

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/12/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Otimização dos parâmetros de produção para atividade e expressão heteróloga de enzimas celulolíticas pelo fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7*

Alexandra Daniela Barrios Eguiluz

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Coorientadora: Prof. Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira

Araraquara-SP

2022

Otimização dos parâmetros de produção para atividade e expressão heteróloga de enzimas celulolíticas pelo fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7*

Alexandra Daniela Barrios Eguiluz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Coorientadora: Prof. Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira

Araraquara-SP

2022

E132o

Eguiluz, Alexandra Daniela Barrios.

Otimização dos parâmetros de produção para atividade e expressão heteróloga de enzimas celulolíticas pelo fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7* / Alexandra Daniela Barrios Eguiluz. – Araraquara: [S.n.], 2022.
148 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro.
Coorientadora: Tatiana Maria de Souza Moreira.

1. Atividade enzimática. 2. Biorreator. 3. *Botrylloides giganteus*. 4. Celulases. 5. Fungos marinhos. 6. *Trichoderma lixii*. 7. Planejamento fatorial. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Moreira, Tatiana Maria de Souza, coorient. III. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Otimização dos parâmetros de produção para atividade e expressão heteróloga de enzimas celulolíticas pelo fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii*-5A7.

AUTORA: ALEXANDRA DANIELA BARRIOS EGUILUZ
ORIENTADORA: ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO
COORIENTADORA: TATIANA MARIA DE SOUZA MOREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. ANA HELENA JANUÁRIO (Participação Virtual)
Universidade de Franca – UNIFRAN

Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO SOARES (Participação Virtual)
Instituto de Biociências / Universidade Federal de Mato Grosso

Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP

Prof. Dr. TALES ALEXANDRE DA COSTA E SILVA (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC

Araraquara, 16 de dezembro de 2022

Dedico este trabalho a Deus, ao Divino Ninho, porque dia a dia me acompanha e me fortalece. Para meu pai José por todo o seu amor, compreensão, por acreditar em mim, para minha mãe Teresa Graciela que cuida de mim desde o céu e é meu impulso continuar sempre que há dificuldades. Para toda a minha família por mostrar-me o seu apoio. Para meu noivo Juan Carlos por seu companheirismo, confiança, por estar do meu lado e me alentar nos momentos difíceis.

Para eles é essa dedicatória, porque é para eles que devo, pelo seu apoio incondicional.

Alexandra Daniela Barrios Eguiluz

AGRADECIMENTOS

À Deus, por manter minha fé e me amparar nos momentos de dificuldade. A minha família e meu noivo por me acompanhar nessa jornada, pelo amor, pela confiança e paciência.

A minha orientadora Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, pela aceitação no laboratório, a oportunidade de desenvolver o projeto, pelos conselhos e os conhecimentos adquiridos ao realizar o presente trabalho.

Um agradecimento especial à Profa. Dra. Tatiana Maria de Souza, que me co-orientou com paciência e empenho e proporcionou inúmeros conhecimentos que foram primordiais para a conclusão desse trabalho.

Ao professor, Dr. Marcel Otávio Cerri por me receber gentilmente em seu laboratório e contribuir para o desenvolvimento deste trabalho; e ao colega Bruno, pelo auxílio sempre que necessário, pela fundamental colaboração no projeto.

A todos os colegas de trabalho do laboratório pelo apoio e parceria.

A minha melhor amiga Maria Angélica, por alentar-me e escutar-me nos momentos que pareciam difíceis, pela amizade sincera, pelas conversas prolongadas e muitas risadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pelo apoio financeiro e institucional, que foi essencial para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do programa de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara sempre prontos para ajudar no que fosse preciso e a muitas pessoas que fizeram parte da minha vida profissional que gostaria de agradecer-las pela amizade, conselho e companheirismo.

Alguns estão aqui comigo e outros em minha memória e em meu coração, quero agradecer por serem parte de mim, por tudo o que me deram e por todas as suas bênçãos.

Muito obrigada!

RESUMO

Na área industrial existem diversos mecanismos (físicos, químicos, enzimáticos, fermentativos) para degradar biomassa e, assim, obter uma ampla variedade de bioprodutos como biocombustíveis, biopigmentos, carotenoides, etc. Entre os componentes dos resíduos naturais de biomassa, a celulose é o mais abundante podendo degradar os resíduos até glicose e gerar produtos de interesse. Desta forma, as celulasas têm uma ampla utilização na indústria de alimentos, detergentes, têxteis, biocombustíveis, assim como na área farmacêutica. Na atualidade, são utilizadas cepas de alguns fungos para produzir as enzimas celulasas em escala industrial, como exemplo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. Estas enzimas, mesmo tendo um substrato em comum, podem variar sua atividade dependendo da temperatura, pH, especificidade e concentração. Portanto, identificar novos microrganismos com elevado potencial para a obtenção de celulasas é de grande importância na estratégia de melhorar a economia do processo e a especificidade para a obtenção do bioproduto. Levando em consideração a diversidade de microrganismos e a possibilidade de obter uma nova fonte para produção da enzima, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade de enzimas celulolíticas do fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii* -5A7, caracterizá-las quanto à produção e identificação da sequência codificadora. Para tanto, foi selecionado o meio D que apresentou uma maior produção enzimática na temperatura de 20°C, contendo em sua composição carboximetilcelulose (CMC; 20 g/L) como indutor. Na cinética de produção, na temperatura selecionada, obteve-se no 15º dia de produção o maior pico de atividade enzimática específica para β -glicosidase, endoglucanase, FPase e exoglucanase (respectivamente 71,84; 65,87; 49,12 e 68,23 UI/mg). Posteriormente, para otimizar a produção das enzimas celulolíticas do fungo *Trichoderma lixii* - 5A7 foi realizado o planejamento experimental fatorial para o melhor meio de cultura utilizando o delineamento do composto central rotacional (DCCR) e coletando amostras nos dias 13; 14; 15 e 16. A maior produção da enzima β -glicosidase foi no ensaio 23 com 85,91 UI/mg de atividade específica e no ensaio 9 obteve-se uma atividade específica de 125,99; 60,94; 83,60 UI/mg para as enzimas endoglucanase, FPase e exoglucanase respectivamente, sendo os resultados de ambos experimentos com a maior produção no dia 15, os ensaios mencionados foram obtidos da matriz proposta pelo software utilizado para o DCCR. A fermentação em escala de biorreator (3 L) realizada posteriormente demonstrou um pequeno aumento da atividade enzimática apenas para a β -glicosidase no ensaio 23 e no ensaio 9 para a FPase, enquanto as demais enzimas mostraram uma atividade similar à obtida na escala de bancada, mas, no entanto, o pico de maior produção foi obtido no quarto e quinto dia respectivamente. Para clonagem da sequência codificadora, foi extraído o RNA total do fungo para cada ensaio (9 e 23), o qual foi utilizado para a síntese do cDNA com a finalidade de amplificar fragmentos das enzimas celulolíticas, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Em seguida, foi realizado sequenciamento do produto gerado, clonagem e expressão em *Escherichia coli* para então avaliar a produção e atividade celulolítica. Desta forma, no presente trabalho, determinou-se que a produção das enzimas celulolíticas em *T.lixii* -5A7 pode ser otimizada reduzindo a temperatura e variando as concentrações dos componentes do meio selecionado representando uma melhora na atividade enzimática específica entre 80 a 126 UI/mg, tornando esse fungo viável para a produção dessas enzimas. Além disso, foi possível determinar pela primeira vez a sequência codificadora da β -glicosidase desse fungo e caracterizá-la funcionalmente em bactéria.

