



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus 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 Eguluz

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 -glycosidase 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-5A7</i> no ensaio 23 utilizando o biorreator TECNAL.....	84
Figura 19. Atividade Específica das enzimas produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> na temperatura de 30°C no período de 16 dias.....	85
Figura 20. Atividade Específica das enzimas produzidas por <i>Trichoderma lixii-5A7</i> 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

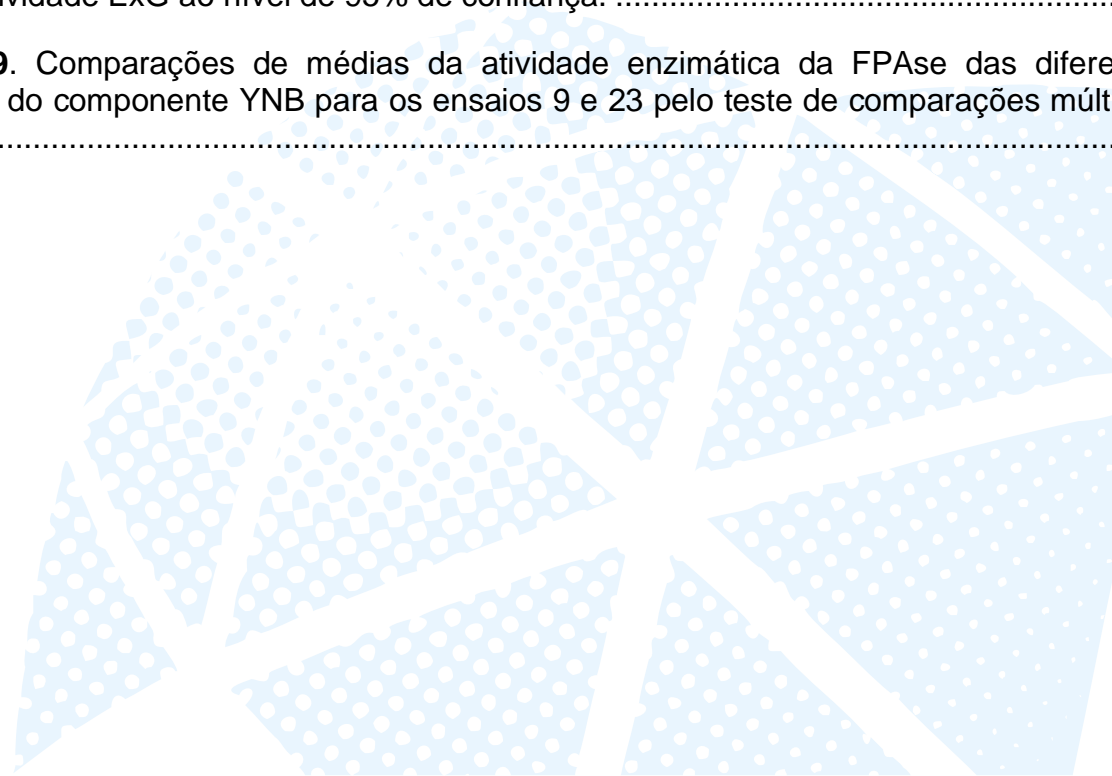
Tabela 55. Comparações de médias da atividade enzimática da EnG das diferentes condições do componente YNB para os ensaios 9 e 23 pelo teste de comparações múltiplas de Tukey..... 144

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
$^{\circ}\text{C}$	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 Comission”
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



1. INTRODUÇÃO

Anualmente, são geradas toneladas de resíduos provenientes das atividades agroindustriais. Esses resíduos são ricos em matéria orgânica e seu acúmulo pode causar sérios prejuízos ao meio ambiente. Por esse motivo, uma série de estudos e novas técnicas vem sendo desenvolvidos com a finalidade de diminuir a acumulação desses resíduos e poder dar-lhes uma disposição adequada (PATEL; SHUKLA, 2017).

Um dos principais componentes dos resíduos naturais é a celulose e outros tipos de polissacarídeos, como a pectina e hemicelulose. A celulose é o principal constituinte polissacarídeo da parede celular dos tecidos vegetais e é considerado um dos recursos biológicos renováveis mais abundantes na biosfera (ZHANG; LYND, 2004). Uma fibra de celulose contém de 5000 – 10000 unidades de glicose, sendo que a sua unidade de repetição consiste em duas unidades de glicose anidra, denominada celobiose (MOHAN, et al., 2006).

Existem vários tratamentos utilizados para degradar os resíduos naturais, como os tratamentos biológicos, no qual são utilizados diversos microrganismos como fungos e bactérias. Esta alternativa biológica é geralmente de baixo custo o que facilita seu acesso e aplicação (MEGHARAJ et al., 2011).

Os microrganismos envolvidos sintetizam enzimas geralmente com atividade hidrolítica dos compostos presentes nos resíduos. Para a síntese dessas enzimas, são necessárias fontes de carbono e nitrogênio que podem ser advindos dos resíduos e induzem a expressão dos genes codificadores de diferentes enzimas (FINDLAYS et al., 2002), inclusive levando à produção de enzimas com atividade sobre diferentes compostos e com complexidade estrutural (GUPTA et al., 2002; ZHANG; LYND, 2004). A biodegradação da celulose pode ocorrer pela atividade de enzimas celulolíticas, produzidas por microrganismos, que são importantes em diversos processos de tratamento de resíduos agrícolas, contribuindo para melhorar as condições do solo; além disso, a hidrólise enzimática de resíduos contendo grande quantidade de celulose pode ser usada para gerar produtos sustentáveis baseados em bioenergia para substituir o uso de combustíveis fósseis (MUNIR; LEVIN, 2016).

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.



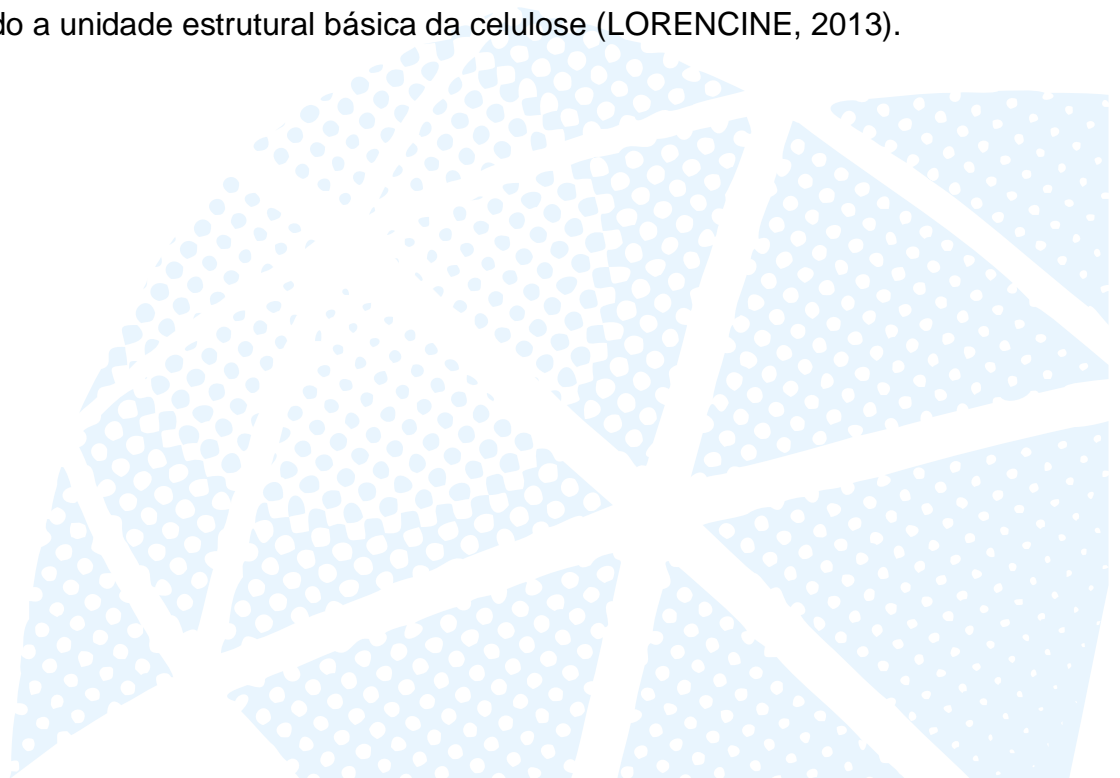
2. REVISÃO DA LITERATURA

Resíduos naturais

Todos os anos, as indústrias que processam qualquer tipo de biomassa geram resíduos com características específicas, variando em volume, estado físico e composição. Mesmo sendo resíduos, esses materiais ainda são biodegradáveis, no entanto, geralmente precisam ser tratados antes do descarte final ou poderão ocasionar problemas ambientais de contaminação provenientes da prática de manejo dos resíduos, como queima a céu aberto, abandono ou aterro. A biotecnologia e o bioprocessamento fornecem alternativas para o uso de resíduos naturais como matéria prima para novos processos, através da bioconversão de suas moléculas, que são uma rica fonte de energia, carbono e nutrientes para obtenção de novos produtos (WOICIECHOWSKI et al., 2020).

Esses resíduos são formados principalmente por três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN et al., 2007).

A celulose (Figura 1), que é o principal componente da parede celular da fibra vegetal, é formada por unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). As ligações glicosídicas são formadas pela eliminação de uma molécula de água, envolvendo os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4 de duas glicoses adjacentes. O dissacarídeo formado recebe o nome de celobiose, e é considerado a unidade estrutural básica da celulose (LORENCINE, 2013).



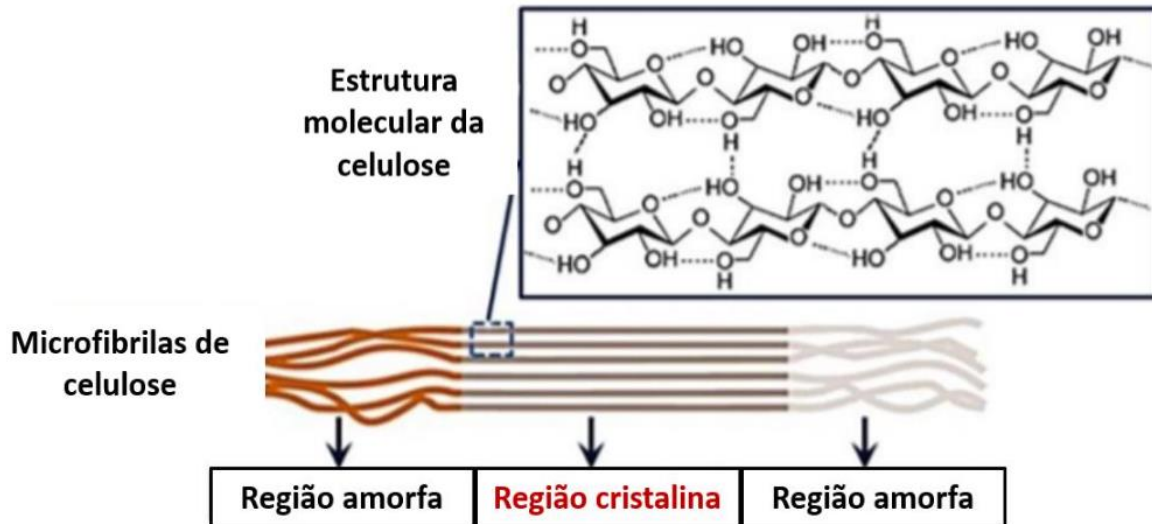


Figura 1. Representação esquemática da estrutura molecular da celulose.

Adaptado de NASCIMENTO, 2017.

As cadeias de celulose podem estabelecer interações de hidrogênio, tanto intra quanto intermoleculares, que fazem com que as cadeias de celulose sejam agregadas na forma de microfibrilas, na qual regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas), considera-se que essas áreas amorfas sejam formadas pela presença de moléculas de água que evitam a cristalização da celulose. Ao passo que, as interações de hidrogênio, inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas, tornando a celulose resistente à hidrólise ácida ou alcalina (JUHÁSZ et al., 2005).

Enzimas celulolíticas

As enzimas celulolíticas pertencem ao grupo de hidrolases que atuam nas ligações *O-glicosídicas*. Pela classificação da Enzyme Commission (EC), a codificação das celulasas é 3.2.1.x: os três primeiros dígitos indicam a sua atuação nas ligações *O-glicosídicas* e o último número varia de acordo com o mecanismo de atuação do grupo de celulasas em questão. Essas enzimas são capazes de degradar materiais lignocelulósicos promovendo sua hidrólise, e podem ser geradas

por microrganismos que as liberam sobre a celulose reduzindo-a em açúcares para obtenção de fonte de energia (SINGH et al., 2018; HENRISSAT, 1991).

A celulose é uma macromolécula natural e o biopolímero mais abundante encontrado na natureza, formada por monômeros de D-glicopiranosose unidos por ligações β -1,4 que geram as microfibras cristalinas (KLEMM et al., 2005) e pode ser hidrolisado, utilizando microrganismos, a açúcares solúveis como a glicose ou celobiose (LI et al., 2018). Existe uma variedade de microrganismos com a capacidade de sintetizar pelo menos uma das enzimas celulolíticas e, dentre eles os Actinomicetes, *Actinosynnema mirum*, *Nocardioopsis*, *Thermobifida fusca* foram reportados como microrganismos celulolíticos (ANDERSON et al., 2012). Essa capacidade para decompor a biomassa gerando assim produtos de interesse industrial, evidencia as celulasas como um dos componentes dos sistemas enzimáticos mais amplamente estudado (BHAT, 2000; CRUCCELLO et al., 2015).

A degradação da celulose por microrganismos envolve a atividade sinérgica de três enzimas celulolíticas: endo- β -1,4-glucanase (*Enzyme Commission*, EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-celobiohidrolase ou exoglucanase (EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21) conforme apresentado na Figura 2.



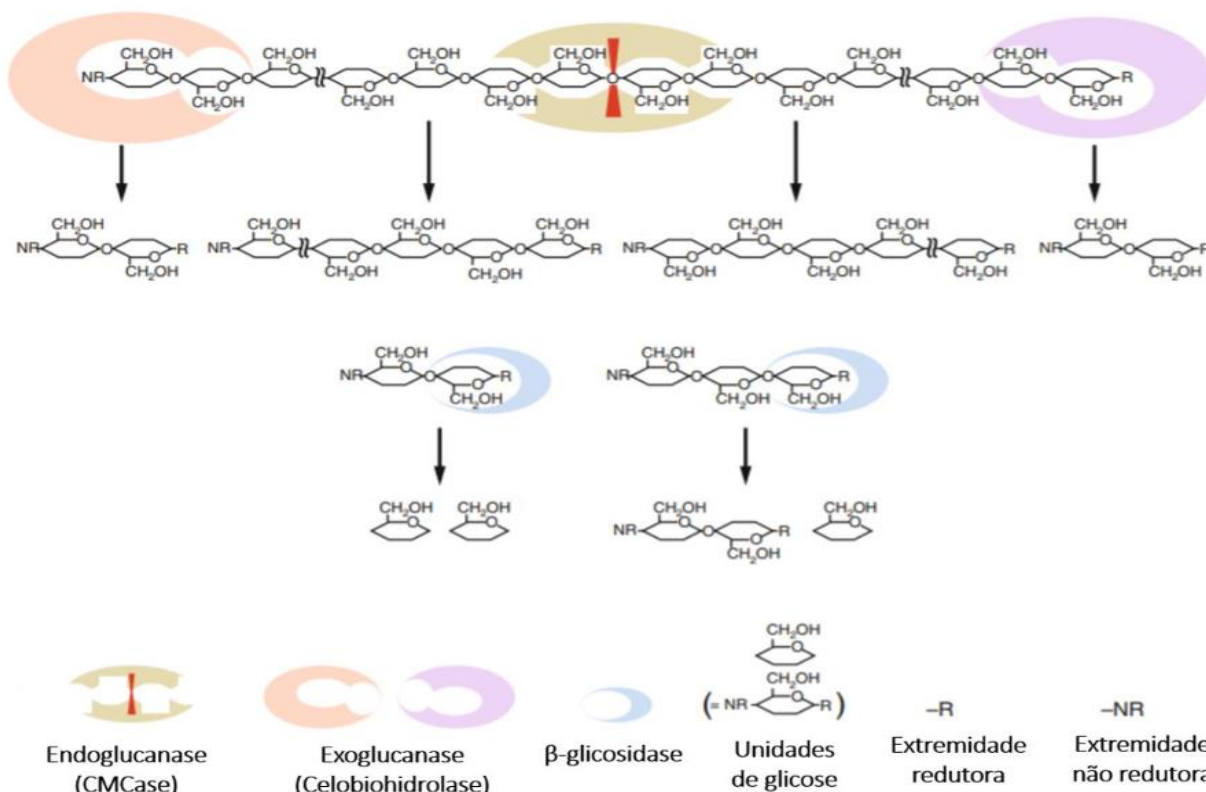


Figura 2. Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico Adaptado de (BARBOSA, 2019).

As celulasas são o terceiro grupo de enzima mais utilizadas em escala industrial, possuem potencial para aplicação no processamento de algodão, nas indústrias de papel, farmacêutica, de alimentação animal e alimentação de modo geral, na produção de detergentes e indústria têxtil, além de serem utilizadas na produção de etanol a partir da biomassa (SIQUEIRA et al., 2020). Porém, a produção dessas enzimas tem um custo elevado, que dificulta sua utilização em diferentes processos. Por esse motivo, existe uma crescente demanda por microrganismos que sejam capazes de produzi-las utilizando técnicas economicamente mais viáveis. Além da busca pela produção de enzimas estáveis que possibilitem sua aplicação em processos sobre uma ampla faixa de pH e temperatura, facilitando os processos industriais para que sejam mais eficientes e econômicos (BAJAJ; MAHAJAN, 2019).

As enzimas endoglucanases (EnG) ou endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) catalisam, de forma aleatória, a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 no interior da cadeia de celulose diminuindo o comprimento da cadeia gerando novos terminais, sendo um redutor e um não redutor, tendo como produto final celo-oligossacarídeos e celobiose. As exoglucanases (ExG) ou exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91) atuam nos terminais da cadeia de celulose, liberando glicose e principalmente, celobiose. Entre as mais eficientes exoglucanases estão as celobiohidrolases (CBHs), com nome sistemático β -1,4-D-glucana-celobiohidrolase. Elas agem essencialmente nos processos de decomposição, sendo divididas em: celobiohidrolase tipo I (EC 3.2.1.176) (CBH I), que cliva as regiões terminais redutoras; e a do tipo II (EC 3.2.1.4) (CBH II), que cliva as regiões terminais não redutoras (BARBOSA, 2019). Outra importante exoglucanase é a exoglicohidrolase (EC 3.2.1.74), com nome sistemático β -1,4-D-glicana-glicobiohidrolase (GH), essa enzima atua sobre os terminais, atuando de forma sequencial, degradando a fibra celulósica e liberando glicose. Tanto as celobiohidrolases quanto as exoglicohidrolases sofrem inibição pelo produto da hidrólise (celobiose e glicose, respectivamente) (MENEZES; BARRETO, 2015).

O terceiro grupo das celulasas são as β -glicosidases (BG) que catalisam a formação de resíduos de D-glicose a partir dos celbioligossacarídeos (resíduos de celodextrina e celobiose) (BÉGUIN; AUBERT, 1994; ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000; SILVA, 2016).

As enzimas do complexo celulolítico, quando atuam conjuntamente, apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos quando atuam isoladamente umas das outras (LYND et al., 2003), tal efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulasas: Sinergia EnG-ExG, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia ExG-ExG, CBH I e CBH II tem ação simultânea na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da EnG; sinergia ExG-BG e EnG-BG, como seus produtos de hidrólise, ExG e EnG liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a BG (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Existem alguns fatores relacionados com as enzimas celulolíticas que influenciam a hidrólise da celulose, dentre estes, destacam-se: os tipos de enzimas presentes no preparado enzimático empregado e ação sinérgica entre elas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase), concentração das enzimas, acesso das enzimas ao substrato, inativação das enzimas por processos mecânicos, térmicos ou químicos e inibição pelo produto final também afetam a eficiência e o rendimento da hidrólise enzimática (ANDERSEN, 2007).

Para realizar a quantificação da atividade enzimática dos diferentes grupos do complexo celulolítico existem diferentes substratos comerciais para cada ensaio de atividade (GHOSE, 1987; ADNEY; BAKER, 2008). Os mais utilizados são:

Carboximetilcelulose (CMC) que é um derivado da celulose com suficiente quantidade de substituição de grupos carboximetílicos para facilitar sua solubilidade em água (MARTINS, 2005). Esse substrato é recomendado para medir a atividade endoglucanásica; celobiose é utilizado para medir a atividade da β -glicosidase e o papel de filtro que apresenta fibras de celulose complexas, insolúvel é utilizado para a atividade celulolítica total do complexo enzimático, chamada FPase.

