTNOY, T. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*, v. 12, p. 269. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619626> >, 2011.

PEREIRA, B.M.P., ALVAREZ, T.M., DA SILVA DELABONA, P., DILLON, A.J.P., SQUINA, F.M., DA CRUZ PRADELLA, J.G. Cellulase On-Site Production from Sugar Cane Bagasse Using *Penicillium echinulatum*. *BioEnergy Research*, 6(3), 1052-1062, 2013.

ROBL, D; COSTA, P. S; BÜCHLI, F; LIMA, D. J. S; DELABONA, P. S; FABIO, S.M; Pimentel, I. C.; PADILLA, G; PRADELLA, J. G. C. Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by *Annulohyphoxylon stygium* glycohydrolases. *Bioresource Technology JCR*, v. 177, p. 247-254, 2015.

ROBL, D; DELABONA, P. S; COSTA, P. S; LIMA, D. J. S; RABELO, S. C; PIMENTEL, I. C.; BÜCHLI, F; SQUINA, F. M; PADILLA, G; PRADELLA, J. G.C. Xylanase production by endophytic using pentose-rich hydrothermal liquor from sugarcane bagasse. *Biocatalysis and Biotransformation (Print) JCR*, v. 1, p. 1-13, 2015.

ROWLANDS, R. T. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme and microbial technology*, 6(1), 3-10, 1984.

RABELO S. C; MACIEL F. R; COSTA A.C. A. Comparison Between Lime and Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology JCR*, v. 144, p. 87-100, 2008.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T. DONZELE, J.L. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 186p, 2005.

REIS, L., SCHNEIDER, W.D.H., FONTANA, R.C., CAMASSOLA, M., DILLON, A.J. Cellulase and xylanase expression in response to different pH levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. *BioEnergy Research*, 7(1), 60-67, 2014.

RABELO S. C; FILHO R. M.; COSTA A. C. Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology JCR*, v. 153, p. 139-150, 2009.

RADHA, S.; BABU, R. H.; SRIDEVI, A.; PRASAD, N. B. L. & NARASIMHA, G. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of

acid protease in submerged and solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, 2(5), 1517-1528, 2012.

REESE, E. T.; LOLA, J. E.; PARRISH, F. W. Modified substrates and modified products as inducers of carbohydrases. *Journal of Bacteriology*. 100, 1151-1154, 1969.

RIBEIRO, O.; MAGALHÃES, F.; AGUIAR, T. Q.; WIEBE, M. G.; PENTTILÄ, M. & DOMINGUES, L. Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. *Bioengineered*, 4(5), 322, 2013.

ROCHA, J.; BUCKERIDGE, M. Biofuelling the future. *New Scientist* [S.I.], v. 202, n. 2709, p. 26-26, 2009.

RODRIGUES M. I. & LEME A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Cárita Editora. 3ª edição, 2014.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by Thompson, N. S., Hemicellulose as a biomass resource. In: *Wood and Agricultural Residues. Research on Use for Food, Fuel and Chemical* (ed. Solters, E. J.), Academic Press, Sandiego, 101–119, 1983.

SANTOS S. C; DIONÍSIO S. R; ROQUE L. R; COSTA A. C; IENCZAK J. L. Fermentation of xylose and glucose mixture in intensified reactors by *Scheffersomyces stipitis* to produce ethanol. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, v. 9, p. 482, 2015.

SEGA, G. A.. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 134(2), 113-142, 1984.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Molecular characterization of UV and chemically induced mutants of *Trichoderma reesei* FCBP-364. *Natural Product Research*, 24 (15), 1438-1448, 2010.

STERNBERG, D. & DORVAL, S. Cellulase production and ammonia metabolism *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 21, 181-191, 1979.

SUTO, M. & TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4), 305-311, 2001.

SOUZA, P. S.; LEITE, D. C. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenerg.* DOI 10.1007/S12155-012-9268-1, 2012.

SILVEIRA, M. H. L.; AGUIAR, R. S.; SIIKA-AHO, M.; RAMON, L. P. Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. *Bioresource Technology*, 151. 392-396, 2014.

VAAJE-KOLDSTAD, G. ET AL. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* 330, 219–222, 2010.

YUSUF, N. N. A. N.; KAMARUDIN, S. K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 52, 741-751, 2011.

XING-HUA, L.; HUAN-JUN, Y.; BHASKAR, R.; ENOCH, Y. P.; LI-JUAN, J.; DAN, W.; YUN-GEN, M. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultravioleta. *Microbiological Research* 165. P. 190-198, 2010.

ZINOVIEV, S.; MÜLLER-LANGER, F.; DAS, P.; BERTERO, N.; FORNASIERO, P.; KALTSCHMITT, M.; CENTI, G.; MIERTUS, S. Next-generation biofuels: survey of emerging technologies and sustainability issues. *ChemSusChem*, 3, 1106-1133, 2010.

ZHANG, X. Y.; ZI, L. H.; GE, X. M.; LI, Y. H.; LIU, C. G.; FENG, W. B. Development of *Trichoderma reesei* mutants by combined mutagenesis and induction of cellulase by low-cost corn starch hydrolysate. *Process Biochemistry* xxx, 2017.