Palavras-chave: atividade enzimática, biorreator, *Botrylloides giganteus*, celulasas, fungos marinhos, *Trichoderma lixii*, planejamento fatorial.

ABSTRACT

In the industrial area there are several mechanisms (physical, chemical, enzymatic, fermentative) to degrade biomass and thus obtain a wide variety of bioproducts such as biofuels, biopigments, carotenoids, etc. Among the components of natural biomass residues, cellulose is the most abundant and can degrade the residues to glucose and generate products of interest. Thus, cellulases are widely used in the food, detergent, textile, biofuel, and pharmaceutical industries. Nowadays, strains of some fungi are used to produce cellulase enzymes on an industrial scale, such as *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. These enzymes, even having a substrate in common, can vary their activity depending on temperature, pH, specificity, and concentration. Therefore, identifying new microorganisms with high potential for obtaining cellulases is of great importance in the strategy to improve the economy of the process and the specificity for obtaining the bioproduct. Taking into account the diversity of microorganisms and the possibility of obtaining a new source for enzyme production, the present work aimed to evaluate the activity of cellulolytic enzymes from the marine fungus *Trichoderma lixii* -5A7, characterize them in terms of production and identification of the coding sequence. For this purpose, the medium D was selected, which showed the highest enzyme production at a temperature of 20°C, containing carboxymethyl cellulose (CMC; 20 g/L) in its composition as an inducer. In the production kinetics, at the selected temperature, the 15th day of production was obtained as the highest peak of specific enzymatic activity for β -glucosidase, endoglucanase, FPAse and exoglucanase (71.84; 65.87; 49.12 and 68.23 UI/mg, respectively). Subsequently, to optimize the production of cellulolytic enzymes from the fungus *Trichoderma lixii* -5A7, a factorial experimental design was carried out for the best culture medium using the rotational central compound design (DCCR) and collecting samples on days 13; 14; 15 and 16. The highest production of the enzyme β -glucosidase in assay 23 obtained 85.91 IU/mg of specific enzymatic activity and in assay 9 a specific activity of 125.99; 60.94; 83.60 IU/mg was obtained for the enzymes endoglucanase, FPAse and exoglucanase respectively, with the results of both experiments with the highest production on day 15, the mentioned assays were obtained from the matrix proposed by the software used for the DCCR. The fermentation in bioreactor scale (3 L) carried out after, showed a small increase in enzymatic activity only for β -glucosidase in assay 23 and in assay 9 for FPAse, while the other enzymes showed a activity similar to that obtained on the scale bench, but however, the highest production peak was obtained on the fourth and fifth days, respectively. For cloning of the coding sequence, total RNA was extracted from the fungus for each assay (9 and 23), which was used for cDNA synthesis to amplify fragments of the cellulolytic enzymes using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Then, sequencing of the generated product, cloning and expression in *Escherichia coli* were performed to then evaluate the production and cellulolytic activity. Thus, in the present work, it was determined that the production of cellulolytic enzymes in *T. lixii* -5A7 can be optimized by reducing the temperature and varying the concentrations of the selected medium components, representing an improvement in the specific enzymatic activity between 80 and 126 UI/mg, making this fungus viable for the production of these enzymes. In addition to, it was possible to determine for the first time the sequence encoding the β -glucosidase from this fungus and to characterize it functionally in bacteria.

Keywords: enzyme activity, bioreactor, *Botrylloides giganteus*, cellulases, marine fungi, *Trichoderma lixii*, factorial design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura molecular da celulose.....	26
Figura 2. Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico Adaptado de (BARBOSA, 2019).....	28
Figura 3. Ilustração do delineamento realizado no Planejamento Fatorial Experimental.....	52
Figura 4. A) Biorreator TECNAL utilizado para a fermentação dos ensaios 9 e 23	53
Figura 5. Atividade Específica das celulases do fungo marinho <i>Trichoderma lixii-5A7</i>	68
Figura 7. Atividade Específica das Celulases produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> no DCCR de 27 ensaios no dia 13.....	72
Figura 8. Atividade Específica das Celulases produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> no DCCR de 27 ensaios no dia 14.....	72
Figura 9. Atividade Específica das Celulases produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> no DCCR de 27 ensaios no dia 15.....	73
Figura 10. Atividade Específica das Celulases produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> no DCCR de 27 ensaios no dia 16.	73
Figura 11. Diagrama de Pareto da Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica β -glicosidase de <i>Trichoderma lixii-5A7</i>	76
Figura 12. Diagrama de Pareto da Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica endoglucanase de <i>Trichoderma lixii-5A7</i>	77
Figura 13. Diagrama de Pareto da Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica FPase de <i>Trichoderma lixii-5A7</i>	78
Figura 14. Diagrama de Pareto da Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica exoglucanase de <i>Trichoderma lixii-5A7</i>	79
Figura 15. Atividade Específica das Celulases nas diferentes condições (modificando as concentrações do componente YNB) produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> no ensaio 9.....	81
Figura 16. Atividade Específica das Celulases nas diferentes condições (modificando as concentrações do componente YNB) produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> no ensaio 23....	81
Figura 17. Atividade Específica das Celulases produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> no ensaio 9 utilizando o biorreator TECNAL.....	83