(Zhang; Lynd, 2004) recomendam celulose microcristalina, Avicel, para determinar a atividade exoglucanásica.

Aplicação das enzimas celulolíticas

A produção de celulasas em escala industrial teve seu início na década de 80, sendo aplicada como aditivo para ração animal e como insumo para a indústria de alimentos. Posteriormente, foram utilizadas nas indústrias têxtil, nas indústrias de polpa e papel e em lavanderias (CASTRO; PEREIRA, 2010; COELHO, et al., 2008).

Desde 1997, Bhat; Bhat mencionavam que as celulasas possuem grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma variedade de atividades industriais. Desde a década passada, a celulase é a terceira enzima mais utilizada na indústria em vários processos. Estas enzimas são utilizadas, por exemplo, na indústria têxtil, no processo de "stonewashing" de tecidos "jeans" para amolecer as fibras e obter uma aparência desbotada e desgastada. Na indústria farmacêutica, são utilizadas em preparações digestivas para a hidrólise rápida de celulose e para

auxiliar na digestão. As celulases também são utilizadas na indústria de alimentos para diminuir a viscosidade de sucos de frutas, na indústria de bebidas melhorando a qualidade e a produtividade nos processos de fermentação na obtenção de cerveja, durante o processo de vinificação, auxiliando na extração de antocianinas e terpenos, que estão presentes na casca da uva e são os compostos responsáveis pela coloração e aroma do vinho (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019).

Na Tabela 1 podemos observar as principais aplicações da celulase em diferentes segmentos industriais (BEHERA et al., 2017; JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019).

Tabela 1. Aplicações de celulase em diferentes segmentos industriais (BEHERA et al., 2017)

Indústria	Função	Aplicação
Alimentos	Hidrólise de componentes da parede celular; diminuindo a viscosidade e mantendo a textura do suco de frutas	Extração de suco de frutas; alteração das propriedades sensoriais de frutas, legumes, óleo de azeitonas e sopas; extração de pigmentos aplicáveis como corantes naturais de alimentos.
Ração animal	Pré-tratamento de silagem agrícola e ração de grãos para hidrólise parcial de materiais lignocelulósicos	Melhoria da qualidade nutricional da alimentação animal; ganho de peso de frangos de corte e galinhas; diminuição da colonização de bactérias patogênicas no intestino grosso.
Cerveja e vinho	Hidrólise de polissacarídeos da parede celular vegetal, modificação de resíduos aromáticos.	Melhoria na maceração da casca e extração de cor das uvas, qualidade, estabilidade e clarificação e aroma dos vinhos.
Têxteis, lavanderia e detergentes	Atuar no tecido de algodão e rompimento das pequenas pontas de fibra do tecido de algodão, soltando o corante após a lavagem, prevenção ou remoção permanente da formação de "pilling",	Produção de tecidos de alta qualidade; prevenção ou remoção permanente de formação de pelos e bolinhas. Aumenta a eficiência na limpeza de manchas e no cuidado de tecidos.
Polpa e papel	Polpação mecânica, biomodificação de fibras, remoção de revestimento de	Aumento da resistência à tração e alta qualidade das fibras, redução do consumo de energia, melhora a drenagem das

	tinta e toners de papel.	fábricas de papel e fabricação de papéis macios como toalhas de papel e papéis higiênicos.
Agricultura	Solubilização de paredes celulares de plantas ou fungos, inibição da germinação de esporos e crescimento de fungos.	Produção de protoplastos vegetais ou fungos, linhagens híbridas e mutantes, fertilidade do solo, crescimento de plantas.
Biocombustíveis	Conversão de material celulósico em glicose e outros açúcares fermentáveis.	Produção de proteína unicelulares ou produtos de fermentação como etanol.
Farmacêuticas	Digestão da fibra de celulose.	Preparação de digestina, hidrólise rápida de celulose, degradação das paredes celulares de organismos patogênicos.
Gestão de resíduos	Degradação de resíduos celulósicos.	Redução da poluição ambiental.

Embora tenham uma ampla aplicação, o uso das celulasas está limitado devido à perda de atividade enzimática utilizando temperaturas elevadas nos processos industriais.

A elevação de alguns graus acima da temperatura ideal gera mudanças conformacionais afetando sua funcionalidade. Assim as características de estabilidade térmica da enzima são dados importantes para avaliar a eficiência em aplicações biotecnológicas (BASHIROVA et al., 2019).

Microrganismos produtores de celulasas.

Para o adequado desenvolvimento dos microrganismos, é necessária uma fonte de carbono, mas, para que produzam celulasas é preciso que o substrato tenha celulose, glicanos de ligações mistas incluindo as β -(1→4) e alguns oligossacarídeos. O substrato pode ser celulose cristalina, carboximetilcelulose (CMC), celobiose, etc. ou resíduos agroindustriais (bagaço e palha de cana, palha e farelo de trigo, etc.). Tanto a celulose comercial como de resíduos, tem efeito indutor para a produção de celulasas (CASTRO et al., 2010). Também é importante mencionar a suplementação do meio com nutrientes minerais como sulfato de amônio e elementos traços como Fe, Zn, Mn e Co, que são necessários para o efetivo crescimento do microrganismo produtor. Esses nutrientes minerais

participam do metabolismo do microrganismo como cofatores enzimáticos (MANDELS; REESE, 1957; MANDELS; WEBER, 1969).

Essas enzimas celulolíticas podem ser produzidas por uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas (LYND et al., 2003). Dentre as bactérias descritas como produtoras de celulases, o gênero *Bacillus* foi o mais estudado e descrito na literatura (VIJAYARAGHAVAN et al., 2016; ASHA; SAKTHIVEL, 2014). Porém, os fungos são os mais utilizados na indústria por sua ampla capacidade de adaptação a diferentes substratos, capacidade de degradar a celulose e utilizá-la como fonte de carbono e energia, e principalmente os fungos filamentosos que apresentam maior relevância biotecnológica uma vez que estão presentes em vários ecossistemas, possuem crescimento rápido em condições facilmente controladas e são capazes de produzir complexos de celulases com todas as três classes de enzimas necessárias para a completa hidrólise da celulose (BHAT, 2000; SINGHANIA et al., 2010). Entre eles temos os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (SANDHU et al., 2013; NATHAN et al., 2014; HAN et al., 2017).

O gênero *Trichoderma* é considerado um bom produtor de celulases. Wang e colaboradores (2014) utilizaram farelo de trigo com suplementação de celulose e lactose para produção de celulases via fermentação submersa (FS) utilizando *Trichoderma koningii* D-64 e obtiveram 1300 UI/L de atividade endoglucanase (CMCase). Kilikian e colaboradores (2014) estudaram o *Trichoderma reesei* RUT C-30 para produção de celulases via fermentação em estado sólido (FES) utilizando bagaço de cana *in natura* juntamente com farelo de trigo como substrato e obteve uma atividade FPAse de 2,3 UI/g. O fungo *Trichoderma harzianum*, pouco estudado para produção das celulases, também apresentou bons resultados relatados em outro trabalho, demonstrando que a linhagem de *T. harzianum* IOC-3844 é boa produtora de celulases e apresenta potencial aplicação como fonte dessas enzimas; nesse mesmo estudo, o sobrenadante da cultura obtido a partir do cultivo do micélio induzido para a produção das celulases, apresentou níveis significativos de FPAse e de β -glicosidase (CASTRO et al., 2010; PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

As principais informações de alguns trabalhos encontrados na literatura sobre a produção de celulases são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Produção de Celulases via Fermentação Submersa. Modificada de (SALOMÃO, 2017)

Microrganismo	Substrato	Condições de cultivo	Máxima Atividade (UI/L)	Ref.
<i>Trichoderma koningii</i> D-64	Farelo de trigo 1,4% (m/v), celulose 1% e lactose 1%.	30°C, 120 rpm, 2 dias, inóculo 10% (v/v), pH 5,0	2100 FPase 1300 CMCase	Wang et al., (2014).
<i>Trichoderma harzianum</i> IOC-3844	Bagaço de cana tratado com ácido sulfúrico 3% (m/v) e hidróxido de sódio 4% (m/v) – 7,5 g/L	30°C, 200 rpm, 3 dias, inóculo 5% (v/v) com concentração de células 3,35 g/L, pH 5,0	6358 CMCase 450 FPase	Castro et al., (2010).
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Avicel – 10 g/L	30°C, 400 rpm, inóculo 1% (v/v), 68h, pH 4,8	163 FPase	Aiello et al., (1996).
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Bagaço de cana <i>in natura</i> – 30,3 g/L	30°C, 400 rpm, inóculo 1% (v/v), 44h, pH 4,8	90 FPase	Aiello et al., (1996).
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Bagaço de cana tratado com solução alcalina a temp. ambiente – 30,3 g/L	30°C, 400 rpm, inóculo 1% (v/v), 44h, pH 4,8	85 FPase	Aiello et al., (1996).
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Bagaço de cana tratado com solução alcalina a 100°C – 30,3 g/L	30°C, 400 rpm, pH 4,8	Não foi detectado atividade.	Aiello et al., (1996).

Tabela 2 Produção de Celulases via Fermentação Submersa. Continuação

Microrganismo	Substrato	Condições de Cultivo	Máxima Atividade (UI/L)	Ref.
<i>Penicillium echinulatum</i>	CMC 1% (m/m) e farelo de trigo 0,5% (m/m)	37°C, 150 rpm, 8 dias, 10 ⁵ esporos/mL, pH 4,8	270 FPase, 1530 CMCase	Martins et al., (2008).
<i>Penicillium janthinellum</i>	Sabugo de milho 5,0 % (m/v)	30°C, 150 rpm, 7 dias, 4x10 ⁵ esporos/mL, pH 4,0	65,3 β-glicosidase	Kaur & Chadha, (2015).
<i>Penicillium funiculosum</i>	Bagaço de cana tratado com ácido sulfúrico 1% (m/v) e hidróxido de sódio 4% (m/v) – 15 g/L	30°C, 200 rpm, 3 dias, 10 ⁶ esporos/mL pH 5,0	260 FPase, 7100 CMCase	Maeda, (2010).
<i>Penicillium</i> sp.	Bagaço de cana <i>in natura</i> – 1,6% (m/v)	38°C, 200 rpm, 5 dias, 10 ⁷ esporos/mL, pH 5,3	351 CMCase	Lacerda & Pinotti, (2015).
<i>Penicillium</i> sp.	Bagaço de cana tratado com ácido sulfúrico 1% (v/v) e hidróxido de sódio 7% (m/v) – 2,7% (m/v)	38°C, 200 rpm, 5 dias, 10 ⁷ esporos/mL, pH 5,3	491 CMCase	Lacerda & Pinotti, (2015).
<i>Penicillium</i> sp.	Bagaço de cana tratado com peróxido de hidrogênio – 2,7% (m/v)	38°C, 200 rpm, 5 dias, 10 ⁷ esporos/mL, pH 5,3	450 CMCase	Lacerda & Pinotti, (2015).
<i>Penicillium oxalicum</i>	Avicel – 10 g/L Farelo de trigo – 25 g/L	28°C, 180 rpm, 8 dias 10 ⁶ esporos/mL, pH 5,0	700 FPase, 8170 CMCase	Saini et al., (2015).

Microrganismos de ambiente marinho produtores de celulasas

O ambiente marinho se caracteriza por ser um nicho ainda pouco explorado, sendo uma alternativa promissora na pesquisa de novos microrganismos. Este ambiente apresenta algumas características que o difere significativamente do ambiente terrestre, tais com salinidade, concentração de metais, exposição a períodos de incidência solar contínua, variação de temperatura, altas pressões, todas essas características reunidas favorecem a produção de metabólitos estruturalmente diferenciados (FELÍCIO, OLIVEIRA e DEBONSI, 2012).

Quando se trata de microrganismos marinhos o número de espécies utilizadas é inferior, uma vez que a maior parte dos microrganismos estudados são isolados de ambientes terrestres (RICHARDS *et al.*, 2012). Porém na atualidade, os microrganismos marinhos ou associados a algas marinhas estão tendo um papel importante na produção de enzimas devido à alta tolerância de suas estruturas a condições extremas como concentração de sal (1,7 M), temperatura (80-108°C) e altas pressões (60 MPa) (MARHUENDA-EGEA; BONETE, 2002; SINGH *et al.*, 2013).

Celulasas isoladas de fungos marinhos têm um alto potencial de sacarificação sobre as celulasas bacterianas, como mostrado no estudo de Trivedi *et al.*(2015), que obteve celulase derivada de fermentação em estado sólido (FES) do fungo marinho *Cladosporium sphaerospermum* usando alga verde *Ulva fasciata* como substrato.

Devido ao fungo *Trichoderma lixii* ser pouco estudado como produtor das celulasas, foi o motivo de realizar o presente trabalho.

A tabela 3 resume várias celulasas estudadas a partir de fontes microbianas marinhas.

Tabela 3. Celulases produzidas por microrganismos de ambiente marinho (TRIVEDI; REDDY; LALI, 2016).

Microrganismo	Isolado de	pH e temperatura	Características	Ref.
<i>Gracilibacillus sp. SK1</i>	Lago salgado	8 e 60°C	Estável em meio alcalino	Yu and Li (2015)
<i>Aureobasidium pullulans 98</i>	Salmão do mar	5,6 e 40°C	Potencial CMC _{case}	Yanjun, Liang, Zhenming, and Xianghong (2015)
<i>Bacillus cereus JD0404</i>	Sedimentos de manguezais	7 e 50°C	Capaz de degradar resíduos agroindustriais	Chantarasiri (2015)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Ulva</i> de algas marinhas	4 e 25°C	SSF	Trivedi, Reddy, Radulovich, and Jha (2015)
<i>Brachybacterium, Brevibacterium, Halomonas, Kokuria, Micrococcus, Nocardiosis, Pseudomonas, and Streptomyces (genera)</i>	Alga <i>Eucheuma Cottonii</i>	4,8 e 50°C	Degradação da biomassa lignocelulósica	Santhi, Bhagat, Saranya, Govindarajan, and Jebakumar (2014)
<i>Aspergillus ZJUBE-1</i>	Solo de mar	4–5 e 65°C	SSF	Liu, Xue, He, & Yao (2012)
<i>Bacillus flexus</i>	<i>Ulva</i> de algas marinhas deterioradas	10 e 45°C	Alcalino	Trivedi et al. (2011a)
<i>Bacillus aquimaris</i>	<i>Ulva</i> de algas marinhas deterioradas	11 e 45°C	Solvente orgânico estável	Trivedi et al. (2011b)
<i>Aspergillus terreus</i> <i>Mucor plumbeus</i>	Água marinha	7 e 37°C	Produção de celulases através de agro resíduos	Padmavathi, Agarwal, and Nandy (2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Mar de China	6 e 28°C	Produção de celulase usando <i>E. crassipes</i> , farelo de trigo cru, palha de arroz crua	Xue, Chen, Lin, Guan, and Yao (2012)
<i>Chaetomium sp.</i>	Folhas dos manguezais	9,7 e 50°C	Produção de celulase usando resíduos agrícolas e industriais	Ravindran, Naveenan, and Varatharajan (2010)

* SSF fermentação em estado sólido

Metodologias usadas para a produção de celulasas

A produção de enzimas por microrganismos, utilizando processos fermentativos, constitui um dos métodos empregados mais antigos. Na indústria, sua produção é dividida em três etapas: tratamentos iniciais (processos "upstream") para poder colocar o sistema em condições adequadas para o processo de cultivo; a fermentação e os tratamentos finais (processos "downstream") onde se realiza a separação e purificação dos produtos e subprodutos obtidos (BORZANI, et al., 2001).

Para a produção das enzimas há dois processos fermentativos mais utilizados, a fermentação em estado sólido (FES) que consiste no crescimento e na formação do produto em partículas sólidas na ausência (ou quase ausência) de água, contudo, o substrato contém a umidade necessária ao metabolismo microbiano, e a fermentação submersa (FS), que se dá pelo crescimento do microrganismo como suspensão em meio líquido, contendo nutrientes solúveis ou com excesso de água (NIYONZIMA et al., 2015; ORLANDELLI et al., 2017).

A FS é um processo grandemente empregado na produção de enzimas (MORE et al., 2018) devido à facilidade de os microrganismos crescerem em condições controladas de pH, temperatura e possibilitar a secreção extracelular de enzimas industriais em quantidades importantes no meio de produção. É a técnica mais viável em escala industrial pelo rápido processo de fermentação e maior facilidade no aumento de escala. Mais de 75% das enzimas industriais são produzidas por FS (NIYONZIMA, 2015). Esse método proporciona uma melhor transferência de calor, permite que o microrganismo permaneça submerso e uniformemente distribuído, favorecendo assim a absorção de nutrientes (GMOSER et al., 2019).

A maioria das celulasas comerciais são produzidas pelos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* em processos de fermentação submersa. O cultivo submerso é um processo onde a formação do produto e o crescimento celular são influenciados por alguns parâmetros operacionais como: temperatura, pH, composição do meio de cultura, forças de cisalhamento, morfologia do fungo, natureza e concentração do

substrato, presença de indutores, disponibilidade de nutrientes, quantidade de oxigênio dissolvido, etc. A produção em larga escala de enzimas celulolíticas requer o adequado conhecimento desses parâmetros (SINGHANIA et al., 2010).

O acompanhamento do cultivo permite que alterações na composição do meio e nas condições de cultivo sejam efetuadas a cada novo cultivo, melhorando o entendimento sobre o fungo estudado e otimizando a obtenção de produtos de interesse, sem o aumento excessivo nos custos de produção. Esses cultivos podem ser realizados em frascos pequenos agitados, ou em biorreatores que utilizam sistemas de mistura por agitadores mecânicos internos, dentro de um recipiente cilíndrico fechado de aço inoxidável contendo um eixo interno com pás para agitação, realizando o controle do cultivo através de dispositivos acoplados ao recipiente principal. Os estudos em frascos pequenos ajudam na avaliação das melhores condições de cultivo para que o processo possa ser escalonado, diminuindo o risco de falha no processo no nível industrial (ABDULLAH et al., 2013).

Os processos fermentativos em FES e FS realizados em biorreatores, que são equipamentos fechados, são utilizados tanto em escala de pesquisa como em escala industrial, com diferença em relação ao tamanho dos equipamentos utilizados, são comumente chamados de fermentadores. Na indústria sua principal função é o cultivo de microrganismos para obtenção de diversos produtos como enzimas, álcoois, ácidos orgânicos, antibióticos, hormônios de plantas, alcaloides, entre outros (KAVANAGH, 2011).

Os biorreatores são equipamentos automatizados, com sistemas de controle das variáveis do processo, para acompanhar e otimizar os cultivos. Os biorreatores normalmente são construídos em aço inoxidável, com conexões para acoplamento de sensores, válvulas e são esterilizáveis. O controle do processo passa pela capacidade de acompanhamento das variáveis, seja por meio de sensores acoplados ou pela retirada de amostras (ROSSI, FURIGO e OLIVEIRA, 2007). Esse acompanhamento permite a alteração das condições de cultivo, melhorando o desempenho do processo.

Influência do pH e da temperatura na produção de celulases

O crescimento do fungo altera o pH do meio, seja pela produção de ácidos orgânicos ou pela absorção da fonte de nitrogênio e liberação de íons H^+ , apenas em biorreatores o pH pode ser automaticamente mantido constante durante o crescimento do fungo. Geralmente os fungos filamentosos apresentam uma diminuição no valor de pH no meio de cultivo durante seu crescimento em substratos que contêm carboidratos, e após esgotada a fonte de carbono, se observa um aumento nos valores de pH (BAILEY; TÄHTIHARJU, 2003).

O pH ideal para a produção de celulases fúngicas varia dependendo da espécie, sendo os valores ótimos entre 3,0 – 6,0 (GARG; NEELAKANTAN, 1982; NIRANJANE et al., 2007).

Juhász et al. (2004), testaram diferentes controles de pH em cultivos com *T. reesei* RUT-C30 e observaram que no cultivo na condição controlada a pH 5,0, o crescimento do fungo foi mais rápido quando comparado com condições no meio quando o pH abaixava a 3,5 e depois retornava a pH 5,0.

Os autores sugeriram que a condição ácida influenciou a produção das enzimas. No mesmo trabalho, foram testadas as condições com pH 6,0 e nenhuma atividade superior foi encontrada.

Ahmed et al. (2009) ao estudarem valores de pH entre 4,0 e 7,0, na produção de celulases por *T. harzianum*, obtiveram uma maior produção de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases utilizando um pH de 5,5.

Outro fator importante no cultivo fúngico para a produção das celulases é a temperatura que afeta os parâmetros de crescimento como o tempo de adaptação (fase lag), a taxa específica de crescimento e o rendimento total, influenciando tanto no metabolismo primário quanto secundário (CARLILE, M. J.; WATKINSON, 1997).

Ahmed et al. (2009) estudaram diferentes temperaturas (entre 22 e 34°C) na produção de celulases pelo fungo *T. harzianum* e observaram que na temperatura de 28°C se obteve uma maior produção de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases em 120 horas de cultivo.

Podemos observar a importância de obter celulases que sejam altamente específicas e estáveis devido que as enzimas celulolíticas usadas nas indústrias requerem maior atividade e estabilidade, em comparação com o habitat terrestre, os microrganismos de ambiente marinho experimentam condições variáveis, e portanto, poderiam representar uma nova fonte de celulases com maior potencial catalítico (DALMASO et. al., 2015).

Produção de enzimas por engenharia genética

A tecnologia de DNA Recombinante conhecida como engenharia genética, têm sido amplamente utilizadas na produção de enzimas industriais (BILAL, M., IQBAL, 2019). Essa técnica aplicada na Biotecnologia moderna, coloca os genes em funcionamento para a produção de proteínas recombinantes e de outros compostos necessários aos diversos processos industriais (BILAL, M., IQBAL, 2019). Os avanços nesta área permitiram a clonagem de diversos genes de interesse e a manipulação de diferentes células (em especial as bacterianas), permitindo maior produção da enzima de interesse (ZIMMER, 2009; KHAN et al., 2017).

A engenharia genética permite o melhoramento genético de espécies animais e vegetais com grande potencial biotecnológico através da clonagem molecular de genes, a qual consiste no isolamento de sequências de DNA específicas, recombinação *in vitro* e a propagação dessas moléculas (ASTOLFI FILHO; NUVES-SILVA; BIGI, 2014). A clonagem molecular compreende pelos menos duas etapas básicas: (1) o fragmento do DNA contendo o gene de interesse (inserto) é ligado à outra molécula de DNA chamado de vetor para produzir uma molécula de DNA recombinante; (2) A molécula do DNA recombinante é introduzida em uma célula hospedeira compatível por um processo chamado transformação genética. No interior da célula hospedeira o vetor se multiplica, produzindo cópias idênticas. A célula que adquiriu a molécula do DNA exógeno é chamada de recombinante (ASTOLFI FILHO; NUVES-SILVA; BIGI, 2014). De acordo com ZIMMER, (2009) as enzimas recombinantes obtidas a partir de técnicas moleculares, produzidas com alto nível de expressão, reduzem a necessidade de passos de purificação.

Mecanismos de regulação dos genes da celulase e hemicelulase têm sido estudados em fungos filamentosos, principalmente em *Aspergillus* (NOGUCHI et al., 2009) e *Trichoderma* (STRICKER et al., 2008). A produção dessas enzimas extracelulares é um processo que consome energia, portanto, as enzimas são produzidas apenas em condições nas quais o fungo precisa usar compostos lignocelulíticos como fonte de energia e carbono.

Dos fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, o complexo celulolítico de *T. reesei* é uma das mais estudadas (KUBICEK, 2013), é capaz de iniciar eficientemente a expressão do gene da celulase em resposta à celulose insolúvel e, portanto, tem sido aplicado na produção industrial de celulase. Também foi estabelecido como um excelente sistema modelo para a investigação dos mecanismos subjacentes à expressão gênica induzida (SCHMOLL, 2018). A caracterização sistemática dos fatores transcricionais envolvidos certamente contribuiria para o entendimento de toda a rede regulatória que controla a expressão gênica da celulase.

As enzimas identificadas e caracterizadas como responsáveis pela atividade celulolítica de *T. reesei* incluem cinco endoglucanases -EGI/Cel7B, EGII/Cel5A, EGIII/Cel12A (OKADA et al., 1998), EGIV/Cel61A (SALOHEIMO, Markku et al., 1997) e EGV/Cel45A (SALOHEIMO, Anu et al., 1994) e duas exoglucanases - as celobiohidrolases CBHI/Cel7A e CBHII/Cel6A (TEERI et al., 1987). Essas enzimas atuam sinergicamente para converter a celulose em celobiose, cuja hidrólise em glicose envolve então duas β -glicosidases -BGLI/Cel3A e BGLII/Cel1A (TAKASHIMA et al., 1999).

Os níveis constitutivos dessas celulases e seu papel na indução de celulases foram posteriormente demonstrados por Carle-Urioste et al. Esses autores mostraram que os mRNAs *cbh1* e *egl1* são transcritos em condições não induzidas, e que a indução com celulose resulta em aumento de pelo menos 1100 vezes de ambos os transcritos. Os autores também mostraram que a hidrólise inicial da celulose é a etapa limitante da indução, conforme sugerido pela observação de que a adição do sistema celulase ou de seus membros enzimáticos purificados a uma cultura de *T. reesei*, na presença de celulose, resultou na detecção precoce dos

transcritos *cbh1* e *egl1*. Este resultado corrobora a hipótese de que os oligossacarídeos são formados *in vivo* a partir da celulose pela atividade de uma baixa atividade de celulase constitutiva e extracelular.

Ilmén et al. utilizando diferentes fontes de carbono, investigaram as características básicas da regulação da expressão dos genes de codificação das celobiohidrolases *cbh1* e *cbh2* e endoglucanases *egl1*, *egl2* e *egl5* de *T. reesei*, no nível de mRNA, mostrando que esses genes de celulase são expressos de forma coordenada e os níveis de mRNA em estado estacionário de *cbh1* /*Cel7A* são mais altos. O maior nível de indução foi alcançado com celulose e expressão moderada foi observada quando celobiose ou lactose foram usadas como fonte de carbono.

Outros autores identificaram vários fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão do gene da celulase em *T. reesei*, incluindo os reguladores positivos XYR1 (STRICKER et al., 2008), ACE3 (HÄKKINEN et al., 2014), CRZ1 (CHEN et al., 2016) e ACE2 (ARO, 2003) e os reguladores negativos CRE1 (ANTONIÊTO et al., 2016), ACE1 (SALOHEIMO, Anu et al., 2000) e RCE1 (CAO et al., 2017). Esses fatores identificados pertencem a fatores de transcrição típicos de fungos que se ligam a promotores por meio de domínios de ligação ao DNA (CAO et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que mudanças no estado da cromatina ocorrem para genes de celulase dependendo das condições aplicadas (repressão/indução) (MELLO-DE-SOUSA et al., 2015). Modificadores de cromatina específicos, como SAGA e LAE1, também foram identificados como participantes na modulação da expressão do gene da celulase (XIN et al., 2013).

Apesar desses avanços, mais pesquisas são necessárias para desvendar completamente os mecanismos moleculares de regulação da expressão gênica de celulases. Sua elucidação pode fornecer uma base para a aplicação controlada de reguladores transcricionais para processos biotecnológicos em fungos filamentosos, levando à produção eficiente de bioprodutos a partir de biomassa lignocelulósica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar, otimizar e caracterizar o melhor meio de cultura para a produção de enzimas celulasas do fungo *Trichoderma lixii* – 5A7 derivado de ambiente marinho e expressão heteróloga das celulasas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção das enzimas celulolíticas na fermentação submersa dos diferentes meios de cultura.
- Avaliar a cinética da produção das enzimas celulolíticas na condição de melhor produção.
- Avaliar o efeito de diferentes temperaturas na atividade enzimática.
- Realizar o planejamento fatorial experimental dos componentes do melhor meio de fermentação utilizando o delineamento do composto central rotacional (DCCR).
- Selecionar os ensaios do DCCR com melhor produção das celulasas.
- Avaliar a atividade enzimática do melhor ensaio para as enzimas celulolíticas em escala de laboratório e em biorreator.
- Extração do RNA total do fungo de ambiente marinho nos ensaios selecionados e síntese do cDNA.
- Realizar a técnica de PCR para amplificar fragmentos dos genes das enzimas, sequenciar e expressar em bactéria competente o produto gerado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo e Manutenção

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo *Trichoderma lixii* - 5A7 (MF379656) derivado de ambiente marinho em associação ecológica com Ascídias.

As Ascídias foram selecionadas para estudo dentro do Projeto Regular de Pesquisa "Investigação do Potencial Esquistossomicida, Leishmanicida e Citotóxico de Linhagens Fúngicas Associadas a Invertebrados Marinhos Pertencentes à Ascidiacea".

A coleta e identificação da ascídia foi realizada pelo Prof. Dr. Gustavo Muniz Dias da Universidade Federal do ABC-Centro de Ciências Naturais e Humanas. A ascídia *Botrylloides giganteus* foi coletada em setembro de 2015 em Ilhabela-SP (Cadastro SISGEN no A357371). A linhagem fúngica foi isolada pela doutoranda Rita Cássia Nascimento Pedroso e cedida pela Profa. Dra. Ana Helena Januário, da Universidade de Franca (UNIFRAN). A identificação da linhagem *Trichoderma lixii*-5A7 foi realizada por características morfológicas e sequenciamento parcial da região ITS do rDNA pelo Prof. Dr. Marcos Antônio Soares do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). O DNA genômico total da linhagem foi extraído utilizando kit de extração e a região ITS amplificada de acordo com PIETRO-SOUZA et al., 2017. Os amplicons foram sequenciados em sequenciador automático pelo método de Sanger e as sequências foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank utilizando o BLASTn (NCBI)

A cepa de *Trichoderma lixii* – 5A7 (Apêndice A) foi cultivada pela técnica *spread plate* em meio sólido ágar batata dextrose (PDA) sendo incubada por uma semana a 30°C para produzir um número suficiente de esporos que foram utilizados como inóculo na fermentação submersa. Para obtenção da solução de esporos, as placas foram raspadas e os esporos colocados em tubo do tipo Falcon® (previamente esterilizado) com água ultrapurificada (50 mL). Posteriormente foi realizada uma diluição (1:100) da solução filtrada e, com ajuda da câmara de Neubauer, foi quantificado o número de esporos para obtenção de 10⁷ esporos/mL.

Para a manutenção da linhagem, foram realizados repiques das cepas em meio sólido PDA a cada 15 dias e incubados a 30°C.

4.2 Produção enzimática

Fermentação utilizando diferentes meios de cultura

Foram utilizados quatro meios de cultura diferentes (A, B, C e D) apresentados na Tabela 4, baseados no trabalho de Ahamed e Vermette, (2009). Os meios foram autoclavados a 121°C, 1 atmosfera de pressão por 15 minutos. Posteriormente, foi realizado o inóculo (10^7 esporos/mL) com a linhagem de *Trichoderma lixii* – 5A7 que então foi mantido por um período de sete dias na incubadora rotativa a 30°C e 120 rpm.

Tabela 4. Composição dos meios de cultura utilizados para produção das enzimas celulolíticas pelo fungo *Trichoderma lixii* 5A7.

Componentes	Meio A	Meio B	Meio C	Meio D
Celulose (g/L)	10,0	-	7,5	-
Extrato de Levedura (g/L)	10,0	-	0,3	-
Glicose (g/L)	10,0	10,0	-	10,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	1,4	1,4	1,4	-
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2,0	2,0	2,0	4,0
CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)	0,4	0,5	0,3	-
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,3	0,3	0,3	-
FeSO ₄ .7H ₂ O (mg/L)	5,0	5,0	5,0	-
CoCl ₂ .6H ₂ O (mg/L)	3,7	-	20,0	-
MnSO ₄ .H ₂ O (mg/L)	1,6	1,6	1,6	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg/L)	1,4	1,4	1,4	-
Corn Steep Solids (g/L)	-	5,1	-	-
Peptona (g/L)	-	-	0,8	-
Ureia (g/L)	-	-	3,0	-
YNB (g/L)	-	-	-	6,7
CMC sódica (g/L)	-	-	-	20,0

YNB: Base Nitrogenada de Levedura CMC: Carboximetilcelulose

Fonte: Modificado de AHAMED e VERMETTE (2009).

Após o tempo de fermentação, os meios foram filtrados e armazenados em tubos Falcon® a -80°C para posterior dosagem das enzimas celulolíticas.

4.3 Preparo das curvas de calibração

A determinação de proteínas totais foi feita com base no método de Bradford (1976), utilizando uma curva padrão de Soroalbumina Bovina (BSA). Foi realizado através da adição de 100 μL do extrato enzimático e 900 μL do reagente de Bradford. Para poder realizar a quantificação de proteínas totais e dosagem enzimática das amostras dos diferentes meios de cultura, primeiramente se prepararam as curvas de calibração com concentrações conhecidas de soro albumina bovina (BSA) e dos produtos das reações enzimáticas na presença de diferentes reagentes (CMC, papel filtro, celulose microcristalina).

4.3.1 Curva de calibração Bradford

Para iniciar com esse procedimento, primeiro foi preparado o reagente Bradford pesando 50 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 que foi diluído em 25 mL de etanol (95%). Em seguida, foram adicionados 50 mL de ácido fosfórico (85%) e completou-se o volume com água destilada até 500 mL.

Em tubos de ensaio numerados de 1 a 7 foi distribuída água destilada variando de 0 a 90 μL , BSA (dissolvida em água para concentração estoque de 1 mg/mL e foi variando de 10 a 100 μL) e o reagente de Bradford (900 μL em todos os tubos). As concentrações de BSA foram de 0,01 a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Após homogeneização, os tubos foram colocados em repouso por 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (UV-M51 BEL) a 595 nm.

4.3.2 Curva de Calibração D-glicose

Em tubos de ensaio numerados de 1 a 6 foi distribuído água destilada variando desde 0 até 500 μL , solução de glicose de 0 a 500 μL (dissolvida em água para concentração estoque de 1 mg/mL) e o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) (500 μL). A concentração de glicose variou de 0 a 2,775 $\mu\text{mols}/\text{mL}$. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho a 100°C durante 5 minutos.

Após o tempo decorrido, a reação foi interrompida colocando os tubos num banho de água fria por 3 minutos e se adicionou a cada tubo 5 mL de água

destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

4.3.3 Curva de Calibração *p*-nitrofenol

Em tubos de ensaio numerados de 1 a 6 foi distribuído água destilada variando de 750 a 1000 μL , carbonato de sódio (1000 μL), o composto *p*-nitrofenol primeiramente preparado em solução estoque de concentração de 400nmol/mL e desta foram distribuídos de 0 a 250 μL que forneceu as concentrações finais variando de 0 a 100 nmols/mL. Após homogeneização a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 410 nm. Os dados obtidos dessa curva analítica foram utilizados para realizar a dosagem da enzima β -glicosidase.

4.3.4 Curva de Calibração L-Tirosina

Para a determinação da atividade enzimática das proteases fúngicas produzidas foi necessário a utilização de uma curva de calibração de L-Tirosina. A concentração de L-Tirosina variou de 0,11 mmo/L a 0,33 mmo/L. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (UV-M51 BEL) no comprimento de onda de 660 nm.

4.4 Dosagem enzimática.

Todas as dosagens aqui descritas foram realizadas por sextuplicada.

4.4.1 Determinação de Celulase Total

A atividade celulolítica total foi avaliada pelo método "Filter Paper Activity" (FPAse), no qual tiras de aproximadamente 1,0 x 8,0 cm de papel filtro Whatman #1, recortadas e enroladas, foram adicionadas no interior de tubos de ensaio pré-incubados a 50°C, contendo 1 mL de tampão citrato de sódio (50 mmol/L, pH 5-NEON) e 1 mL do extrato enzimático bruto (EEB). A hidrólise foi interrompida após 1 h de incubação com a adição de 2 mL de DNS. Os tubos foram colocados em água fervente por 5 minutos e, após resfriamento, foram adicionados 5 mL de água. Alíquotas de 4 mL foram coletadas para a análise em espectrofotômetro a 540 nm.

A concentração de açúcar redutor foi determinada através da curva de calibração de *D*-glicose em concentrações conhecidas como descrito anteriormente. A atividade enzimática (AE), foi calculada pela equação 1 descrita a seguir, onde ϵ é

a absorvidade retirada da curva de calibração (Apêndice B), cuja unidade é $\mu\text{mol/mL}$, ABS é a absorbância das amostras, V_T o volume total do ensaio em mL e t o tempo em minutos.

Equação 1

$$AE = \frac{AB * V_T}{\epsilon * t}$$

O resultado foi expresso considerando que uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade mínima de enzima necessária para liberar um μmol de glicose por minuto, por mL de reação, considerada com o UI (Unidades Internacionais).

4.4.2 Determinação de atividade de endoglucanase

A atividade da endoglucanase foi determinada por meio da hidrólise de soluções de carboximetilcelulose (CMC) (EVELEIGH et al., 2009). Dessa forma, alíquotas de 1 mL do EEB foram incubadas a 50°C e a reação foi dada pela adição de 0,5 mL de uma solução de CMC de viscosidade média (2% em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5). A reação foi interrompida após 30 minutos pela adição de 2 mL da solução de DNS como descrito anteriormente (MILLER, 1959; NEGRULESCU et al., 2012). A concentração de açúcar redutor total foi determinada da mesma forma apresentada para a atividade de Celulase Total e AE utilizando a equação 1.

4.4.3 Determinação de atividade de exoglucanase

Foi utilizada a metodologia descrita por Deshpande et al., (1984). Uma alíquota de 250 μL do EEB se incubou com 500 μL da solução 1% (p/v) de celulose microcristalina tipo 50 (Avicell), em solução tampão citrato de sódio (50 mmol/L, pH 5) a 50°C durante 2 h. Para paralisar a reação se adicionou aos tubos 2 ml de DNS e colocados em água fervente por 5 minutos, após esfriamento, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a velocidade máxima. A concentração de açúcar redutor total foi determinada da mesma forma apresentada para a atividade de Celulase Total de igual modo para a AE.

4.4.4 Determinação de atividade de β -glicosidase

Para determinar a atividade de β -glicosidase, foram adicionados 0,25 ml de EEB a tubos de ensaio, juntamente com 0,5 ml de uma solução de tampão citrato (50 mmol/L, pH 5). O meio reacional foi incubado a 50°C e, em seguida, foram adicionados 0,25 mL da solução 4 mmol/L de *p*-nitrofenil- β -*D*-glicopiranosídeo em tampão citrato. Após 10 minutos, para interromper a reação, se adicionou 1 mL de solução carbonato de sódio 1 mol/L. As amostras foram lidas no espectrofotômetro a 410 nm. A atividade enzimática foi calculada pela equação 2, onde ϵ é a absorvidade retirada da curva de calibração (Apêndice B), cuja unidade é nmol/mL e foi convertida para μ mol/mL; ABS é a absorbância das amostras, V_T o volume total do ensaio em mL e t o tempo em minutos.

$$\text{Equação 2 } AE = \frac{AB * v_T}{\epsilon * t}$$

Uma unidade é definida como sendo a quantidade mínima de enzima necessária para liberar um μ mol de *p*-nitrofenol por mL, por minuto de reação considerada como UI.

4.4.5 Determinação de atividade de protease

A quantificação da atividade proteolítica foi realizada segundo método descrito por Paranthaman et al. (2009), utilizando caseína como substrato: 200 μ L do extrato enzimático bruto ou da enzima ressuspenida foi adicionada à um tubo contendo 300 μ L de tampão fosfato de potássio (0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0) e 500 μ L de solução de caseína a 1% (p/v) em tampão fosfato de potássio (0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0). A reação enzimática foi incubada a 60°C por 10 minutos e a reação foi finalizada com a adição de 1 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v). A mistura reacional foi, então, centrifugada a 8000g por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado. Ao sobrenadante adicionou-se 5 mL de Na₂CO₃ (0,4 mol. L⁻¹) e 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteau (diluição em água ultrapura 1:3). A solução resultante foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro para o desenvolvimento da coloração azul. A leitura da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro a 660 nm (LOWRY et al, 1951). A atividade enzimática foi

calculada de acordo com a equação 2, onde \mathcal{E} é a absortividade retirada da curva de calibração (Apêndice B), cuja unidade é $\mu\text{mol/mL}$.

Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de tirosina por minuto conforme as condições experimentais.

4.5 Cinética de produção enzimática

Depois de realizar a fermentação e a dosagem das atividades das enzimas celulolíticas nos diferentes meios, foi escolhido o meio D (Tabela 5) para realizar a cinética de produção enzimática por período de 25 dias a uma temperatura de 20°C. Foram coletadas alíquotas (por sextuplicada) a partir do quarto dia. Uma vez coletadas as alíquotas, foram realizados os ensaios para a dosagem das atividades celulolíticas.