Figura 18. Atividade Específica das Celulases produzidas por <i>Trichoderma lixii</i> -5A7 no ensaio 23 utilizando o biorreator TECNAL.....	84
Figura 19. Atividade Específica das enzimas produzidas por <i>Trichoderma lixii</i> -5A7 na temperatura de 30°C no período de 16 dias.....	85
Figura 20. Atividade Específica das enzimas produzidas por <i>Trichoderma lixii</i> -5A7 na temperatura de 20°C no período de 16 dias.....	86
Figura 21. Confirmação de RNA total extraído.	87
Figura 22. Síntese de cDNA	88
Figura 23. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo BG1. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o primer forward foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do <i>primer</i> reverso para serem utilizados na PCR.	91
Figura 24. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo BG2. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o <i>primer forward</i> foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do <i>primer</i> reverso para serem utilizados na PCR.	93
Figura 25. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo EnG1. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o <i>primer forward</i> foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do primer reverso para serem utilizados na PCR.	94
Figura 26. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo EnG2. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o <i>primer forward</i> foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do primer reverso para serem utilizados na PCR.	95
Figura 27. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo EnG3. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o <i>primer forward</i> foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do <i>primer</i> reverso para serem utilizados na PCR.	96
Figura 28. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo ExG1. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o <i>primer forward</i> foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do <i>primer</i> reverso para serem utilizados na PCR.	98
Figura 29. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para BG1. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA “Ladder” (Invitrogen). Canaleta 2 e 3 corresponde a	

Temperatura de anelamento de 57 e 60 °C respectivamente. As bandas selecionadas para purificação estão indicadas com as setas vermelhas..... 99

Figura 30. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para BG2. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA "Ladder" (Invitrogen). Canaleta 2 e 3 corresponde a Temperatura de anelamento de 50 e 55 °C respectivamente. A banda selecionada para purificação está indicada com uma seta vermelha. 100

Figura 31. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para EnG2. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA "Ladder" (Invitrogen). Canaleta 2 e 3 correspondem a Temperatura de anelamento de 48 e 55 °C respectivamente. A banda selecionada está indicada com uma seta vermelha. 100

Figura 32. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para EnG3. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA "Ladder" (Invitrogen). Canaleta 2 corresponde a Temperatura de anelamento de 55 °C. A banda selecionada está indicada com uma seta vermelha..... 101

Figura 33. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para EnG1. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA "Ladder" (Invitrogen). Canaleta 2 corresponde a Temperatura de anelamento de 50 °C..... 102

Figura 34. Alinhamento global múltiplo (pela ferramenta CLUSTAL ômega) entre as sequencias de BG1 deste trabalho e as depositadas no banco de dados que apresentaram maior homologia. 104

Figura 35. Identificação de colônias transformantes com sequência de interesse BG1. Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da PCR de colônia. Poço 6 e 7 contendo colônias transformantes. M: marcador de tamanho molecular..... 105

Figura 36. Identificação de colônias transformantes com sequência de interesse EnG1. Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da PCR de colônia. Poço 1 contendo colônia transformante. M: marcador de tamanho molecular..... 106

Figura 37. Teste de expressão e produção da BG1 em *E. coli* BL21 a 37°C. SDS-PAGE 12%. M: marcador de peso molecular; 1: amostra não induzida (Tempo 0); 2: amostra controle (Tempo 0); 3: amostra controle após 4 h; 4: amostra após 4 h de indução; 5: amostra da fração de proteínas insolúveis após lise celular; 6: amostra da fração de proteínas insolúveis do controle; 7: amostra da fração de proteínas solúveis do sobrenadante após lise celular; 8: amostra da fração de proteínas solúveis do controle..... 107

Figura 38. Atividade da BG1 heteróloga da colônia e do controle na fração solúvel (S) e insolúvel (I) por período de 4h de indução na temperatura de 37°C. 108

Figura 39. Cultura e morfologia do fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7*..... 128

Figura 40. Curva Analítica de Proteínas Totais no Espectrofotômetro BEL ENGINEERING® UV-M51	129
Figura 41. Curva Analítica de D-Glicose.....	129
Figura 42. Curva Analítica <i>p</i> -nitrofenol.....	130
Figura 43. Curva analítica L-Tirosina.....	130
Figura 44. Vetor de expressão pNIC28-Bsa4	147
Figura 45. Diagrama do vetor de clonagem pJET1.2/blunt.....	148



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações de celulase em diferentes segmentos industriais.....	31
Tabela 2. Produção de Celulases via Fermentação Submersa.	34
Tabela 3. Celulases produzidas por microrganismos de ambiente marinho	37
Tabela 4. Composição dos meios de cultura utilizados para produção das enzimas celolíticas pelo fungo <i>Trichoderma lixii</i> 5A7.....	46
Tabela 5. Composição do meio de cultura D utilizado para cinética de produção das enzimas celolíticas pelo fungo <i>Trichoderma lixii</i> -5A7.....	51
Tabela 6. Sequência dos primers utilizados na PCR	56
Tabela 7. Condições de PCR utilizadas para amplificação dos diferentes fragmentos das enzimas celolíticas.....	57
Tabela 8. Componentes da Reação em cadeia da Polimerização (PCR), suas concentrações e quantidades, utilizando a enzima Phusion polimerase.	58
Tabela 9. Componentes da Reação em cadeia da Polimerização (PCR), suas concentrações e quantidades, utilizando a GoTaq polimerase.....	59
Tabela 10. Atividade Específica de celulases do fungo <i>Trichoderma lixii</i> -5A7 produzida em diferentes meios de cultura.....	67
Tabela 11. Atividade Específica de Enzimas Celolíticas do Fungo <i>Trichoderma lixii</i> -5A7 produzidos em Meio D.....	69
Tabela 12. Matriz DCCR do meio de cultivo D em g/L.....	71
Tabela 13. Atividade Especifica das celulases dos ensaios 9 e 23 do DCCR para os quatro dias de cultivo.....	74
Tabela 14. Atividade Específica das Celulases produzidas pelo fungo de ambiente marinho <i>Trichoderma lixii</i> -5A7 no DCCR de 27 ensaios para o dia 15.....	74
Tabela 15. Análise do DCCR pelo Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica β -glicosidase de <i>Trichoderma lixii</i> -5A7.....	76
Tabela 16. Análise do DCCR pela Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica endoglucanase de <i>Trichoderma lixii</i> -5A7.....	77
Tabela 17. Análise do DCCR pela Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica FPase de <i>Trichoderma lixii</i> -5A7.....	78

Tabela 18. Análise do DCCR pela Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica exoglucanase de <i>Trichoderma lixii-5A7</i>	78
Tabela 19. Experimentos realizados para os ensaios 9 e 23 modificando as concentrações do componente YNB do meio D.	80
Tabela 20. Atividade Específica das Celulases produzidas pelo fungo de ambiente marinho <i>Trichoderma lixii-5A7</i> nos ensaios 9 e 23 nas diferentes condições.....	82
Tabela 21. Qualidade e quantificação do RNA total extraído do micélio do fungo <i>Trichoderma lixii-5A7</i> nos ensaios previamente selecionados.....	87
Tabela 22. Número de acesso do banco de dados NCBI, nomes das enzimas e microrganismos selecionados.....	89
Tabela 23. Matriz das porcentagens de identidade entre as sequências proteicas do grupo da β -glicosidase.....	90
Tabela 24. Matriz das porcentagens de identidade entre as sequencias proteicas do grupo da endoglucanase	94
Tabela 25. Matriz das porcentagens de identidade entre as sequencias proteicas do grupo da exoglucanase.....	96
Tabela 26. Porcentagem de Identidade entre BG1 do fungo de ambiente marinho <i>Trichoderma lixii-5A7</i> e β -glicosidasas existentes no banco de dados.....	103
Tabela 27 Análise de variância (ANOVA) para a atividade BG nos quatro diferentes meios de cultivo ao nível de 95% de confiança.....	131
Tabela 28 Comparações de médias da atividade enzimática da BG nos quatro diferentes meios feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.....	131
Tabela 29. Análise de variância (ANOVA) para a atividade EnG nos quatro diferentes meios de cultivo ao nível de 95% de confiança.....	131
Tabela 30. Comparações de médias da atividade enzimática da EnG nos quatro diferentes meios feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.....	132
Tabela 31. Análise de variância (ANOVA) para a atividade FPAse nos quatro diferentes meios de cultivo ao nível de 95% de confiança.	132
Tabela 32. Comparações de médias da atividade enzimática da FPAse nos quatro diferentes meios feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.....	132
Tabela 33. Análise de variância (ANOVA) para a atividade ExG nos quatro diferentes meios de cultivo ao nível de 95% de confiança.....	133

Tabela 34. Comparações de médias da atividade enzimática da ExG nos quatro diferentes meios feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 133

Tabela 35. Atividade Específica de Enzimas Celulolíticas do Fungo *Trichoderma lixii* -5A7 produzidos em Meio D na temperatura de 40°C..... 134

Tabela 36. Análise de variância (ANOVA) para a atividade BG nos ensaios 9 e 23 do planejamento DCCR ao nível de 95% de confiança..... 134

Tabela 37. Comparações de médias da atividade enzimática da BG em quatro dias de fermentação nos ensaios 9 e 23 feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 135

Tabela 38. Análise de variância (ANOVA) para a atividade EnG nos ensaios 9 e 23 do planejamento DCCR ao nível de 95% de confiança..... 135

Tabela 39. Comparações de médias da atividade enzimática da EnG em quatro dias de fermentação nos ensaios 9 e 23 feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 136

Tabela 40. Análise de variância (ANOVA) para a atividade FPAse nos ensaios 9 e 23 do planejamento DCCR ao nível de 95% de confiança..... 136

Tabela 41. Comparações de médias da atividade enzimática da FPAse em quatro dias de fermentação nos ensaios 9 e 23 feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 137

Tabela 42. Análise de variância (ANOVA) para a atividade ExG nos ensaios 9 e 23 do planejamento DCCR ao nível de 95% de confiança..... 137

Tabela 43. Comparações de médias da atividade enzimática da ExG em quatro dias de fermentação nos ensaios 9 e 23 feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 138

Tabela 44. Análise de variância (ANOVA) dos 27 ensaios no dia 15 para atividade BG ao nível de 95% de confiança..... 139

Tabela 45. Comparações de médias da atividade enzimática da BG dos 27 ensaios no dia 15 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 139

Tabela 46. Análise de variância (ANOVA) dos 27 ensaios no dia 15 para atividade EnG ao nível de 95% de confiança..... 140

Tabela 47. Comparações de médias da atividade enzimática da EnG dos 27 ensaios no dia 15 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 140

Tabela 48. Análise de variância (ANOVA) dos 27 ensaios no dia 15 para atividade FPAse ao nível de 95% de confiança..... 141

Tabela 49. Comparações de médias da atividade enzimática da FPAse dos 27 ensaios no dia 15 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 141

Tabela 50. Análise de variância (ANOVA) dos 27 ensaios no dia 15 para atividade ExG ao nível de 95% de confiança..... 142

Tabela 51. Comparações de médias da atividade enzimática da FPAse dos 27 ensaios no dia 15 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. 142

Tabela 52. Análise de variância (ANOVA) das diferentes condições do YNB nos ensaios 9 e 23 para atividade BG ao nível de 95% de confiança. 143

Tabela 53. Comparações de médias da atividade enzimática da BG das diferentes condições do componente YNB para os ensaios 9 e 23 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 143

Tabela 54. Análise de variância (ANOVA) das diferentes condições do YNB nos ensaios 9 e 23 para atividade EnG ao nível de 95% de confiança. 144