Tabela 5. Composição do meio de cultura D utilizado para cinética de produção das enzimas celulolíticas pelo fungo *Trichoderma lixii-5A7*.

Componentes	Meio D
Glicose (g/L)	10,0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	4,0
YNB (g/L)	6,7
CMC sódica (g/L)	20,0

YNB: Base Nitrogenada de Levedura; CMC: Carboximetilcelulose

4.6 Planejamento Fatorial Experimental

No presente trabalho, o planejamento fatorial foi realizado utilizando o delineamento do composto central rotacional (DCCR) (Figura 3) com o meio de cultura D, na temperatura de 20°C, variando as concentrações dos componentes do meio para otimizar a produção das enzimas celulolíticas do fungo *Trichoderma lixii - 5A7*. O software utilizado para o DCCR e o tratamento estatístico foi Experimental-Design Protimiza, utilizando a seguinte metodologia: Número de experimentos = $r \cdot (2^k + 2 \cdot k) + cp$

Onde:

r = número de Repetições

k = número de variáveis

cp = pontos centrais

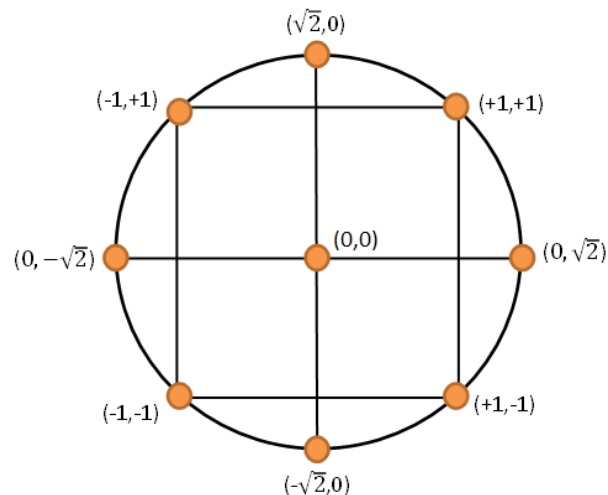


Figura 3. Ilustração do delineamento realizado no Planejamento Fatorial Experimental. Os vértices X e Y e os pontos são 0, +1, -1, $+\sqrt{2}$ e $-\sqrt{2}$, onde $+\sqrt{2}$ e $-\sqrt{2}$ também podem ser escritas como +1,41 e - 1,41. O DCCR é composto de um ponto central e de pontos axiais que foram analisados em sextuplicada.

4.7 Sistema de Fermentação em Biorreator para produção das celulases

Utilizando o meio D nas condições estabelecidas por planejamento experimental, foi realizada a fermentação em biorreator TECNAL (Figura 4 A) equipado com controlador de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, agitação, rotâmetro para aeração e bombas de alimentação de nutrientes, adição de antiespumante e adição de soluções ácidas e básicas. O biorreator dispõe de volume total de 7,5 L, e volume útil de 5,0 L. O diâmetro interno do biorreator é 0,190 m e diâmetro externo 0,217 m. O sistema dispõe de quatro chicanas opostas diametralmente com largura de 0,015 m e foi montado utilizando-se dois impelidores

uma do tipo turbina *Rushton* e outra do tipo *Smith* e a dimensão do posicionamento das turbinas no biorreator foi de 70 mm (H1) e de 10 mm (H2) como apresentado na Figura 4 B. O volume de trabalho utilizado para este experimento foi de 3 L de meio de fermentação.

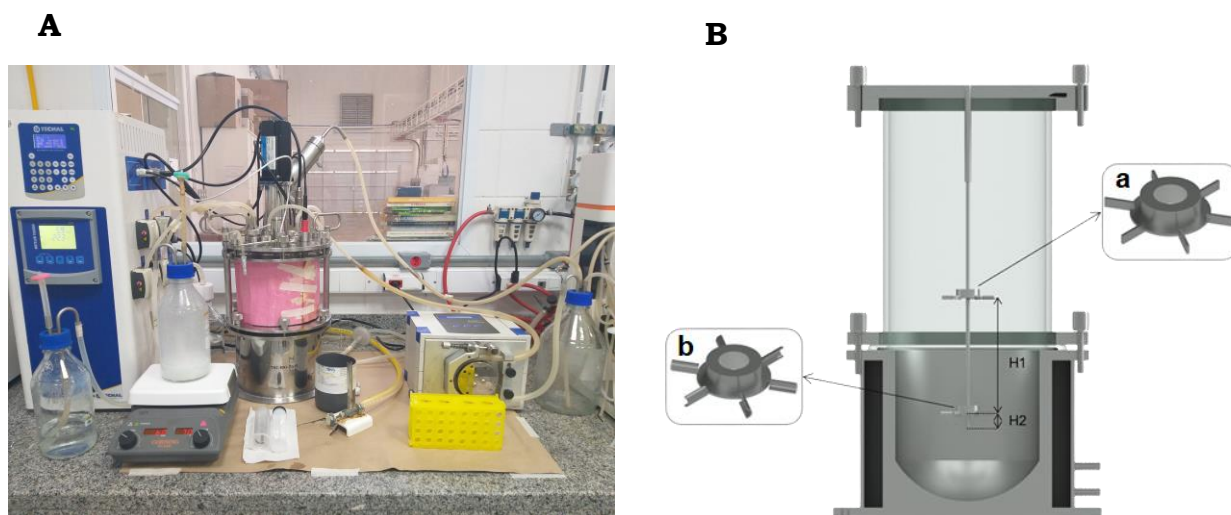


Figura 4. A) Biorreator TECNAL utilizado para a fermentação dos ensaios 9 e 23 para a produção das celulases pelo fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7*. B) Vista frontal; (a) impelidor do tipo turbina Smith; (b) impelidor do tipo turbina Rushton.

4.8 Sistema de aquisição de dados e controle do biorreator.

Foi utilizado um Controlador Tecnal, TEC-BIO-FLEX com sensor de temperatura Pt-100, medidor de fluxo de gás Aalborg - GFC37, 4 bombas peristálticas (nutrientes, antiespumante, ácido e base), sistema de agitação e conexão para sensores de oxigênio e pH. Sendo o sensor de oxigênio dissolvido Mettler Toledo, O2 Transmitter 4500 e o sensor de pH Mettler Toledo, 405-DPAS-SCK8S/225, juntamente com um sistema de aquisição de dados para permitir medições em tempo real. Para este estudo o processo foi monitorado e controlado à temperatura de 20°C, com rotação de 200 rpm e aeração de 1,5 vvm, manutenção do pH em $5,2 \pm 0,2$ e foi mantido pela adição de 1 M HCl ou 1 M NaOH, a espuma

foi controlada pela adição de agente antiespumante. Foi coletada uma amostra logo após o inóculo no meio de fermentação e posteriormente foram coletadas amostras (dois pontos ao dia) a cada 24 horas subsequentes, por período de 7 dias para avaliação das atividades enzimáticas e teor proteico. Foram realizadas um total de 6 fermentações (triplicata para os ensaios 9 e 23).

4.9 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada utilizando o "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen). Resumidamente, o fungo *Trichoderma lixii*-5A7 foi cultivado no meio D por período de 15 dias na temperatura de 20°C nas condições que foram selecionadas na etapa de planejamento fatorial experimental (ensaio 9 e 23). Finalizado o período de fermentação, foram filtrados e coletados aproximadamente 100 mg de micélio que foram utilizados para extração do RNA total. O micélio foi pulverizado em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo. O material foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL e foram adicionados 450 µL do tampão de lise composto por hidrocloreto de guanidina (RCL) contendo 1% de β-mercaptoetanol e, em seguida, o tubo foi agitado em vortex.

O material lisado foi transferido para uma coluna de separação acoplada sobre um tubo coletor e centrifugado por 2 minutos na máxima velocidade, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 1,5 mL e misturado com meio volume de etanol 96-100%. A mistura foi transferida para uma nova coluna de purificação acoplada sobre um tubo coletor. Após centrifugação por 15 segundos a 8.000 x *g*, o filtrado foi descartado, foram adicionados 700 µL do tampão RW1 na coluna e centrifugado novamente. O filtrado foi descartado e foram adicionados 500 µL do tampão RPE na coluna de purificação, centrifugando o tubo por mais 15 segundos a 8.000 x *g*. O filtrado foi descartado e novamente o tampão RPE foi adicionado, centrifugando o tubo por 2 minutos. A coluna foi transferida para um tubo coletor novo e centrifugada por 1 minuto a 16.000 x *g*, para remoção de resíduos do tampão RPE. A coluna foi colocada em um tubo novo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram adicionados 30 µL de água livre de RNase

diretamente na membrana da coluna de purificação e centrifugado por 1 minuto a 8.000 xg, sendo que a eluição foi repetida com os mesmos 30 µL filtrados.

Uma alíquota de RNA total extraído foi utilizada para quantificação em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific), observando-se a relação entre 260/280 e 260/230. A qualidade do RNA total extraído também foi verificada por eletroforese desnaturante em gel de agarose 1,2% em TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA, água Milli-Q), o qual também foi usado como tampão de corrida. Para a eletroforese, foi aplicada uma solução contendo aproximadamente 3 µg do RNA extraído, 60% (v/v) de formamida, 1X RNA "loading buffer" (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,25% de azul de bromofenol, 60% glicerol) e 1 µL de brometo de etídeo (1 mg/mL). A amostra foi incubada por 5 minutos a 65° C, posteriormente foi incubada em banho de gelo por 5 minutos e submetida à eletroforese com voltagem constante de 5 V/cm. Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de gel "INGENIUS" (Syngene).

4.10 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com o kit "High-Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems) seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O volume final da reação foi de 50 µL, sendo utilizados 5 µg do RNA total. Em um tubo de 200 µL foram adicionados: 5 µL de tampão RT (10X), 5 µL de RT "random primers" (10X), 2 µL de dNTPs (100 mM), 3 µL da enzima MultScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), 5 µg do RNA extraído e água ultrapurificada livre de RNase para um volume final de 50 µL. A reação foi incubada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com a seguinte ciclagem: 25° C por 10 min, 37° C por 120 min e 85° C por 5 s.

4.11 Desenhos dos iniciadores (primers) para PCR das enzimas celulolíticas

Com o objetivo de amplificar fragmentos das regiões codificadoras das enzimas celulolíticas do fungo *Trichoderma lixii-5A7*, foi realizado o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (também chamados em inglês de "primers"), mostrados na Tabela 6, baseados nas sequências das BG, EnG e ExG

pertencentes aos gêneros *Trichoderma* e *Hypocrea* já depositadas em banco de dados. Para isso, foram buscadas no NCBI ("National Center for Biotechnology Information") (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as sequências de nucleotídeos e de proteínas utilizando as seguintes palavras chave: beta-glicosidase, CMCase, *Trichoderma*, endoglucanase, *Hypocrea*, exoglucanase, lixii.

As sequências encontradas para cada enzima, foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL OMEGA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e grupos de sequências foram divididos de acordo com as porcentagens de identidade. A partir de regiões conservadas das sequências alinhadas das proteínas, primers para cada grupo das enzimas de interesse foram desenhados e mandados sintetizar.

Tabela 6. Sequência dos primers utilizados na PCR

Nome do primer	Orientação	Sequência (5' →3')	Tm (°C)
BG1F	Foward	ATGYTNCCNAARGAYTTYCARTG	60
BG1R	Reverse	CKCKKYCGCAATCARCTC	62
BG2F	Foward	ATGCTTTACACAGCCGTAGC	55
BG2R	Reverse	TGAGACCGTGAAGCTTCC	55
EnG1F	Foward	ATGAAGYTCYTTTCARRTCYTMCC	60
EnG1R	Reverse	GTTGATAGATGCGGTCCAGG	57
EnG2F	Foward	ATGTTGAAGCTCACGGCGCTC	60
EnG2R	Reverse	AGTAGTATAACGGGCAACGTCAC	58
EnG3F	Foward	CGATGCATATCAATCACCCGAC	58
EnG3R	Reverse	ACGTCGATCTCGGCACC	57
ExG1F	Foward	GCNWSNWSNTAYTGGTAYG	63
ExG1R	Reverse	CCANARCCARTTRTTYTCC	57

K= G+T; M= A+C; N= A+C+G+T; R= A+G; S= C+G; W= A+T; Y= C+T

Tm: Temperatura de "Melting"

4.12 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Uma vez os primers desenhados e sintetizados, foram realizadas as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o cDNA como DNA molde. Foram utilizadas diferentes condições para as PCRs dependendo da temperatura de anelamento dos primers (relacionada à temperatura de "melting" Tm), da sequência a amplificar e da enzima polimerase: Phusion High-fidelity DNA polimerase (New England Biolabs) ou GoTaq G2 DNA polimerase (Promega).

Para cada grupo das enzimas celulolíticas, diferentes condições foram utilizadas até a amplificação de um fragmento de DNA, como mostra a Tabela 7 a seguir:

Tabela 7. Condições de PCR utilizadas para amplificação dos diferentes fragmentos das enzimas celulolíticas.

Fragmento a ser amplificado	Condições da PCR	DNA polimerase utilizada
BG1 (cerca 1400 pares de bases, pb)	Desnaturação inicial: 98°C – 1 min	Phusion High-fidelity DNA polymerase
	35 ciclos: 98°C – 10 s	
	60°C – 30 s	
	72°C – 2:30 min	
	Extensão final: 72°C – 10 min	
BG2 (cerca de 2300 pb)	Desnaturação inicial: 98°C – 10 min	Phusion High-fidelity DNA polymerase
	5 ciclos: 98°C – 30 s	
	50°C – 30 s	
	72°C – 2:30 min	
	10 ciclos: 98°C – 30 s	
	55°C – 30 s	
	72°C – 2:30 min	
	10 ciclos: 98°C – 30 s	
60°C – 30 s		
	72°C – 2:30 min	
	Extensão final: 72°C – 10 min	
EnG1 (cerca de 845 pb)	Desnaturação inicial: 98°C – 5 min	Phusion High-fidelity DNA polimerase
	40 ciclos: 98°C – 30 s	
	50°C – 45 s	
	72°C – 1:30 min	
	Extensão final: 72°C – 10 min	
EnG2 (cerca de 2400 pb)	Desnaturação inicial: 98°C – 5 min	Phusion High-fidelity DNA polymerase
	35 ciclos: 98°C – 30 s	
	55°C – 30 s	
	72°C – 2:30 min	
	Extensão final: 72°C – 10 min	

EnG3 (cerca de 680 pb)	Desnaturação inicial: 95°C – 3 min	GoTaq G2 DNA polimerase
	30 ciclos: 95°C – 30 s	
	55°C – 30 s	
	72°C – 1:30 min	
	Extensão final: 72°C – 10 min	
ExG1 (cerca de 1800 pb)	Desnaturação inicial: 98°C – 5 min	Phusion High-fidelity DNA polimerase
	35 ciclos: 98°C – 30 s	
	40°C – 30 s	
	72°C – 2:30 min	
	Extensão final: 72°C – 10 min	

Os componentes da PCR e concentrações são mostrados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Componentes da Reação em cadeia da Polimerização (PCR), suas concentrações e quantidades, utilizando a enzima Phusion polimerase.

Reagentes	Quantidades	Concentração final
Tampão	4 µL	1x
MgCl ₂	0,6 µL	1,5 mM
dNTPs	0,4 µL	200 µM
Primer Foward	0,2 µL	0,5 µM
Primer Reverse	0,2 µL	0,5 µM
Phusion DNA polimerase	0,2 µL	1,0 U
cDNA	0,2 µL	<250 ng
Água ultrapura	14,2 µL	-
Total	20 µL	-

Tabela 9. Componentes da Reação em cadeia da Polimerização (PCR), suas concentrações e quantidades, utilizando a GoTaq polimerase.

Reagentes	Quantidades	Concentração final
Tampão	4 µL	1x
dNTPs	0,4 µL	200 µM
Primer Foward	0,4 µL	1 µM
Primer Reverse	0,4 µL	1 µM
Taq polimerase	0,1 µL	1,25 U
cDNA	0,2 µL	<0,5 µg
Água ultrapura	14,5 µL	-
Total	20 µL	-

Os produtos obtidos nas PCRs foram conferidos por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta.

4.13 Purificação dos produtos da PCR

Foram empregados dois métodos de purificação:

A) Purificação a partir do gel de agarose

A purificação dos produtos de PCR do tamanho esperado, mas que apresentaram mais de uma banda após a reação foi realizada a partir do gel de agarose com auxílio do kit "GeneJET Gel Extraction" (Thermo Scientific). As bandas contendo os fragmentos de interesse observados no gel foram recortados com uma lâmina de bisturi previamente limpa e colocados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, onde foram adicionados na proporção 1:1 volume do Binding Buffer para cada volume de gel (100 µL de Binding Buffer para cada 100 mg do gel). Os tubos foram incubados a 65° C em bloco de aquecimento cerca de 5 min ou até que o gel

dissolvesse completamente. Após dissolução, foi adicionado 1 volume de isopropanol e a solução foi transferida para uma coluna de purificação acoplada a um tubo coletor e centrifugada por 1 min à velocidade máxima. O filtrado foi descartado e para lavagem foram adicionados 700 μ L de Wash Buffer na coluna, centrifugados por 1 min à velocidade máxima, o filtrado foi descartado e após nova centrifugação sem adição do Wash Buffer, a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foram adicionados 30 μ L de tampão Elution Buffer (Tris-EDTA, pH 8,0) para a eluição, centrifugado por 1 min.

Uma alíquota da purificação para quantificação em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific) foi utilizada, observando-se a concentração e a relação entre 260/280 e 260/230.

B) Purificação a partir da PCR

A purificação dos produtos de PCR que se apresentaram como banda única do tamanho esperado foi realizada diretamente do produto da PCR com auxílio do kit "GeneJET PCR Purification" (Thermo Scientific). Foram adicionados um volume 1:1 do Binding Buffer à mistura de reação da PCR (100 μ L de Binding Buffer para cada 100 μ L da mistura) e foram adicionados 1:2 volumes de isopropanol. A solução foi transferida para uma coluna de purificação acoplada a um tubo coletor e centrifugada por 1 min à velocidade máxima. O filtrado foi descartado e para lavagem foram adicionados 700 μ L de Wash Buffer na coluna, centrifugados por 1 min à velocidade máxima, o filtrado foi descartado e após nova centrifugação sem adição do Wash Buffer, a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foram adicionados 30 μ L de tampão Elution Buffer (Tris, PBA, pH 8,0) para a eluição, centrifugado por 1 min.

Uma alíquota da purificação para quantificação em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific) foi utilizada, observando-se a concentração e a relação entre 260/280 e 260/230.

4.14 Sequenciamento

Para as reações de PCR para sequenciamento foi utilizado o kit "Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems). Foram misturados 2 µL de mix Big Dye, 2 µL do tampão de sequenciamento (5X), 1 µL de primer (3,2 µM) "forward" ou "reverse", volume de DNA purificado (40 ng) e água ultrapura autoclavada para um volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 96 °C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, TM °C (dependendo do primer utilizado) por 5 s, 60 °C por 4 min e extensão final de 60 °C por 5 min. Após a amplificação, para cada amostra a ser sequenciada, foram agregados 45 µL de solução SAM e 10 µL de resina. As amostras foram submetidas a homogeneização em vórtex por 30 min. O sequenciamento automático foi realizado no sequenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). As sequências obtidas após o sequenciamento, foram comparadas com o banco de dados NCBI, utilizando o programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar a homologia com outras já depositadas no GenBank. Dessa forma, permitindo a confirmação do produto de PCR obtido e, conseqüentemente, a identificação de sequências homólogas presentes em diferentes microrganismos.

4.15 Clonagem dos fragmentos de interesse obtidos

Após a purificação dos fragmentos de DNA obtidos do tamanho desejado, procedeu-se à clonagem em vetor plasmidial para o grupo das BG1 e as EnG1. Posteriormente, a clonagem dos fragmentos foi confirmada pelo método de PCR de colônia.