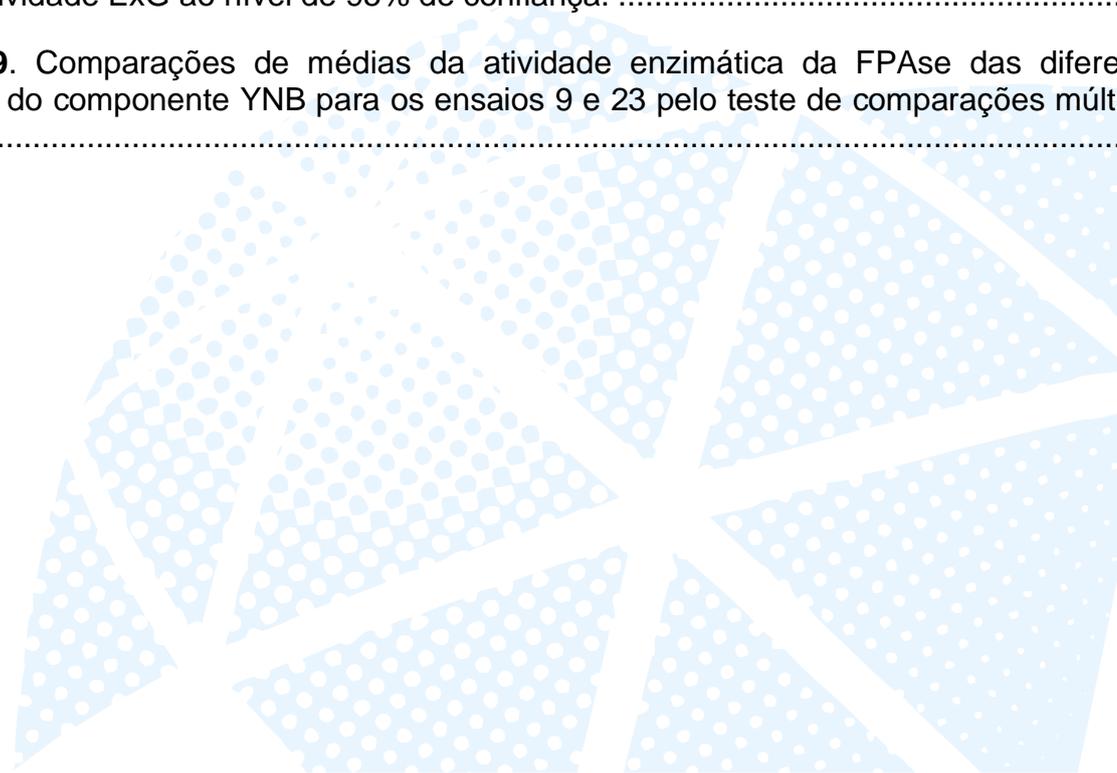
Tabela 55. Comparações de médias da atividade enzimática da EnG das diferentes condições do componente YNB para os ensaios 9 e 23 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 144

Tabela 56. Análise de variância (ANOVA) das diferentes condições do YNB nos ensaios 9 e 23 para atividade FPAse ao nível de 95% de confiança..... 144

Tabela 57. Comparações de médias da atividade enzimática da FPAse das diferentes condições do componente YNB para os ensaios 9 e 23 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 145

Tabela 58. Análise de variância (ANOVA) das diferentes condições do YNB nos ensaios 9 e 23 para atividade ExG ao nível de 95% de confiança. 145

Tabela 59. Comparações de médias da atividade enzimática da FPAse das diferentes condições do componente YNB para os ensaios 9 e 23 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 146



LISTA DE ABREVIATURAS

AE	atividade enzimática
BG	β -glicosidase
BSA	soro albumina bovina
°C	graus Celsius
CBHs	celobiohidrolases
CBH I	celobiohidrolase tipo I
CBH II	celobiohidrolase tipo II
cDNA	DNA complementar
CMC	carboximetilcelulose
CMCase	atividade endoglucanase
DCCR	delineamento do composto central rotacional
DNS	ácido dinitrosalicílico
DTT	dithiothreitol
EC	"Enzyme Commission"
EEB	extrato enzimático bruto
EnG	endoglucanases
ExG	exoglucanases
FES	fermentação em estado sólido
FPase	"Filter Paper Activity"
FS	fermentação submersa
h	horas
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
L	litros
LIC	clonagem independente de ligação

min	minutos
nm	nanômetros
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDA	ágar dextrose batata
PSMF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
qPCR	PCR em tempo real
RCL	hidroclorato de guanidina
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
s	segundos
Tm	temperatura de "melting"
UI	Unidade Internacional
um	micrômetro
UV	ultravioleta
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
x g	aceleração gravitacional
YNB	Base Nitrogenada de Levedura



SUMÁRIO

SUMÁRIO	19
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	17
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	25
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Microrganismo e Manutenção	45
4.2 Produção enzimática	46
4.3 Preparo das curvas de calibração	47
4.3.1 Curva de calibração Bradford	47
4.3.2 Curva de Calibração D-glicose	47
4.3.3 Curva de Calibração <i>p</i> -nitrofenol	48
4.3.4 Curva de Calibração L-Tirosina	48
4.4 Dosagem enzimática	48
4.4.1 Determinação de Celulase Total	48
4.4.2 Determinação de atividade de endoglucanase	49
4.4.3 Determinação de atividade de exoglucanase	49
4.4.4 Determinação de atividade de β -glicosidase	50
4.4.5 Determinação de atividade de protease	50

4.5	Cinética de produção enzimática.....	51
4.6	Planejamento Fatorial Experimental.....	51
4.7	Sistema de Fermentação em Biorreator para produção das celulases	52
4.8	Sistema de aquisição de dados e controle do biorreator.....	53
4.9	Extração de RNA total	54
4.10	Síntese de cDNA.....	55
4.11	Desenhos dos iniciadores (primers) para PCR das enzimas celulolíticas.....	55
4.12	Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	56
4.13	Purificação dos produtos da PCR	59
4.14	Sequenciamento	61
4.15	Clonagem dos fragmentos de interesse obtidos	61
4.15.1	Reação de ligação com o vetor utilizando a técnica LIC (Clonagem Independente de Ligase) para o grupo BG1.....	61
4.15.2	Reação de ligação com o vetor pJet1.2blunt para EnG1.....	62
4.16	Análise dos clones recombinantes	63
4.16.1	PCR de colônia BG1e EnG1.....	63
4.16.2	PCR das colônias do grupo EnG1	63
4.17	Extração de DNA Plasmidial	64
4.18	Transformação e Expressão heteróloga em <i>E.coli</i>	64
4.19	Indução da expressão heteróloga de beta-glicosidase	65
4.20	Atividade enzimática da BG1 recombinante.....	66
5.	RESULTADOS	67
5.1	Dosagem de atividade das enzimas celulolíticas	67
5.1.1	Nos diferentes meios de cultivo (A, B, C e D).....	67
5.1.2	No Cultivo selecionado	68

5.2	Planejamento Fatorial Experimental	70
5.3	Produção das celulasas em escala de Biorreator	83
5.4	Dosagem de atividade das enzimas proteolíticas	84
5.5	Extração de RNA total e síntese do cDNA	87
5.6	Desenho dos iniciadores (<i>primers</i>) para PCR	89
5.7	Reação em cadeia da Polimerase	99
5.8	Sequenciamento.....	102
5.9	Clonagem dos fragmentos de interesse	105
5.10	Expressão e atividade da BG1 recombinante em <i>E. coli</i>	106
6.	DISCUSSÃO.....	109
7.	CONCLUSÕES.....	115
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
9.	APÊNDICE	128
10.	ANEXO	147



As celulasas, responsáveis pela hidrólise enzimática da celulose, são um complexo enzimático composto por:

- a) *endo*-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) que hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória;
- b) *exo*-1,4- β -D-glucanases (glucano-hidrolase EC 3.2.1.74 e celobio-hidrolase EC 3.2.1.91) que hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades liberando celobioses;
- c) 1,4- β -D-glicosidases (EC 3.2.1.21) que promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuloligossacarídeos.

As celulasas possuem outras aplicações além da degradação de resíduos industriais, sendo aplicadas nas indústrias têxtil, para remoção de fios de celulose; de alimentos, usadas na extração e clareamento de sucos de frutos e de vegetais; de detergentes, para favorecer a remoção de manchas profundas nas roupas; de alimentação animal, para realizar a hidrólise parcial da celulose e da hemicelulose à fim de favorecer uma rápida absorção, como aditivo no preparo de enzimas digestivas, dentre outras aplicações (JUTURU; WU, 2014).

Apesar das vantagens que a rota enzimática apresenta tais como o menor gasto energético e a não formação de subprodutos tóxicos, o alto custo da produção de enzimas é um obstáculo para a sua implementação em escala industrial, podendo corresponder a 40% do custo total do processo (SALOMÃO et al., 2019).

As celulasas são produzidas principalmente pelos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (AGUIAR; LUCENA, 2011; DASHTBAN et al., 2009). Embora esses fungos filamentosos sejam as maiores fontes de celulasas e as cepas mutantes de *Trichoderma* incluindo *T. reesei*, *T. viride* e *T. longibrachium* sejam os melhores produtores conhecidos de celulasas, é também de conhecimento da literatura que estas espécies de *Trichoderma* têm um baixo nível de atividade da enzima β -glicosidase (SINGHANIA et al., 2010). A deficiência na expressão dessa enzima restringe a conversão de celobiose em glicose, proporcionando inibição da atividade das celulasas pelo acúmulo de celobiose. Portanto, para sua efetiva aplicação a adição de β -glicosidase se faz necessária, encarecendo o processo de

hidrólise e além disso, a produção em grande escala dessas enzimas necessita de microrganismos que sejam capazes de produzir um complexo enzimático com altos teores, extracelular e completo com os três tipos de atividade celulolítica (MORAIS et al., 2021).

Dada a importância de se obter enzimas celulolíticas mais estáveis, altamente ativas e específicas para serem utilizadas nas diferentes áreas industriais, assim como, na produção de bioetanol, a procura por novos microrganismos com maior potencial e especificidade na produção destas enzimas seria uma alternativa para reduzir os gastos na produção e obter novas fontes com alta tolerância a condições extremas como pode ser considerado no caso dos fungos de ambiente marinhos.



7. CONCLUSÕES

- A análise das atividades enzimáticas no meio D deste estudo mostrou que a CMC é um substrato ideal para as enzimas celulolíticas produzidas por *T. lixii*, com resultados superiores aos demais meios de cultivo realizados.
- A produção das enzimas endoglucanases pelo fungo marinho *T. lixii* - 5A7 mostraram um melhor comportamento que as demais enzimas na temperatura de 30°C.
- As enzimas celulolíticas mostraram uma atividade enzimática específica superior na temperatura de 20°C, porém necessitaram mais dias de cultivo.
- A análise da cinética enzimática no meio de cultivo D deste estudo mostrou que o pico de maior produção para todas as celulasas foi no dia 15, no qual foram obtidos 71,84; 65,87; 49,12 e 68,23 UI/mg de atividade enzimática específica para β -glicosidase, endoglucanase, FPAse e exoglucanase respectivamente.
- No Planejamento Fatorial Experimental a produção das enzimas BG pelo fungo marinho *T. lixii* - 5A7 obteve a maior produção no ensaio 23 com 85, 91 UI/mg para o dia 15.
- As enzimas endoglucanase, FPAse e exoglucanase mostraram uma atividade enzimática específica superior ao ponto central do DCCR no ensaio 9 na temperatura de 20°C do dia 15 obtendo 125, 99 UI/mg; 60,94 UI/mg e 83,60 UI/mg respectivamente.
- Com a diminuição de 50% a concentração do composto YNB do meio D, foi obtido um pequeno aumento na atividade específica das celulasas na condição 1 produzidas pelo fungo *T. lixii*-5A7 para ambos ensaios (9 e 23) no dia 15 na temperatura de 20°C, comparado ao ponto central.
- A dosagem da atividade específica das celulasas em escala de biorreator, demonstrou que o fungo de ambiente marinho *T. lixii*-5A7 teve a capacidade de produzir um pico de maior produção no tempo de 120 horas e 96 horas para os ensaios 9/condição 1 e 23/condição 1, respectivamente.