4.15.1 Reação de ligação com o vetor utilizando a técnica LIC (Clonagem Independente de Ligase) para o grupo BG1

Os fragmentos de interesse obtidos na PCR para o grupo da BG1 foram purificados e ligados ao vetor pNIC28-Bsa4 (Anexo 1) pela técnica de clonagem independente de ligase (LIC) (STOLS et al., 2002). Para tanto, foram construídos os "primers" BG1_LICF(TACTTCCAATCCATGTTGCCCAAGGACTTTCAGTG), BglI1_Lic_R(TATCCACCTTTACTGTTACTCCTTCGCAATCAACTCGTC) contendo

as sequências para a "LIC" (sublinhadas), complementares ao vetor pNIC28-Bsa4. Para a reação de PCR utilizou-se: tampão 5X da Phusion Polymerase, 10 mM de dNTP mix, 2,5 ng/μL de cDNA, 5 μM de cada primer LIC e 1 U/50 μL de Phusion Polymerase, em um volume final de 30 μL. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados utilizando "PCR purification kit". Os produtos purificados foram clonados no vetor pNIC28-Bsa4, de acordo com as seguintes etapas: o vetor foi linearizado utilizando a enzima de restrição BsaI e incubado a 37 °C por 2 h, os produtos da PCR (inserto) e o vetor linearizado foram tratados por separado com a enzima T4 DNA polimerase com adição de dCTP para o inserto e dGTP para o vetor com volume final de 10 μL e 100 μL respectivamente. A mistura foi incubada no termociclador por 30 min a 22 °C e posteriormente por 20 min a 75 °C. Depois, foi realizada outra incubação por 30 min a 22 °C para a ligação entre 2 μL do inserto tratado e 1 μL do vetor tratado, a qual foi mantida em gelo até transformação em bactéria competente (*E. coli* linhagem DH5α).

4.15.1.1 Transformação por choque térmico em bactéria quimiocompetente

O produto da ligação foi colocado no tubo contendo a bactéria competente e incubado no gelo por 30 min. Em seguida, o choque térmico foi realizado incubando em banho-maria de 42°C por 2 min. As células foram recuperadas pela adição de 1 mL de meio LB (Lúria-Berthani) seguindo incubação a 37° C por 60 min. Os microtubos foram centrifugados por 1 min na máxima velocidade. O pellet gerado foi ressuscitado em 100 μL do sobrenadante que foi plaqueado em meio LB contendo canamicina (50 μg/mL) e 5% de sacarose. As placas foram incubadas por 12 a 16 horas a 37° C e colônias isoladas foram selecionadas para buscar colônias recombinantes por PCR de colônia.

4.15.2 Reação de ligação com o vetor pJet1.2blunt para EnG1

Os fragmentos de interesse obtidos na PCR para o grupo EnG1 foram purificados e ligados ao vetor pJet1.2blunt (Anexo 2) do kit "CloneJet™ PCR Cloning Kit" (Fermentas) seguindo-se o protocolo do fabricante. Para cada reação de ligação, em um tubo de 1,5 mL, foram adicionados 1 μL do vetor pJet1.2blunt (50

ng/ μ L), 10 μ L do tampão de ligação (2X), 1 μ L da enzima T4 DNA ligase (5 U/ μ L), 1 μ L do fragmento da PCR a ser ligado e H₂O ultrapurificada para um volume final de 20 μ L. As reações foram vortexadas por 5 s e incubadas por 30 min a temperatura ambiente e depois submetidas a transformação em *E. coli* como apresentado no item 4.15.1.1. Ao final, o precipitado de células foi plaqueado em meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) e as placas foram incubadas por 12 a 16 horas a 37° C.

4.16 Análise dos clones recombinantes

Para verificar a eficácia do processo de clonagem foram realizadas as técnicas de PCR de colônias obtidas na transformação para os grupos das BG1 e das EnG1.

4.16.1 PCR de colônia BG1e EnG1

Foram selecionadas algumas colônias das transformações dos produtos de ligação com os fragmentos de BG1, EnG1 retiradas do meio de cultura, com auxílio de um palito esterilizado e diluídas em 10 μ L de água purificada. A presença do inserto foi verificada por PCR com os "primers" BG1 "forward" (5' ATGYTNCNAARGAYTTYCARTG 3') e B1seq "reverse" (5' CTCGTTGAAGGTGATCCAG 3'). As reações de PCR foram preparadas em uma solução contendo 0,2 μ L do "primers" BG1F e BG1seqR (50 μ M), 0,4 μ L de dNTPs (10 mM), 4 μ L de tampão para *Taq*; 0,1 μ L da enzima *GoTaq* G2 DNA polimerase (Promega), 5 μ L da colônia diluída e água ultrapura autoclavada para um volume final de 20 μ L. A amplificação foi realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: desnaturação inicial de 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 50°C por 45 s, 72°C por 1min e 30s, com uma extensão final a 72°C por 5 min. Da mesma forma que as demais reações de PCR, os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

4.16.2 PCR das colônias do grupo EnG1

Foram selecionadas algumas colônias e retiradas do meio de cultura, com auxílio de um palito esterilizado, diluídas em 10 μ L de água purificada. A presença do inserto foi verificada por PCR com os "primers" EnG1 "forward" (5'

ATGAAGYTCYTTTCARRTCYTMCC 3') e "reverse" (5'
GTTGATAGATGCGGTCCAGG 3'). As reações de PCR foram preparadas como descrito no item 4.16.1 utilizando os primers para EnG1.

4.17 Extração de DNA Plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit "Quick Plasmid Miniprep" (Invitrogen). Para tanto, as células bacterianas crescidas "overnight" em 5 mL de cultura de LB contendo o antibiótico adequado foram decantadas utilizando por centrifugação (Eppendorf – 5810R) a 4.000 rpm por 5 min. O pellet foi ressuspensionado em 250 µL de tampão R3 contendo RNase, depois foram adicionados 250 µL de tampão L7 (tampão de lise). O microtubo foi invertido por 4 a 6 vezes e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente foram adicionados 350 µL de tampão N4 (para neutralização e precipitação). Repetiu-se a homogeneização por inversão e o microtubo foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna acoplada sobre um tubo coletor e centrifugado por 1 min a 12.000 x g. O filtrado foi descartado, a coluna foi lavada com 500 µL de tampão etanólico W9 e submetida a centrifugação por 1 min a 12.000 x g, repetindo-se a mesma por 1 min para remoção de resíduos do tampão de lavagem. A coluna foi transferida para um tubo de centrifuga limpo, foram adicionados 75 µL do tampão de eluição TE e incubada à temperatura ambiente por 1 min, depois centrifugada por 2 min a 12.000 x g para eluição do DNA plasmidial.

4.18 Transformação e Expressão heteróloga em *E.coli*

O vetor pNIC28-Bsa4 carregando a sequência codificadora de beta-glicosidase foi transformado por eletroporação nas células de *E. coli* BL21 GroEL. Para tanto, as células foram descongeladas em gelo e receberam 5 µL do DNA plasmidial extraído das colônias selecionadas. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um pulso elétrico nas seguintes condições: 1,7 kV, 200 Ω e 25 µF. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio LB na cubeta para remover as células e transferi-las para um microtubo estéril, seguindo uma incubação a 37°C por 1h, sob agitação. Posteriormente, as células foram

plaqueadas em meio LB com canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 h.

4.19 Indução da expressão heteróloga de beta-glicosidase

Após o crescimento das colônias em placa foram preparados inóculos dos clones em 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol os quais foram incubados "overnight" sob agitação a 37°C. Posteriormente, 500 µL dessas culturas foram inoculadas em 50 mL de meio LB contendo os antibióticos e seguindo incubação a 37°C até atingir densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0,5-0,8. Neste momento, foi coletada uma alíquota de 400 µL como controle não induzido, para posterior análise em gel de poli-acrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), e então foi adicionado IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) em uma concentração final de 0,4 mM para iniciar a indução por período de 4 h a 37°C. Após o período de indução, foi coletada uma amostra de 400 µL para análise em SDS-PAGE e as células foram centrifugadas a 8800 g a 4°C por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o pellet foi ressuscitado em tampão de lise pH 8,0 (NaCl 500 mM, PMSF 1 mM, DTT 1 mM, Tris 50 mM) na proporção de 2 mL por grama de pellet e submetidas à lise celular por meio de sonicação por 15 min, 5 s ON/10 s OFF, a uma amplitude de 40%, utilizando o sonicador Sonics vibra-cell. Ao final da sonicação foi guardado uma alíquota de 20 µL para posterior análise em SDS-PAGE. O produto de lise celular foi novamente centrifugado a 2000 g a 4°C por 30 minutos sendo coletados 20 µL de sobrenadante para posterior análise e armazenadas na geladeira alíquotas de 3 mL do sobrenadante para posterior dosagem enzimática.

Para realizar a análise em SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970), foram adicionados 40 µL do tampão de amostra 2X (125 mM de Tris-HCl pH 6,7; 30% de glicerol; 4% de SDS; 0,002% de azul de bromofenol blue e 10 % de β-mercaptoetanol) contendo 100 mM de DTT ao pellet da amostra coletada antes da indução, 110 µL ao pellet após 4 h de indução e 20 µL às amostras do lizado e do sobrenadante. Todas as misturas com tampão foram desnaturadas a 95°C por 5 min, sendo posteriormente aplicados 10 µL de cada amostra no gel de

poliacrilamida e 2 μL do marcador de massa molecular de proteína (10 kDa, Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada com Tampão de corrida 1X (TAE 50x-Tris-base 2M, ácido acético glacial 2M e EDTA 0,05M, pH 8,0) em cuba de eletroforese sob uma corrente de 90 V. Depois da corrida o gel foi corado com uma Solução de Coomassie "overnight" e descorado em uma solução descorante (ácido acético 5%, Metanol 10% e água) por aproximadamente 3 h, trocando a solução a cada 1 h.

4.20 Atividade enzimática da BG1 recombinante.

O teste de atividade enzimática foi feito usando *p*-nitrofenil- β -*D*-glicopiranosídeo. Todos os ensaios foram realizados em triplicada, conforme descrito a seguir: 100 μL de *p*-nitrofenil- β -*D*-glicopiranosídeo (4 mmol/L) em tampão citrato (50 mmol/L, pH 5), 100 μL de enzima presente na fração solúvel do sobrenadante ou na fração insolúvel do precipitado e 800 μL de tampão citrato. As reações foram realizadas na temperatura de 50°C por um período de 10 minutos. As reações foram interrompidas adicionando-se 1 mL da solução carbonato de sódio (1 mol/L) e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. O mesmo ensaio foi realizado com amostras controle de um inóculo realizado com as mesmas colônias descritas no item 4.19, mas que não receberam a adição do indutor IPTG, passando pelas demais etapas de incubação, lise e centrifugação.



5. RESULTADOS

5.1 Dosagem de atividade das enzimas celulolíticas

5.1.1 Nos diferentes meios de cultivo (A, B, C e D).

O fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii* - 5A7 foi inoculado nos diferentes meios de cultivo baseados na literatura Ahamed e Vermette (2009) e o tempo do cultivo foi de 7 dias. Após a passagem do tempo foi realizada a dosagem das celulases de proteínas totais para calcular a atividade específica afim de determinar o melhor meio no qual o fungo teve uma maior produção dessas enzimas. Na tabela 9 estão dispostas as atividades específicas das celulases para cada meio.

Tabela 10. Atividade Específica de celulases do fungo *Trichoderma lixii*-5A7

Meios	FPase (UI/mg)	endoglucanase (EnG) (UI/mg)	exoglucanase (ExG) (UI/mg)	β -glicosidase (BG) (UI/mg)
A	4,51 \pm 0,06 ^a	1,94 \pm 0,09 ^a	2,54 \pm 0,08 ^b	0,45 \pm 3,46 ^a
B	9,34 \pm 0,04 ^b	24,89 \pm 0,11 ^c	1,81 \pm 0,09 ^a	4,91 \pm 3,15 ^a
C	4,27 \pm 0,13 ^a	7,32 \pm 0,20 ^b	1,75 \pm 0,13 ^a	0,46 \pm 5,57 ^a
D	27,41 \pm 0,05 ^c	44,80 \pm 0,07 ^d	5,91 \pm 0,04 ^c	4,51 \pm 2,51 ^a

produzida em diferentes meios de cultura.

Médias \pm desvio-padrão seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 95% de confiança ($p < 0,05$), utilizando o programa Statgraphics 19 (Apêndice C).

A constituição dos meios de cultura A, B, C e D estão apresentadas na Tabela 4 na seção Material e Métodos.

Como demonstrado na Tabela 10, o meio D, rico em Carboximetilcelulose (CMC) proporcionou a melhor produção de celulases no período de 7 dias, obtendo 27,41 UI/mg para FPase sendo aproximadamente 2,93 vezes superior comparado com o meio B, para EnG se obteve 44,80 UI/mg e 5,91 UI/mg para ExG sendo 1,8 e 3,27 vezes superior ao meio B respectivamente, ao realizar ANOVA obtivemos um valor p menor que 0,05 indicando que existe uma diferença significativa nas atividades enzimáticas utilizando os diferentes meios, por tanto se realizou o teste de Tukey e pudemos verificar que existe uma diferença significativa nas atividades FPase, EnG e ExG entre os meios A, B, C comparadas ao meio D.

5.1.2 No Cultivo selecionado

O fungo de ambiente marinho *T. lixii* - 5A7 foi cultivado no meio D, que demonstrou melhores resultados para a produção das celulases, por um período de 25 dias e a diferentes temperaturas (20°C e 30°C) para realização da cinética enzimática que foi realizada através da atividade específica a fim de determinar o melhor dia de produção para as enzimas extracelulares.

A Figura 5 apresenta os gráficos das atividades específicas das celulases e na Tabela 11 estão dispostos as atividades específicas e os picos de produção dependendo da temperatura.

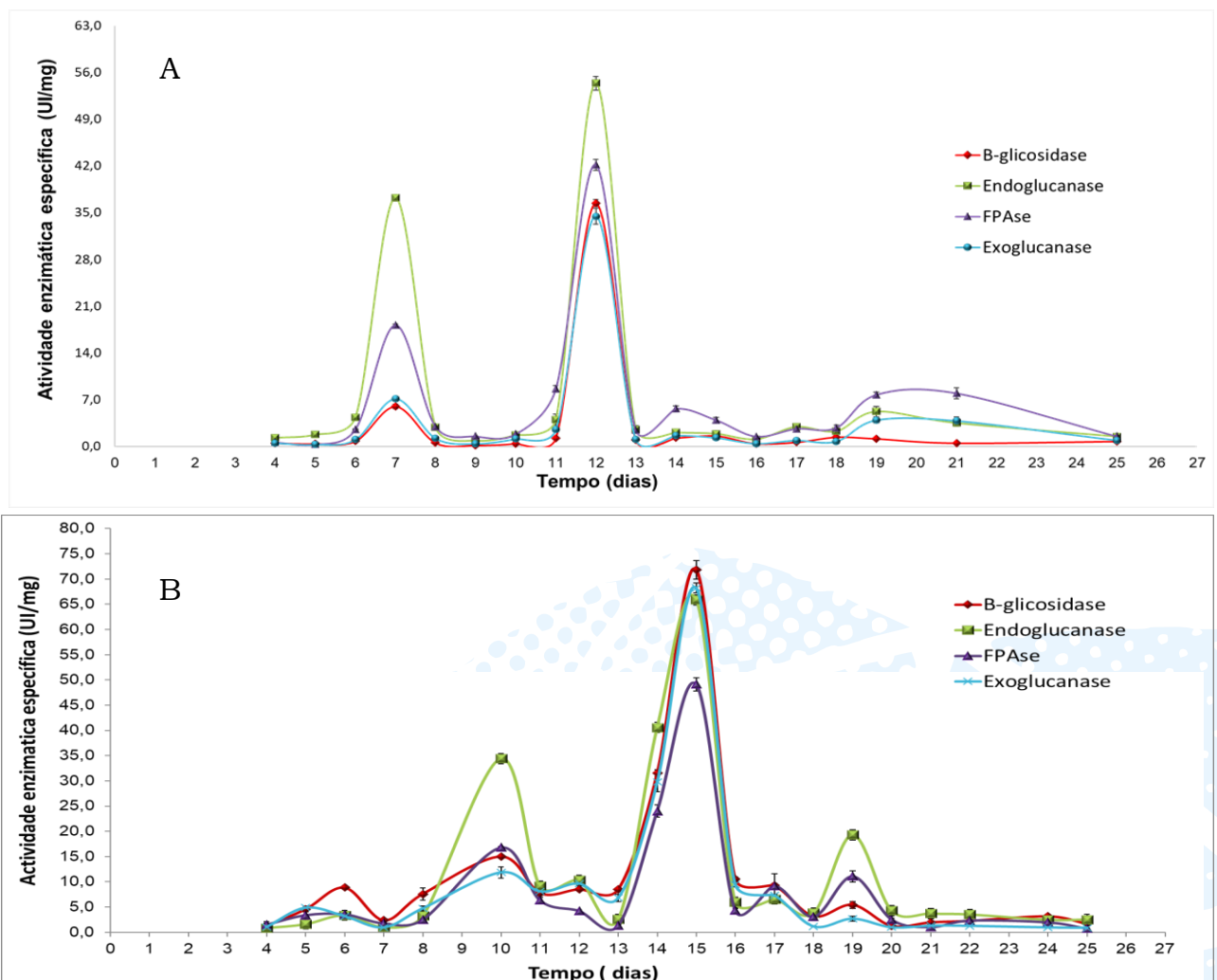


Figura 5. Atividade Específica das celulases do fungo marinho *Trichoderma lixii*-5A7. A) Temperatura de 30°C B) Temperatura de 20°C.

Na figura 5 observamos que as diferentes celulasas mostram comportamentos similares quanto sua atividade numa mesma temperatura, onde os picos de maiores atividades foram nos dias 7 e 12 na temperatura de 30°C e nos dias 14 e 15 na temperatura de 20°C.

Tabela 11. Atividade Específica de Enzimas Celulolíticas do Fungo *Trichoderma lixii* -5A7 produzidos em Meio D.

Temperatura (°C)	Dia	BG (UI/mg)	EnG (UI/mg)	FPase (UI/mg)	ExG (UI/mg)
30°C	7	5,963 ± 0,308 ^a	37,208 ± 0,443 ^a	18,165 ± 0,172 ^a	7,110 ± 0,151 ^a
30°C	12	36,427 ± 0,524 ^b	54,385 ± 1,030 ^c	42,170 ± 0,795 ^c	34,435 ± 1,189 ^c
20°C	14	31,501 ± 0,687 ^b	40,566 ± 1,379 ^b	24,031 ± 1,177 ^b	29,789 ± 1,970 ^b
20°C	15	71,838 ± 1,863 ^c	65,865 ± 2,378 ^d	49,123 ± 1,296 ^d	68,231 ± 0,934 ^d

Médias ± desvio-padrão seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 95% de confiança (p<0,05), utilizando o programa Statgraphics 19.

Podemos observar na Tabela 11 que a produção enzimática do fungo de ambiente marinho *T. lixii* - 5A7 não diminui ao reduzir a temperatura obtendo atividades específicas maiores que na temperatura de 30°C, mas a produção foi mais demorada tendo o maior pico de produção no dia 15 enquanto que para a temperatura de 30°C o pico de produção maior foi no dia 12. Nesta etapa também realizamos a produção das celulasas na temperatura de 40°C, mas os resultados não foram favoráveis comparados com as outras temperaturas testadas. Os dados estão apresentados no Apêndice D.

Os fungos produtores de enzimas celulolíticas utilizam diferentes mecanismos para degradar a celulose. A maioria secreta celulasas individuais, que atuam sinergicamente sobre a celulose nativa (REYES-SOSA et al., 2017; WARDEN, LITTLE e HARITOS, 2011). Nesta etapa do trabalho quando foram

testados os diferentes meios de cultivo para a produção das celuloses, foi observado que os níveis de açúcar (glicose) no meio D fornecido com CMC eram mais altos do que os demais meios. Isso se deve possivelmente ao fato de que o CMC é um material amorfo, o que facilita sua hidrólise. Demais autores relataram que as regiões amorfas da celulose são facilmente atacadas por enzimas celulolíticas, enquanto áreas mais cristalinas podem ser mais resistentes ao ataque enzimático (OBENG et al., 2017; WILSON, 2008).

Os resultados da cinética enzimática mostraram um aumento no sétimo dia de incubação para todas as enzimas principalmente para as EnG atingindo um pico de 54,385 UI/mg no dia 12 na temperatura de 30°C. Para as BG foi obtido 36,427 UI/mg como maior pico de produção no dia 12 e a partir do dia 16 a atividade começa a diminuir chegando a 0,698UI/mg no dia 25. Para a temperatura de 20°C ocorreu um aumento no dia 10 de incubação para todas as enzimas e foram obtidos os picos de maior produção principalmente para a BG, com 71,838 UI/mg no dia 15 como podemos observar na Tabela 11 e Figura 5B. A atividade BG teve uma notável redução no dia 18 chegando a 1,667 UI/mg no dia 25. Esta redução de atividade em ambos os casos provavelmente ocorre pela escassez de fontes de nutrição necessárias para o metabolismo e também ao acúmulo de metabólitos secundários que geram inibição da enzima, principalmente acúmulo de glicose e celobiose (FLACHNER e RÉCZEY, 2004; LESCHINE, 1995).