- Na extração do RNA total foi observado uma qualidade adequada para realizar a síntese do cDNA e posteriores experimentos.
- Na amplificação dos fragmentos codificadores das enzimas celulolíticas, foram obtidas bandas com os tamanhos esperados para o grupo das BG, EnG e ExG, sendo que apenas a sequência codificadora de BG apresentou alta identidade (80-93%) com as sequências de β -glucosidases de outros microrganismos, já depositadas no banco de dados.
- A BG1 recombinante foi expressa na *E.coli* BL21 GroEL-GroES obtendo o tamanho esperado de aproximadamente 52 kDa.
- Observando os dados obtidos na atividade da BG1, pode-se inferir que estes resultados são promissores, tendo em vista o baixo número de estudos envolvendo expressão heteróloga de β -glucosidase de fungo de ambiente marinho em *E.coli*, assim como o valor de atividade enzimática específica encontrado para a enzima recombinante BG1 de 42,36 UI/mg.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, Noorlidah et al. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. **Scientia Horticulturae**, v. 161, 2013.

ADNEY, B; BAKER, J. Measurement of cellulase activities laboratory. **Technical Report NREL/TP-510-42628**, n. January, 2008.

AHAMED, Aftab; VERMETTE, Patrick. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5979-5987, 2009.

AHMED, Sibtain et al. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, 2009.

ANDERSEN, Natalija. **Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Experimental and Modeling studies**. Ph.D. Thesis. BioCentrum-DTU Technical University of Denmark, 2007.

ANDERSON, Iain et al. Genomics of aerobic cellulose utilization systems in Actinobacteria. **PLoS ONE**, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039331>.

ANTONIÊTO, A.C.C. et al. *Trichoderma reesei* CRE1-mediated carbon catabolite repression in response to sophorose through RNA sequencing analysis. **Current Genomics**, v. 17, n. 2, 2016.

ARBIGE, Michael V.; SHETTY, Jay K.; CHOTANI, Gopal K. Industrial Enzymology: The Next Chapter. **Trends in Biotechnology**. v. 37, n. 12, p. 1355-1366, 2019. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.09.010.

ARISTIDOU, Aristos; PENTTILÄ, Merja. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 11, n. 2, p. 187-98, 2000. doi: 10.1016/s0958-1669(00)00085-9.

ARO, Nina. Characterization of novel transcription factors ACEI and ACEII involved in regulation of cellulase and xylanase genes in *Trichoderma reesei*. **VTT Publications**, n. 488, 2003.

ASHA, Balachandrababu Malini; SAKTHIVEL, Natarajan. Production, purification and characterization of a new cellulase from *Bacillus subtilis* that exhibit halophilic, alkalophilic and solvent-tolerant properties. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 4, 2014.

ASTOLFI FILHO, Spartaco; NUVES-SILVA, Carlos Gustavo; BIGI, Maria de Fátima Mendes Acário. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégica**, v. 19, n. 38, 2014.

BADHAN, A. K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, 2007.

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

BAJAJ, Priyanka; MAHAJAN, Ritu. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103, n. 21-22, p. 8711-8724, 2019. doi: 10.1007/s00253-019-10146-0.

BARBAS, Carlos F. et al. Quantitation of DNA and RNA. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2007, n. 11, 2007.

BASHIROVA, Anna et al. Disulfide bond engineering of an endoglucanase from *Penicillium verruculosum* to improve its thermostability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019.

BÉGUIN, Pierre; AUBERT, Jean Paul. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, January 1994.

BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 15, n. 1, p. 197-210, 2017.

BELMESSIKH, Aicha et al. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 3, 2013.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**. v. 15, n. 3–4, p. 583-620, 1997

BILAL, M., IQBAL, H.M. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. **Environment International**, n. 124, p. 336–353, 2019.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. 1 ed. ed. 2001.

BRIJWANI, Khushal; OBEROI, Harinder Singh; VADLANI, Praveen V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean

hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, 2010.

CAO, Yanli et al. Rce1, a novel transcriptional repressor, regulates cellulase gene expression by antagonizing the transactivator Xyr1 in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, 2017.

CARLE-URIESTE, Jose Carlos et al. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 15, 1997.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. Reviews. **New Phytologist**, v. 129, n. 2, p. 367–370, 1995.

CASTRO, A.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química nova**, v. 33, p. 181–188, 2010.

CASTRO, Aline Machado de et al. High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. **Enzyme Research**, v. 2010, 854526. doi: 10.4061/2010/854526. 2010.

CHEN, Ling et al. Characterization of the Ca²⁺-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, 2016.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: Ed. Epub, 2008. 288 p.

CRUCELLO, Aline et al. Analysis of genomic regions of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 related to biomass degradation. **PLoS ONE**, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122122>.

CUI, Yanbing et al. Efficient secretory expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* with a novel actinomycete signal peptide. **Protein Expression and Purification**, v. 129, 2017.

DALMASO, Gabriel Zamith Leal; FERREIRA, Davis; VERMELHO, Alane Beatriz. Marine extremophiles a source of hydrolases for biotechnological applications. **Marine Drugs**. v. 13, n. 4, p. 1925-65. 2015. doi: 10.3390/md13041925.

DASHTBAN, Mehdi; SCHRAFT, Heidi; QIN, Wensheng. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**. v. 5, n. 6, p. 578–595, 2009

DESHPANDE, Mukund V.; ERIKSSON, Karl Erik; GÖRAN PETTERSSON, L. An assay for selective determination of exo-1,4,- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. **Analytical Biochemistry**, v. 138, n. 2, p. 481-487, May 1984.

EL-ENSHASY, Hesham A. Filamentous Fungal Cultures-Process Characteristics,

Products, and Applications. **Bioprocess. Value-Added Prod. from Renew. Resour.** p. 225-261, 2007.

ELLILÄ, Simo et al. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, 2017.

EVELEIGH, Douglas E et al. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 21. doi: 10.1186/1754-6834-2-21. 2009.

FARRELL, Robert E. Jr. RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization. **FEBS Letters**. , 2017

FELÍCIO, Rafael de; OLIVEIRA, Ana Ligia Leandrini de; DEBONSI, Hosana Maria. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, 2012.

FLACHNER, B.; RÉCZEY, K. β -Glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 18, n. 3, 2004.

GARG, S. K.; NEELAKANTAN, S. Studies on the properties of cellulase enzyme from *Aspergillus terreus* GN1. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 3, 1982.