5.2 Planejamento Fatorial Experimental

O Planejamento Fatorial Experimental DCCR foi utilizado para avaliar a influência da composição do meio de cultivo D na produção das celulases pelo fungo de ambiente marinho *T. lixii* - 5A7. As amostras foram coletadas nos dias 13, 14, 15 e 16, seguindo a matriz descrita na Tabela 12. Cada ensaio foi realizado na temperatura de 20°C e avaliado por sextuplicada quanto à atividade das enzimas e da quantidade de proteínas totais.

Tabela 12. Matriz DCCR do meio de cultivo D em g/L

Nº de Ensaio	Glicose (X1)	KH ₂ PO ₄ (X2)	YNB (X3)	CMC (X4)
1	6,00	3,00	4,70	12,50
2	14,00	3,00	4,70	12,50
3	6,00	5,00	4,70	12,50
4	14,00	5,00	4,70	12,50
5	6,00	3,00	8,70	12,50
6	14,00	3,00	8,70	12,50
7	6,00	5,00	8,70	12,50
8	14,00	5,00	8,70	12,50
9	6,00	3,00	4,70	27,50
10	14,00	3,00	4,70	27,50
11	6,00	5,00	4,70	27,50
12	14,00	5,00	4,70	27,50
13	6,00	3,00	8,70	27,50
14	14,00	3,00	8,70	27,50
15	6,00	5,00	8,70	27,50
16	14,00	5,00	8,70	27,50
17	2,00	4,00	6,70	20,00
18	18,00	4,00	6,70	20,00
19	10,00	2,00	6,70	20,00
20	10,00	6,00	6,70	20,00
21	10,00	4,00	2,70	20,00
22	10,00	4,00	10,70	20,00
23	10,00	4,00	6,70	5,00
24	10,00	4,00	6,70	35,00
*25	10,00	4,00	6,70	20,00
*26	10,00	4,00	6,70	20,00
*27	10,00	4,00	6,70	20,00

* Os ensaios 25,26 e 27 correspondem a triplicata do ponto central

Nas Figuras 7, 8, 9 e 10 temos os resultados das atividades específicas para o cultivo D que foi realizado nos dias 13, 14, 15 e 16 respectivamente, observamos que a produção das diferentes celulases nos 24 ensaios testados mostrou comportamentos variados quanto sua atividade específica comparados com o ponto central.

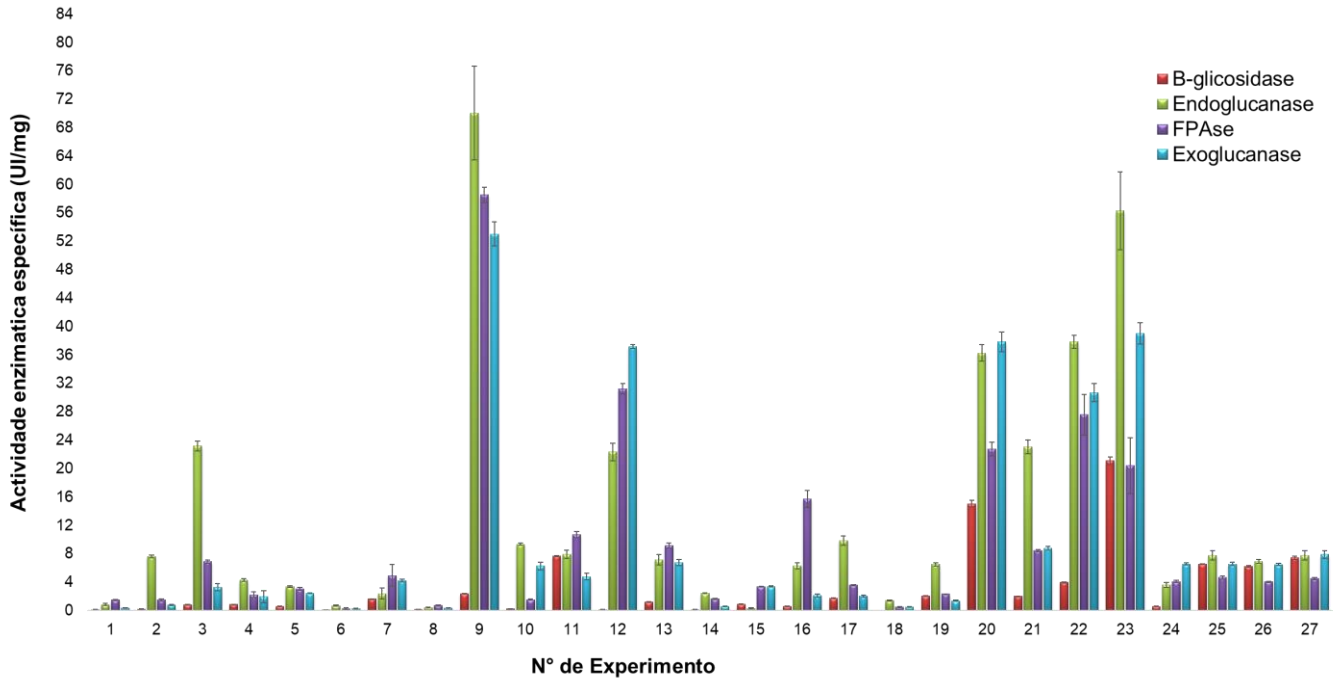


Figura 7. Atividade Específica das Celulases produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* no DCCR de 27 ensaios no dia 13.

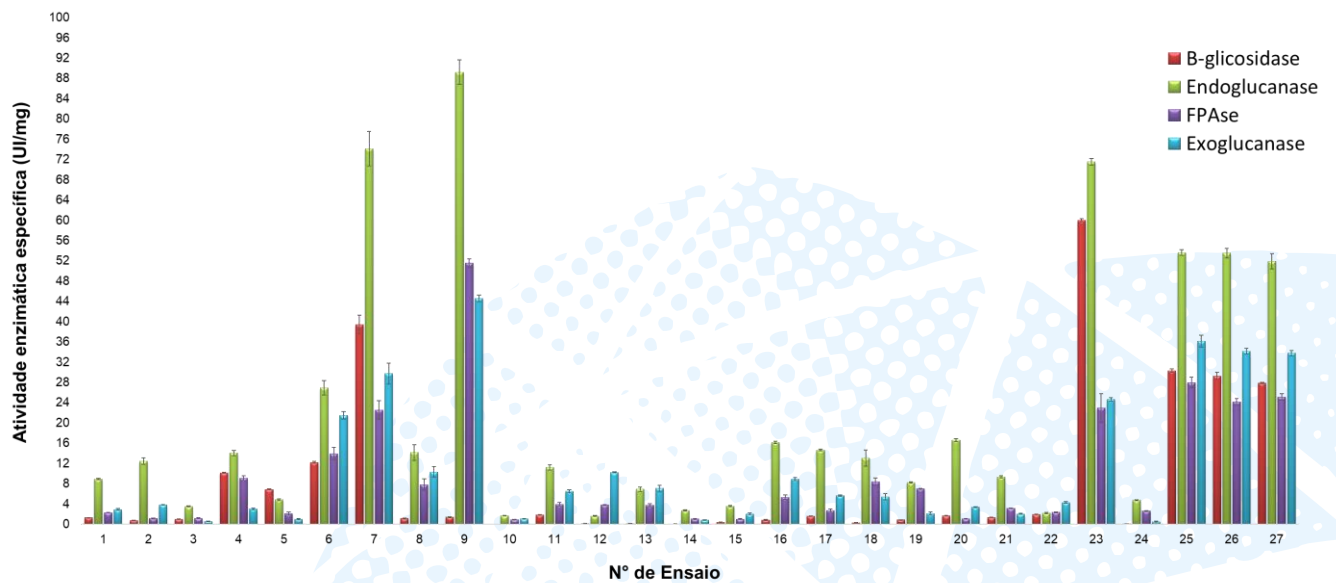


Figura 8. Atividade Específica das Celulases produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* no DCCR de 27 ensaios no dia 14.

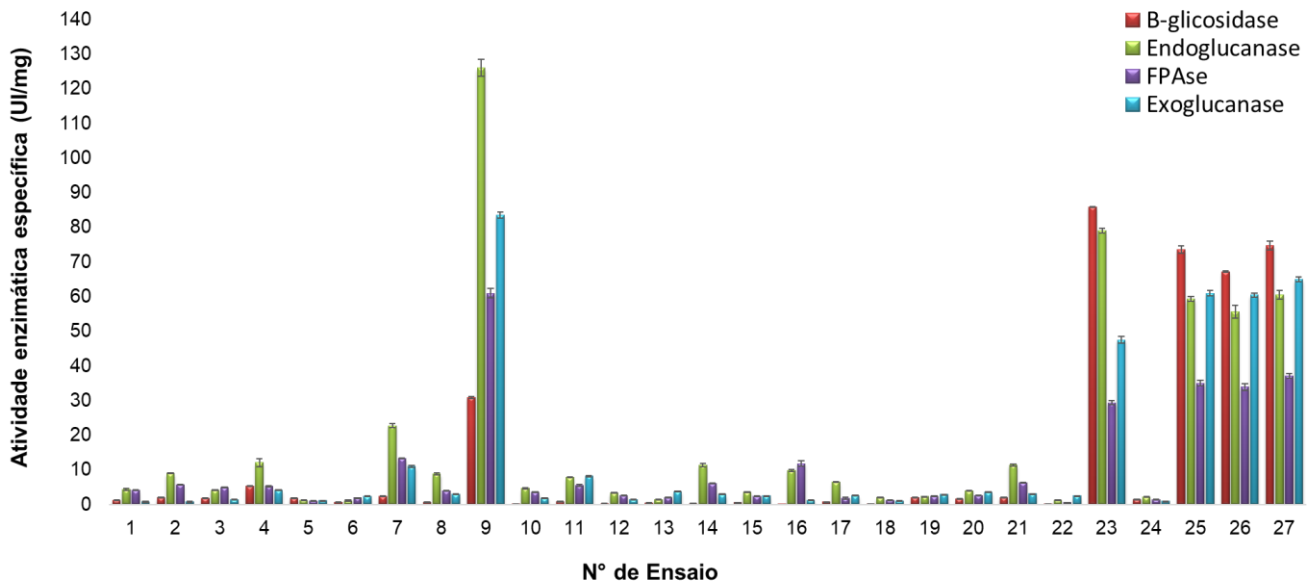


Figura 9. Atividade Específica das Celulases produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* no DCCR de 27 ensaios no dia 15.

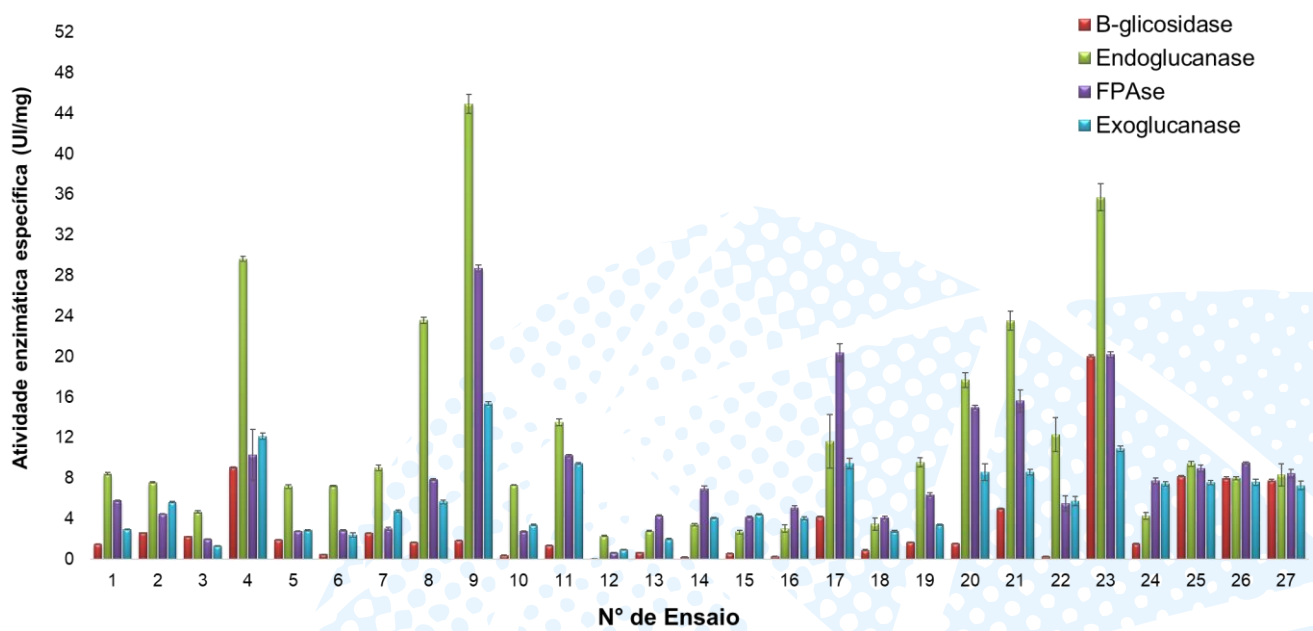


Figura 10. Atividade Específica das Celulases produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* no DCCR de 27 ensaios no dia 16.

Nas figuras mostradas anteriormente observamos também que as atividades específicas variam em cada ensaio o que nos indica que as concentrações dos componentes do meio D poderiam estar influenciando de maneira positiva ou negativa para a produção das enzimas celulasas pelo fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7* e observamos que os picos de maior produção das celulasas foram nos ensaios 9 e 23 para os quatro dias testados (Tabela 13) e entre esses dias comparando os ensaios 9 e 23 a produção das celulasas foi maior no dia 15 (Tabela 14).

Tabela 13. Atividade Específica das celulasas dos ensaios 9 e 23 do DCCR para os quatro dias de cultivo.

Dia	Ensaio	β -Glicosidase	endoglucanase	FPase	exoglucanase
13	9	2,39 \pm 0,03 ^a	70,07 \pm 6,62 ^c	58,55 \pm 1,08 ^d	53,03 \pm 1,67 ^f
14	9	1,41 \pm 0,11 ^a	89,24 \pm 2,41 ^d	51,58 \pm 0,80 ^e	44,62 \pm 0,65 ^e
15	9	30,90 \pm 0,25 ^c	125,99 \pm 2,49 ^e	60,94 \pm 1,40 ^f	83,60 \pm 0,90 ^g
16	9	1,84 \pm 0,03 ^a	44,95 \pm 0,95 ^b	28,73 \pm 0,29 ^c	15,36 \pm 0,17 ^b
13	23	21,09 \pm 0,55 ^b	56,28 \pm 5,50 ^b	20,40 \pm 3,96 ^a	39,05 \pm 1,49 ^d
14	23	59,99 \pm 0,31 ^d	71,56 \pm 0,62 ^c	22,93 \pm 2,82 ^b	24,66 \pm 0,36 ^c
15	23	85,91 \pm 0,14 ^e	79,00 \pm 0,64 ^c	29,41 \pm 0,56 ^c	47,54 \pm 0,99 ^e
16	23	20,04 \pm 0,13 ^b	35,71 \pm 1,34 ^a	20,20 \pm 0,28 ^a	10,91 \pm 0,28 ^a

A atividade enzimática específica está expressa em UI/mg. Médias \pm desvio-padrão seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 95% de confiança ($p < 0,05$), utilizando o programa Statgraphics 19 (Apêndice E).

Tabela 14. Atividade Específica das Celulasas produzidas pelo fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7* no DCCR de 27 ensaios para o dia 15.

Nº de Ensaio	β -Glicosidase	endoglucanase	FPase	exoglucanase
1	1,29 \pm 0,02	4,36 \pm 0,21	4,10 \pm 0,09	0,76 \pm 0,13
2	2,02 \pm 0,04	8,99 \pm 0,09	5,78 \pm 0,13	0,78 \pm 0,19
3	1,86 \pm 0,03	4,19 \pm 0,10	4,96 \pm 0,07	1,47 \pm 0,10
4	5,29 \pm 0,08	12,08 \pm 1,16	5,25 \pm 0,15	4,15 \pm 0,17
5	1,92 \pm 0,05	1,33 \pm 0,06	1,07 \pm 0,06	1,16 \pm 0,02
6	0,76 \pm 0,01	1,12 \pm 0,24	1,95 \pm 0,06	2,40 \pm 0,03
7	2,38 \pm 0,10	22,74 \pm 0,63	13,33 \pm 0,18	10,99 \pm 0,29

8	0,75 ± 0,01	8,79 ± 0,32	4,02 ± 0,07	3,03 ± 0,06
9	30,90 ± 0,25	125,99 ± 2,49	60,94 ± 1,40	83,60 ± 0,90
10	0,09 ± 0,01	4,68 ± 0,16	3,63 ± 0,09	1,91 ± 0,07
11	0,91 ± 0,04	7,81 ± 0,12	5,53 ± 0,23	8,21 ± 0,21
12	0,30 ± 0,03	3,39 ± 0,17	2,64 ± 0,05	1,49 ± 0,02
13	0,50 ± 0,01	1,52 ± 0,07	2,05 ± 0,04	3,80 ± 0,03
14	0,28 ± 0,02	11,36 ± 0,47	6,04 ± 0,10	2,91 ± 0,10
15	0,64 ± 0,01	3,63 ± 0,09	2,39 ± 0,04	2,53 ± 0,03
16	0,07 ± 0,01	9,84 ± 0,31	11,83 ± 0,80	1,33 ± 0,08
17	0,77 ± 0,01	6,56 ± 0,08	1,85 ± 0,31	2,57 ± 0,06
18	0,20 ± 0,01	2,03 ± 0,06	1,26 ± 0,06	1,03 ± 0,07
19	2,12 ± 0,03	2,33 ± 0,05	2,34 ± 0,09	2,95 ± 0,03
20	1,69 ± 0,02	4,03 ± 0,04	2,71 ± 0,06	3,61 ± 0,04
21	2,05 ± 0,03	11,40 ± 0,30	6,38 ± 0,04	3,15 ± 0,03
22	0,18 ± 0,01	1,29 ± 0,03	0,57 ± 0,03	2,56 ± 0,05
23	85,91 ± 0,14	79,00 ± 0,64	29,41 ± 0,56	47,54 ± 0,99
24	1,52 ± 0,01	2,19 ± 0,08	1,48 ± 0,05	1,01 ± 0,03
25	73,59 ± 1,03	59,33 ± 0,72	35,03 ± 0,77	60,96 ± 0,83
26	67,24 ± 0,16	55,65 ± 1,88	33,93 ± 0,93	60,43 ± 0,52
27	74,83 ± 1,26	60,54 ± 1,30	37,08 ± 0,72	64,92 ± 0,68

A atividade enzimática específica está expressa em UI/mg.

Na Tabela 14 observamos que para o ensaio 9 há uma grande diferença da atividade específica das enzimas EnG, FPAse e ExG com 125, 99 UI/mg; 60,94 UI/mg e 83,60 UI/mg respectivamente comparados com seus pontos centrais. Esses resultados indicam que as diferentes concentrações dos componentes do meio D influenciaram na atividade específica. Ao realizar a análise de ANOVA obtivemos um p valor menor do que 0,05 para cada uma das celulasas, sugerindo que existe diferença significativa entre os diferentes ensaios e por tanto foi realizado o teste de Tukey para determinar entre quais ensaios existe uma diferença significativa (Apêndice F).

Para a enzima BG no ensaio 23 obtivemos 85,91 UI/mg que apresentou 1,20 vezes mais atividade do que o ponto central. Na matriz que foi seguida para realizar

o DCCR (Tabela 12) vemos que a grande diferença entre o ensaio 23 do dia 15 com os pontos centrais é a concentração de CMC, 4 vezes menor que nos pontos centrais, o que poderia indicar que ao ter menor concentração de CMC, produz menor quantidade de açúcar redutor, no caso seria glicose, diminuindo assim a repressão catabólica que a enzima β -Glicosidase poderia sofrer (FLACHNER e RÉCZEY, 2004; LESCHINE, 1995). Ao realizar a análise de ANOVA e o teste de Tukey para a BG nos 27 ensaios, se encontraram 14 grupos homogêneos a um nível de 95% de confiança (Apêndice F).

Nas Figuras 11, 12 13 e 14 estão apresentados os diagramas de Pareto das análises feitas pelo Software Protimiza Experimental Design das enzimas β -glicosidase, endoglucanase, FPAse e exoglucanase no dia 15, respectivamente, assim como as Tabelas 15;16;17;18 que demonstram os efeitos e análise estatística.

Tabela 15. Análise do DCCR pelo Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica β -glicosidase de *Trichoderma lixii-5A7*.

Nome	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p- valor 0,05
Média	71,89	8,57	8,39	0,0000
Glicose (x_1)	-19,30	3,21	-6,01	0,0000
KH ₂ PO ₄ (x_2)	-18,94	3,21	-5,89	0,0000
YNB (x_3)	-19,14	3,21	-5,96	0,0000
CMC (x_4)	-8,49	3,21	-2,64	0,0149

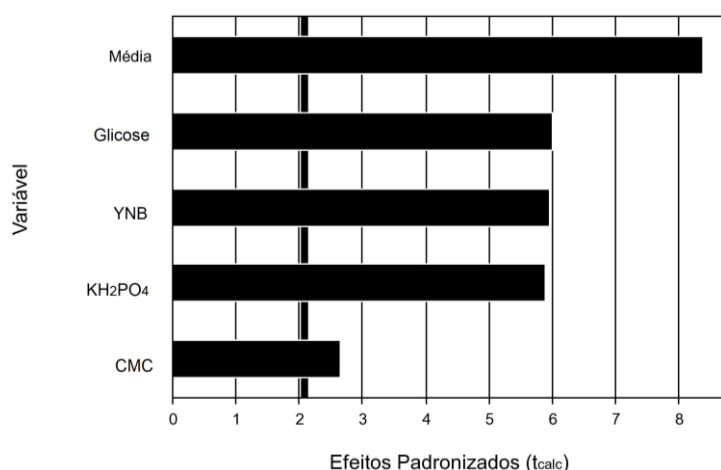


Figura 11. Diagrama de Pareto da Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica β -glicosidase de *Trichoderma lixii-5A7*.

O planejamento DCCR realizado foi utilizado visando-se avaliar as condições do meio de cultivo, permitindo o conhecimento da atividade específica e a relação dos componentes do meio que podem resultar em um possível aumento da atividade enzimática. Em relação a atividade da β -Glicosidase, estatisticamente sua produção pelo fungo *Trichoderma lixii-5A7* apresentou como variáveis significativas os quatro componentes do meio D no dia 15 (Tabela 15). Conforme o diagrama de Pareto desta linhagem (Figura 11), todas as variáveis significativas mostraram efeito negativo no processo, o que sugere que podem ter suas concentrações reduzidas para melhores atividades. Cabe mencionar que variáveis significativas são aquelas que apresentaram *p-value* igual ou menor que o nível de significância estabelecido pelo pesquisador, que no trabalho aqui mencionado foi adotado como 0,05 (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Tabela 16. Análise do DCCR pela Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica endoglucanase de *Trichoderma lixii-5A7*.

Nome	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor 0,05
Média	58,51	15,93	3,67	0,0013
Glicose (x_1)	-13,41	5,97	-2,24	0,0352
KH ₂ PO ₄ (x_2)	-13,68	5,97	-2,29	0,0319
YNB (x_3)	-12,89	5,97	-2,16	0,0420
CMC (x_4)	-4,33	5,97	-0,73	0,4759

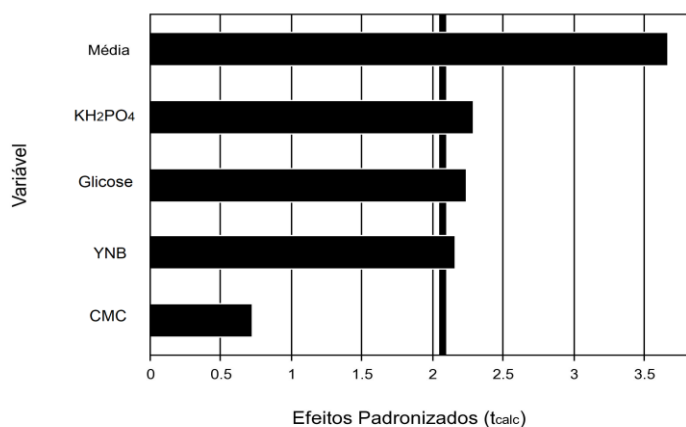


Figura 12. Diagrama de Pareto da Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica endoglucanase de *Trichoderma lixii-5A7*.

Tabela 17. Análise do DCCR pela Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica FPase de *Trichoderma lixii-5A7*.

Nome	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p- valor 0,05
Média	35,35	7,34	4,82	0,0001
Glicose (x_1)	-7,99	2,75	-2,90	0,0082
KH_2PO_4 (x_2)	-7,75	2,75	-2,82	0,0101
YNB (x_3)	-7,51	2,75	-2,73	0,0122
CMC (x_4)	-4,52	2,75	-1,64	0,1146

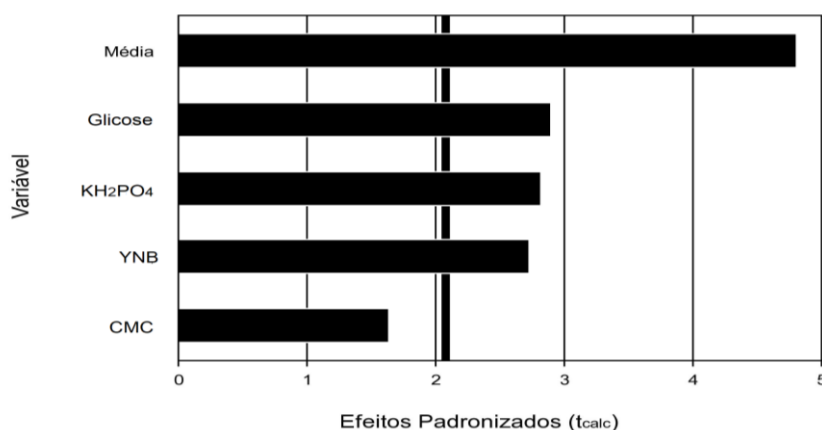


Figura 13. Diagrama de Pareto da Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica FPase de *Trichoderma lixii-5A7*.

Uma avaliação da análise dos efeitos na produção das endoglucanases (Tabela 16, Figura 12) e FPase (Tabela 17, Figura 13) pelo fungo de ambiente marinho, permitiu observar que as principais variáveis significativas foram as concentrações de Glicose, KH_2PO_4 e YNB com efeito negativo, ou seja, para uma melhor produção das enzimas e com maior atividade específica, a concentração utilizada de tais variáveis poderia ser diminuída.

Tabela 18. Análise do DCCR pela Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica exoglucanase de *Trichoderma lixii-5A7*.

Nome	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p- valor 0,05
Média	62,10	10,50	5,91	0,0000
Glicose (x_1)	-15,06	3,94	-3,82	0,0009
KH_2PO_4 (x_2)	-14,68	3,94	-3,73	0,0012
YNB (x_3)	-14,79	3,94	-3,76	0,0011
CMC (x_4)	-9,44	3,94	-2,40	0,0255

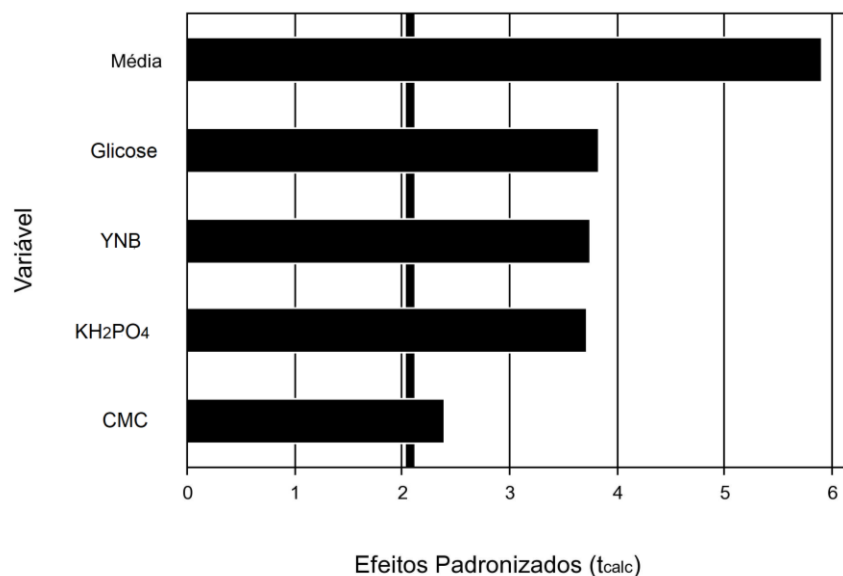


Figura 14. Diagrama de Pareto da Análise do Planejamento Experimental Protimiza da Atividade Específica exoglucanase de *Trichoderma lixii-5A7*.

Os efeitos de cada variável exercidos sobre a atividade enzimática específica exoglucanase são apresentados na tabela 18 e pelo diagrama de Pareto (Figura 14). Todos os componentes do meio foram estatisticamente significativos e com efeitos negativos, indicando que para ter uma maior atividade da exoglucanase, as concentrações dos componentes poderiam ser diminuídas.

Comparando-se as atividades obtidas no meio de cultivo D nos ensaios 9 e 23 com aquelas observadas no cultivo sem a influência das variáveis, pode-se observar um aumento de 1,20; 2,15; 1,72 e 1,35 vezes nas atividades β -glicosidase (71,89 para 85,91 UI/mg), endoglucanase (58,51 para 125,99 UI/mg), FPAse (35,35 para 60,94 UI/mg) e exoglucanase (62,10 para 83,60 UI/mg), respectivamente.

Como citado anteriormente nesta etapa do trabalho, as condições de cultivo influenciaram o crescimento e no metabolismo do fungo de ambiente marinho. Conseqüentemente, o estudo destas condições seria de grande importância para melhorar a produção das celulases.

Posteriormente, dos ensaios apresentados na Tabela 14, foram selecionados os que deram uma maior atividade celulolítica, no caso foram os ensaios 9 e 23, no

dia 15 na temperatura de 20°C e foi realizada uma nova fermentação modificando as concentrações do componente YNB como se mostra na tabela 19, com a finalidade de observar alguma alteração na atividade das enzimas celulolíticas visto que nos resultados anteriores os efeitos desta variável poderiam ser diminuídos para obter uma melhora na produção das enzimas e também poder reduzir impacto económico visto que os componentes utilizados, YNB representam um maior custo para a produção das enzimas.

Tabela 19. Experimentos realizados para os ensaios 9 e 23 modificando as concentrações do componente YNB do meio D.

Ensaio	Nº de Condição	Glicose	KH ₂ PO ₄	YNB	CMC
9	0	0,900	0,450	0,705	4,125
9	0	0,900	0,450	0,705	4,125
9	1	0,900	0,450	0,353	4,125
9	2	0,900	0,450	0,176	4,125
9	3	0,900	0,450	0,088	4,125
9	4	0,900	0,450	0,044	4,125
9	5	0,900	0,450	0,000	4,125
23	0	1,500	0,600	1,005	0,750
23	0	1,500	0,600	1,005	0,750
23	1	1,500	0,600	0,503	0,750
23	2	1,500	0,600	0,251	0,750
23	3	1,500	0,600	0,126	0,750
23	4	1,500	0,600	0,063	0,750
23	5	1,500	0,600	0,000	0,750

* As concentrações dos componentes estão em g/150 mL

* Os experimentos com numeração 0 correspondem as condições 9 e 23 propriamente ditas (sem modificações).

Nas Figuras 15 e 16 temos os resultados das atividades específicas para os ensaios otimizados 9 e 23 respectivamente realizados no dia 15, observamos que a produção das diferentes celulasas nas 10 condições testadas mostrou comportamentos variados quanto sua atividade específica comparados com o ponto central (Condição 0).

Ensaio 9

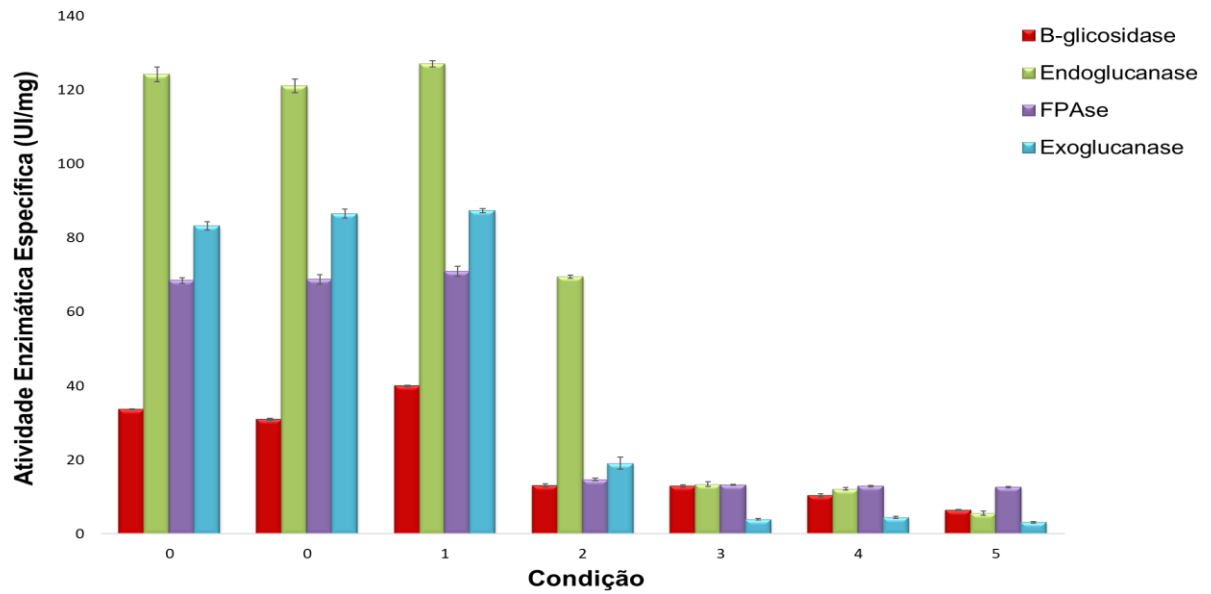


Figura 15. Atividade Específica das Celulasas nas diferentes condições (modificando as concentrações do componente YNB) produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* no ensaio 9.

Ensaio 23

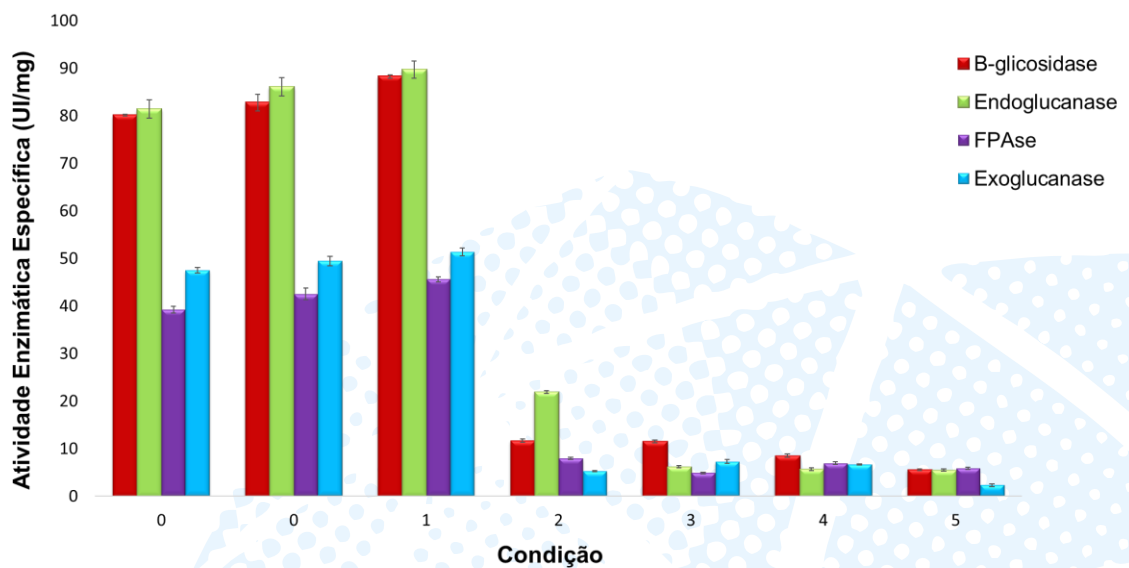


Figura 16. Atividade Específica das Celulasas nas diferentes condições (modificando as concentrações do componente YNB) produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* no ensaio 23.

Os resultados obtidos mostraram um pequeno aumento na atividade específica das celulasas na condição 1 produzidas pelo fungo *Trichoderma lixii-5A7* para ambos ensaios no dia 15 na temperatura de 20°C, comparado ao ponto central, obtendo uma atividade específica de 126,97 UI/mg; 70,96 UI/mg e 87,30 UI/mg para endoglucanase, FPase e exoglucanase respectivamente no ensaio 9 e 88,22 UI/mg para β -glicosidase no ensaio 23 (Tabela 20).

Tabela 20. Atividade Específica das Celulasas produzidas pelo fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7* nos ensaios 9 e 23 nas diferentes condições.

Ensaio	Nº Condição	B-glicosidase	endoglucanase	FPase	exoglucanase
9	0	33,58±0,16 ^c	124,22±1,98 ^h	68,43±0,76 ^g	83,27±1,11 ⁱ
9	0	30,88±0,28 ^c	121,06±1,78 ^g	68,79±1,29 ^g	86,49±1,21 ^j
9	1	39,93±0,22 ^d	126,97±0,86ⁱ	70,96±1,39^h	87,30±0,58^j
9	2	13,09±0,46 ^{ab}	69,47±0,39 ^d	14,66±0,35 ^c	19,04±1,62 ^e
9	3	12,88±0,35 ^{ab}	13,39±0,66 ^b	13,27±0,13 ^c	3,91±0,23 ^{ab}
9	4	10,35±0,46 ^a	12,10±0,37 ^b	12,88±0,21 ^c	4,41±0,32 ^b
9	5	6,37±0,15 ^a	5,56±0,50 ^a	12,60±0,18 ^c	3,09±0,23 ^a
23	0	80,08±0,15 ^e	81,37±1,90 ^e	39,22±0,67 ^d	47,49±0,63 ^f
23	0	82,77±1,76 ^e	86,05±1,90 ^f	42,48±1,23 ^e	49,47±0,99 ^g
23	1	88,22±0,30^f	89,63±1,80 ^f	45,59±0,54 ^f	51,31±0,83 ^h
23	2	11,70±0,33 ^{ab}	21,92±0,28 ^c	7,92±0,25 ^b	5,29±0,13 ^c
23	3	11,52±0,27 ^{ab}	6,20±0,22 ^a	4,84±0,17 ^a	7,27±0,44 ^d
23	4	8,50±0,34 ^a	5,70±0,29 ^a	6,91±0,32 ^b	6,68±0,12 ^d
23	5	5,59±0,19 ^a	5,49±0,26 ^a	5,84±0,19 ^a	2,29±0,29 ^a

A atividade enzimática específica está expressa em UI/mg. Médias \pm desvio-padrão seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 95% de confiança ($p < 0,05$), utilizando o programa Statgraphics 19 (Apêndice G).

Os resultados obtidos serviram para poder selecionar a condição favorável do meio otimizado para ser utilizado na produção das celulasas em escala de biorreator, os ensaios selecionados foram 9 e 23 ambos na condição 1.

5.3 Produção das celulases em escala de Biorreator

O fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7* teve a capacidade de produzir celulases em um biorreator de 3L de volume de trabalho na condição selecionada (ensaio 9/condição1 e 23/condição 1). A cinética de produção de celulase na fermentação submersa apresentou alta atividade enzimática específica após 120 horas de fermentação (BG 88,71 UI/mg; EnG 97,31 UI/mg; FPAse 71,10 UI/mg e ExG 66,71 UI/mg) para o ensaio 9 (Figura 17) e 96 horas de fermentação (BG 100,53 UI/mg; EnG 84,33 UI/mg; FPAse 52,00 UI/mg e ExG 46,29 UI/mg) para o ensaio 23 (Figura 18). Com esses resultados observarmos que o fungo *Trichoderma lixii-5A7* conseguiu picos de maior produção no tempo menor para os ensaios 9 e 23 comparados com os que obtivemos na escala de bancada (Tabela 11).