GARVEY, Megan et al. Expression of recombinant cellulase Cel5A from *Trichoderma reesei* in tobacco plants. **Journal of Visualized Experiments**, 2014.

GHORI, M.I et al. Corn stover-enhanced cellulose production by *Aspergillus niger* NRRL 567. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 5878–5886, 2011.

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

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GMOSE, Rebecca et al. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus *N. intermedia*. **Waste Management**, v. 97, 2019.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, p. 15-32, 2002

HAJJI, M.; REBAI, A.; GHARSALLAH, N. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using

state cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, 2014.

KLEMM, Dieter et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.

KUBICEK, Christian P. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 133-142, 2013. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.020.

KUHAD, Ramesh Chander; GUPTA, Rishi; SINGH, Ajay. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**. Volume, 2011, Article ID 280696, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/280696>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, 1970.

LESCHINE, S. B. Cellulose Degradation in Anaerobic Environments. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 399-426, 1995. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.002151.

LI, Xiaoyi et al. The spatial proximity effect of beta-glucosidase and cellulosomes on cellulose degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 115, p. 52-61, August 2018.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 1, p. 5-18, 2007.

LINDER, M., TERRI, T. The roles and function of cellulose-binding domains. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 15-28, 1997.

LORENCI WOICIECHOWSKI, Adenise et al. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**. v. 304, n. 3, p. 122848, 2020.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-77, 2003.

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

MARCHLER-BAUER, Aron et al. CDD: A conserved domain database for interactive domain family analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Suppl. 1, 2007.

MARHUENDA-EGEA, Frutos C.; BONETE, María José. Extreme halophilic enzymes

doi: 10.1186/s13068-017-0845-6. eCollection 2017.2017.

RICHARDS, Thomas A. et al. Marine fungi: Their ecology and molecular diversity. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, p. 495-522, 2012. doi: 10.1146/annurev-marine-120710-100802. 2012.

ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, 2015. doi: 10.1042/bse0590001.

ROBSON, Geoffrey D. et al. Oxidative stress, fragmentation and cell death during bioreactor growth of filamentous fungi. **British Mycological Society Symposia Series**, v. 27, n. C, 2008. Chapter 9.

ROSSI, Márcio J.; FURIGO, Agenor; OLIVEIRA, Vetúria L. Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, 2007.

SALOHEIMO, A et al. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, 2000.

SALOHEIMO, A et al. A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 2, 1994.

SALOHEIMO, M et al. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **European Journal of Biochemistry**, v. 249, n. 2, 1997.

SALOMÃO, Gabriella Soares Borges et al. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, 2019.

SALOMÃO, GABRIELLA SOARES BORGES. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. 2017. 83 f. Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. **Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr , 2001. ISBN: 978-0879695774.

SANDHU, Simranjeet Kaur et al. Two-stage statistical medium optimization for *augmented cellulase* production via solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus niger* HN-1 and application of crude cellulase consortium in hydrolysis of rice straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12653–12661, 2013.

SCHMOLL, Monika. Regulation of plant cell wall degradation by light in *Trichoderma*. **Fungal Biology and Biotechnology**. v. 5, n. 10. 2018. doi: 10.1186/s40694-018-

0052-7.

SCHMOLL, Monika; SCHUSTER, André. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 87, n. 3, p. 787-99, 2010. doi: 10.1007/s00253-010-2632-1.

SILVA, C.F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiota associada aos frutos e grãos de café**. 2004. 156 f. Universidade Federal de Lavras, 2004.

SINGH, Gopal et al. Cloning, sequencing and in silico analysis of β -glucosidase from *Bacillus subtilis* strain PS. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 3, 2018.

SINGH, Kunal et al. Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus* VITRKHB. **3 Biotech**, 2013.

SINGHANIA, Reeta Rani et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549 2010.

SIQUEIRA, Joyce Gueiros Wanderley et al. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**. v. 132, p. 105419, 2020.

SOUZA, Marcella Fernandes de; SILVA, Ayla Sant Ana da; BON, Elba P.S. A novel *Trichoderma harzianum* strain from the Amazon Forest with high cellulolytic capacity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 183–188, 1 abr. 2018.

STRICKER, Astrid R.; MACH, Robert L.; DE GRAAFF, Leo H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 78, p. 211–220, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1322-0>.

TAKASHIMA, Shou et al. Molecular cloning and expression of the novel fungal β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. **Journal of Biochemistry**, v. 125, n. 4, 1999.

TEERI, Tuula T. et al. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: Gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. **Gene**, v. 51, n. 1, 1987.

TRIVEDI, N.; REDDY, C. R.K.; LALI, A. M. Marine Microbes as a Potential Source of Cellulolytic Enzymes. **Adv. Food Nutr. Res.** v. 79, 2016.

TRIVEDI, Nitin et al. Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Delile. **Bioresource Technology**, v.

150, p. 106-112, 2015. doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.103.

VIJAYARAGHAVAN, P.; PRAKASH VINCENT, S. G.; DHILLON, G. S. Solid-substrate bioprocessing of cow dung for the production of carboxymethyl cellulase by *Bacillus halodurans* IND18. **Waste Management**, v. 48, 2016.

WANG, Lei; TEMPLER, Richard; MURPHY, Richard J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Applied Energy**, v. 99, 2012.

WANG, Zunsheng et al. High-loading oil palm empty fruit bunch saccharification using cellulases from *Trichoderma koningii* MF6. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, 2014.

WARDEN, Andrew C.; LITTLE, Bryce A.; HARITOS, Victoria S. FA cellular automaton model of crystalline cellulose hydrolysis by cellulases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1-14, 2011.

WILSON, David B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. v. 1125, n. 1, p. 289-297, 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.026>.

XIN, Qi et al. *Trichoderma reesei* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal growth, conidiation, and cellulase gene expression. **Current Microbiology**, v. 67, n. 5, 2013.

ZHANG, Yi Heng Percival; LYND, Lee R. **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems.** **Biotechnology and Bioengineering**. v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>.

ZHENG, Jian Li et al. Effects of increased impeller power in a production-scale *Aspergillus oryzae* fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, 2002.

ZIMMER, K.R et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.