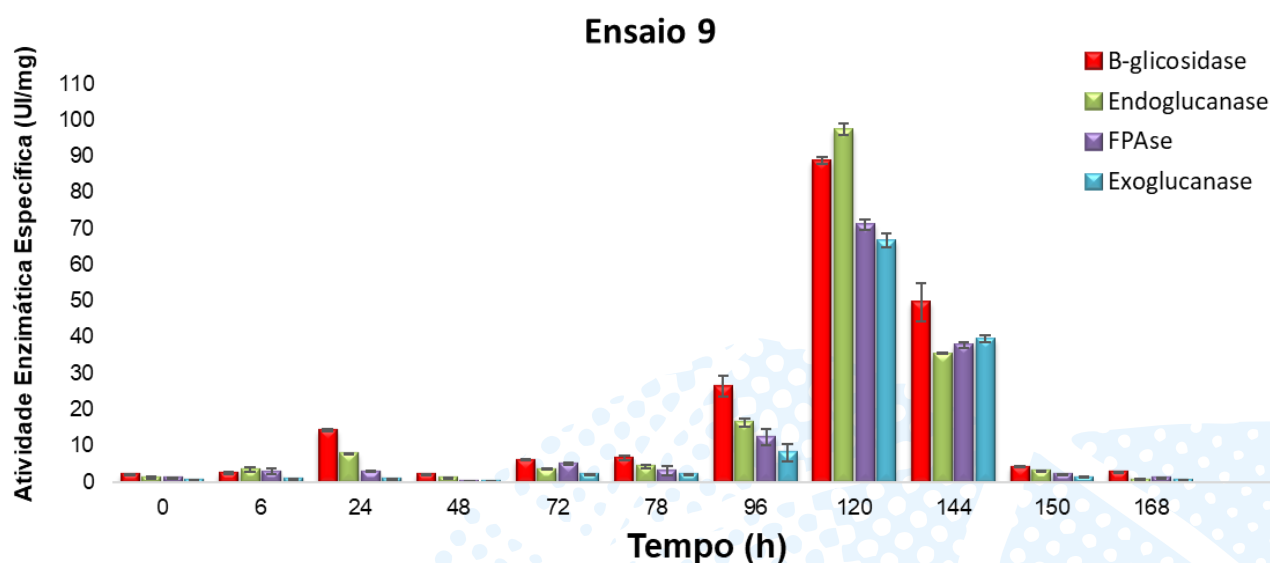


Figura 17. Atividade Específica das Celulases produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* no ensaio 9 utilizando o biorreator TECNAL com volume de trabalho de 3L.

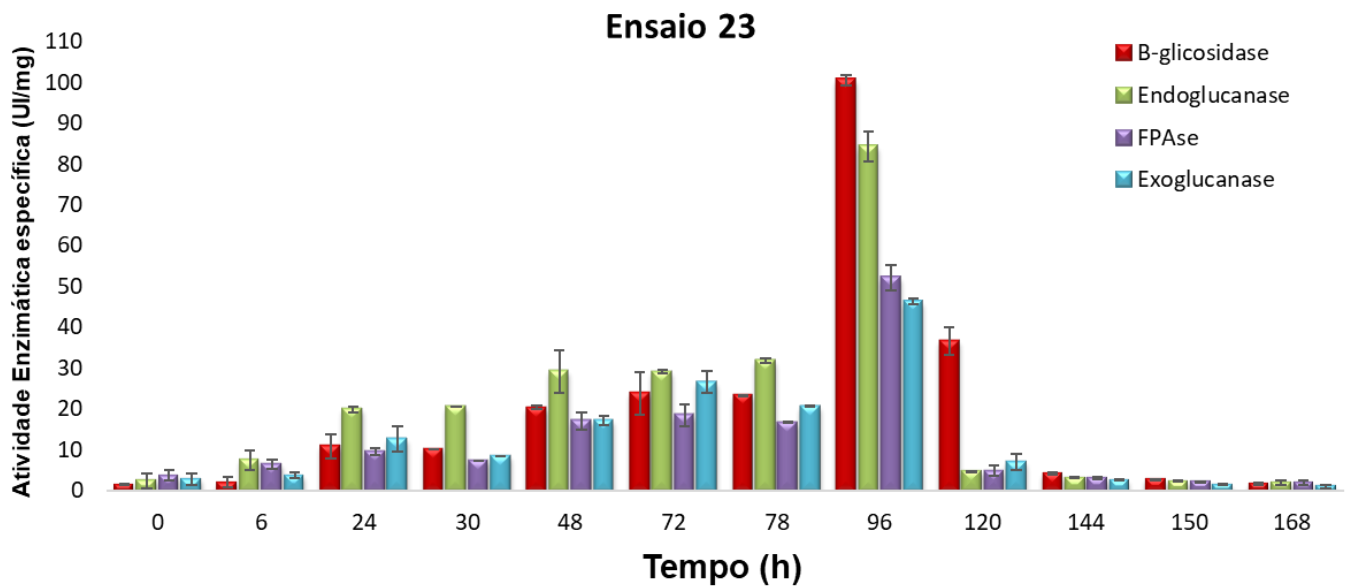


Figura 18. Atividade Específica das Celulases produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* no ensaio 23 utilizando o biorreator TECNAL com volume de trabalho de 3L.

Ao realizar a fermentação no biorreator também observamos o crescimento do fungo *Trichoderma lixii-5A7* em forma de micélios dispersos para ambos ensaios (9 e 23), o que poderia ter influenciado na produção das enzimas. Segundo Gibbs, Serviour e Schmis (2000) e Musoni et al. (2015), os fungos filamentosos podem crescer em formato de *pellets* ou em filamentos miceliais dispersos, sendo a morfologia uma característica particular à produção de metabólitos. Esta morfologia pode ser influenciada pela aeração no sistema de fermentação e pela intensidade de agitação, de acordo com Zheng et al., (2002) e Musoni et al., (2015) a aeração influencia no crescimento celular e na produção enzimática, enquanto a agitação pode causar fragmentação das células, assim como variações na morfologia de crescimento, refletindo na produção de metabólitos.

5.4 Dosagem de atividade das enzimas proteolíticas

Como observamos que o fungo de ambiente marinho *T. lixii-5A7* é promissor para produção de celulases e pouco estudado para produção de enzimas, realizamos uma cinética nas temperaturas de 20 e 30 °C utilizando o meio D, com o

intuito de avaliar a produção de proteases por período de 16 dias em paralelo com a produção das celulasas e poder também observar se ocorreu alguma influência da produção de proteases sobre a produção das celulasas.

Os resultados mostraram que o fungo *T. lixii-5A7* produz proteases com um pico de maior produção de 6,33 UI/mg e 11,09 UI/mg para a temperatura de 30°C (Figura 19) e 20°C (Figura 20) respectivamente. Ambas atividades foram obtidas no oitavo dia de produção.

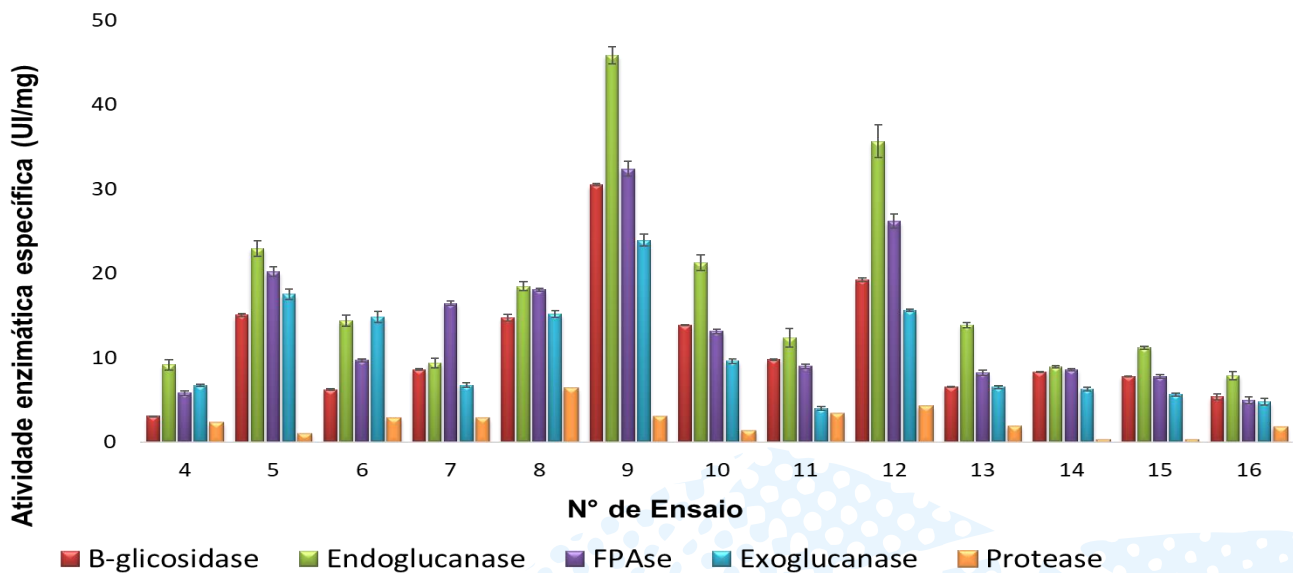


Figura 19. Atividade Específica das enzimas produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* na temperatura de 30°C no período de 16 dias.

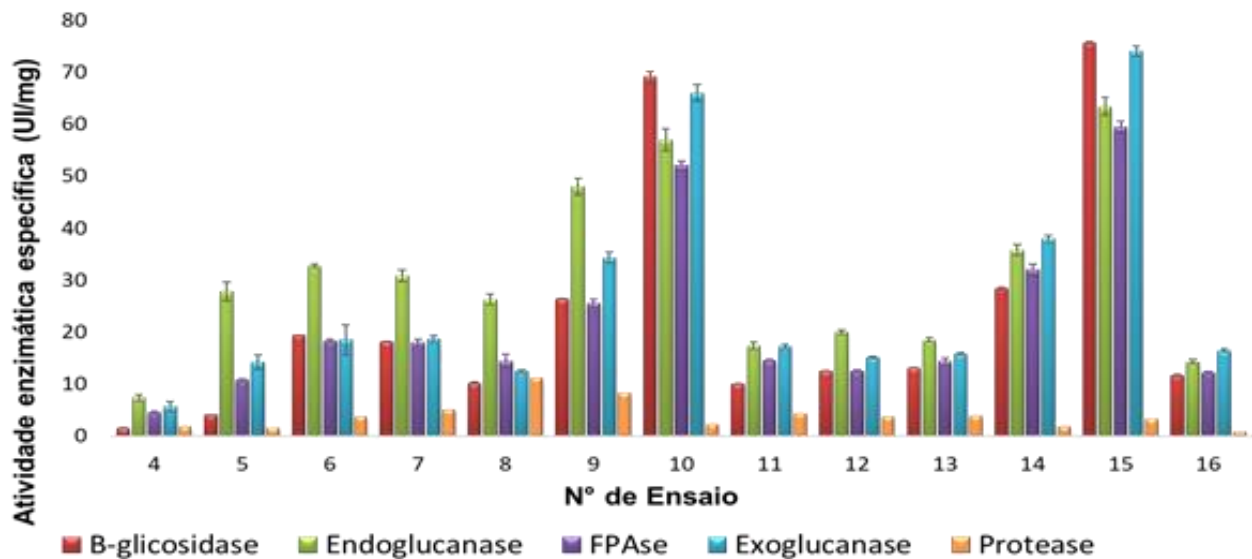


Figura 20. Atividade Específica das enzimas produzidas por *Trichoderma lixii-5A7* na temperatura de 20°C no período de 16 dias

Podemos observar com os nossos resultados que a produção de proteases não afetou as atividades celulolíticas do fungo *T.lixii-5A7*. Mesmo o meio D não sendo o meio otimizado para a produção de proteases, conseguimos uma atividade proteolítica considerável de 11,09 UI/mg comparada com alguns trabalhos na literatura, que avaliam a composição do meio de cultivo na produção das proteases. Como exemplo o estudo realizado por Hajji et al. (2008) avaliou a influência de um diferente meio de cultivo suplementado com pó de raiz de *Mirabilis jalapa* para a produção de proteases pelo fungo *Aspergillus clavatus* ES1 onde foi observado que a atividade máxima antes da otimização do meio de cultivo era de aproximadamente 0,276 UI/mg e depois da otimização fornecida pela análise de Plackett-Burman passou a ser 4,415 UI/mg. Outro estudo feito por Belmessikh et al. (2013) avaliou a produção de proteases *A. oryzae* NRRL 2220, obtendo atividade máxima de 2,156 U/mg em 96 horas de cultivo.

5.5 Extração de RNA total e síntese do cDNA

A integridade do RNA total extraído com o tampão RLC foi verificada realizando a eletroforese desnaturante em gel de agarose 1,2% (Figura 21), onde podemos observar duas bandas, a primeira que corresponde à subunidade 28S de rRNA que apresenta maior intensidade que a segunda banda que corresponde à subunidade 18S.

A qualidade e quantificação do RNA total extraído foi verificada por meio de medidas de densidade óptica em espectrofotômetro, a estimativa da pureza do RNA total extraído pelo valor da relação entre 260/230 nm e 260/280 nm foi acima de 1,8 (Tabela 21).

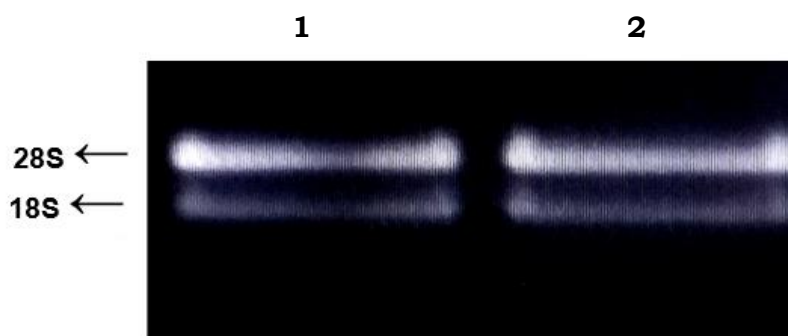


Figura 21. Confirmação de RNA total extraído. Eletroforese desnaturante em gel de agarose (1,2%) de RNA total extraído do micélio do fungo *Trichoderma lixii-5A7* nas condições selecionadas previamente; amostra 1 corresponde ao ensaio 9 (345ng/ μ l) e 2 ao ensaio 23 (764 ng/ μ l).

Tabela 21. Qualidade e quantificação do RNA total extraído do micélio do fungo *Trichoderma lixii-5A7* nos ensaios previamente selecionados.

Ensaio	260/280 nm	260/230 nm	Quantificação (ng/ μ L)
9	2,2	1,9	345
23	2,2	2,2	764

A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese desnaturante em gel de agarose, observando-se uma banda referente à subunidade 28S, de intensidade

maior que a banda correspondente à subunidade 18S, não deve aparecer bandas acima da subunidade 28S pois indicam contaminação e deve existir pouco arraste abaixo e entre as duas bandas, pois indicam a degradação do RNA (FARRELL, 2017).

Para estimar a pureza do RNA extraído, é fundamental observar a relação de absorvância entre ácidos nucleicos e proteínas (260/280 nm) e entre ácidos nucleicos e polissacarídeos, fenol ou sais (260/230 nm), que deve estar entre 1,8 a 2,2, indicando que a presença desses contaminantes está em nível insignificante.

Após obtenção de RNA total e verificação da integridade e qualidade adequada, procedeu-se à síntese de cDNA a partir de RNA total utilizando o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription". Os cDNA resultantes (cDNA9 e cDNA23) foram utilizados como molde nas reações de PCR.

A qualidade de amplificação do cDNA total obtido pode ser observada na Figura 22 em que a presença de um arraste de ácido nucleico (poços 2 e 3), sem formação de bandas nítidas, confirma a transcrição reversa de mRNAs de variados tamanhos.

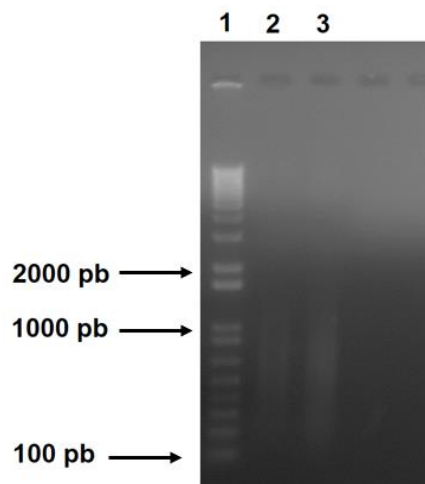


Figura 22. Síntese de cDNA, 1: Marcador de peso molecular 1Kb plus, 2 e 3: cDNA sintetizado dos ensaios 9 e 23 respectivamente.

5.6 Desenho dos iniciadores (*primers*) para PCR

Com a busca no banco de dados referente as sequências de aminoácidos e nucleotídeos das enzimas celulolíticas utilizando as palavras chaves descritas no item 4.10, foram selecionadas as sequências dos microrganismos apresentados na Tabela 22 para análise de regiões conservadas de aminoácidos para o desenho de primers degenerados que pudessem abranger sequências de diferentes linhagens, principalmente do gênero *Trichoderma* e *Hypocrea*.

Tabela 22. Número de acesso do banco de dados NCBI, nomes das enzimas e microrganismos selecionados.

Número de acesso (Proteína)	Número de acesso (Nucleotídeos)	Enzima	Microrganismo
ART28553.1	KY199423.1	beta-glicosidase	<i>Trichoderma harzianum</i>
AMP46472.1	KU201604.1	beta-glicosidase	<i>Trichoderma harzianum</i>
AJC01624.1	KJ502670.1	beta-glicosidase	<i>Hypocrea</i> sp.
BAA74959.1	AB003110.1	beta-glicosidase	<i>Trichoderma reesei</i>
BAP59015.1	LC002808.1	beta-glicosidase	<i>Trichoderma reesei</i>
BAP59014.1	LC002807.1	beta-glicosidase	<i>Trichoderma reesei</i>
AHK23047.1	KF979307.1	beta-glicosidase	<i>Trichoderma reesei</i>
XP024404907.1	XM024550352.1	beta-glicosidase	<i>Trichoderma gamsii</i>
AAM77711.1	AF435068.1	endoglucanase	<i>Trichoderma citrinoviride</i>
AB093399.2	EF426722.2	endoglucanase	<i>Trichoderma virens</i>
AYN44081.1	MG702348.1	endoglucanase	<i>Trichoderma harzianum</i>
AYN44080.1	MG702347.1	endoglucanase	<i>Trichoderma harzianum</i>
AFK32784.1	JQ923478.1	endo-1,4-beta-glucanase	<i>Hypocrea lixii</i>
ACE81432.1	EU747839.1	endo-1,3(4)-beta-glucanase	<i>Hypocrea lixii</i>
QWE49772.1	MW349134.1	beta-1,3-endoglucanase	<i>Trichoderma harzianum</i>
AIK67328.1	KM001855.1	Endoglucanase (CMCase)	<i>Trichoderma harzianum</i>
CAA05375.1	AJ002397.1	beta-1,3 exoglucanase	<i>Trichoderma lixii</i>
AHK23048.1	KF992142.1	exoglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>
XP_018656467.1	XM_018810323.1	exoglucanase	<i>Trichoderma gamsii</i>
ABY19519.1	EU314718.1	beta 1,3 exoglucanase	<i>Trichoderma asperellum</i>
AAP33112.1	AY269826.1	beta-1,3-exoglucanase	<i>Trichoderma hamatum</i>

Uma vez selecionadas as sequências das celulasas, as mesmas foram agrupadas de acordo com as porcentagens de identidade a partir de regiões conservadas das sequências e estas foram alinhadas utilizando a ferramenta

CLUSTAL e a representação, por meio da ferramenta BoxShade. A Tabela 23 apresenta a porcentagem de similaridade entre as oito sequências de β -glicosidases, separadas em dois grupos e a Figura 23 e 24 representa o alinhamento entre os grupos BG1 e BG2, permitindo a visualização da região onde os primers *forward* e reverso foram desenhados. Uma vez que o alinhamento de proteínas foi realizado, levou-se em consideração para o desenho de *primers* que o código genético é degenerado e também o alinhamento das sequências de nucleotídeos referentes às sequências proteicas coletadas.

Tabela 23. Matriz das porcentagens de identidade entre as sequências proteicas do grupo da β -glicosidase.

	BG1				BG2			
	ART28553.1	AMP46472.1	BAA74959.1	AHK23047.1	BAP59014.1	BAP59015.1	AJC01624.1	XP_024404907.1
ART28553.1	100.00	100.00	81.82	83.76	38.28	37.67	37.62	34.75
AMP46472.1	100.00	100.00	81.83	83.73	38.13	37.70	37.62	34.75
BAA74959.1	81.82	81.83	100.00	97.03	38.91	38.97	38.55	36.94
AHK23047.1	83.76	83.73	97.03	100.00	38.75	38.62	38.55	34.85
BAP59014.1	38.28	38.13	38.91	38.75	100.00	44.46	41.05	40.61
BAP59015.1	37.67	37.70	38.97	38.62	44.46	100.00	48.69	47.82
AJC01624.1	37.62	37.62	38.55	38.55	41.05	48.69	100.00	51.10
XP_024404907.1	34.75	34.75	36.94	34.85	40.61	47.82	51.10	100.00

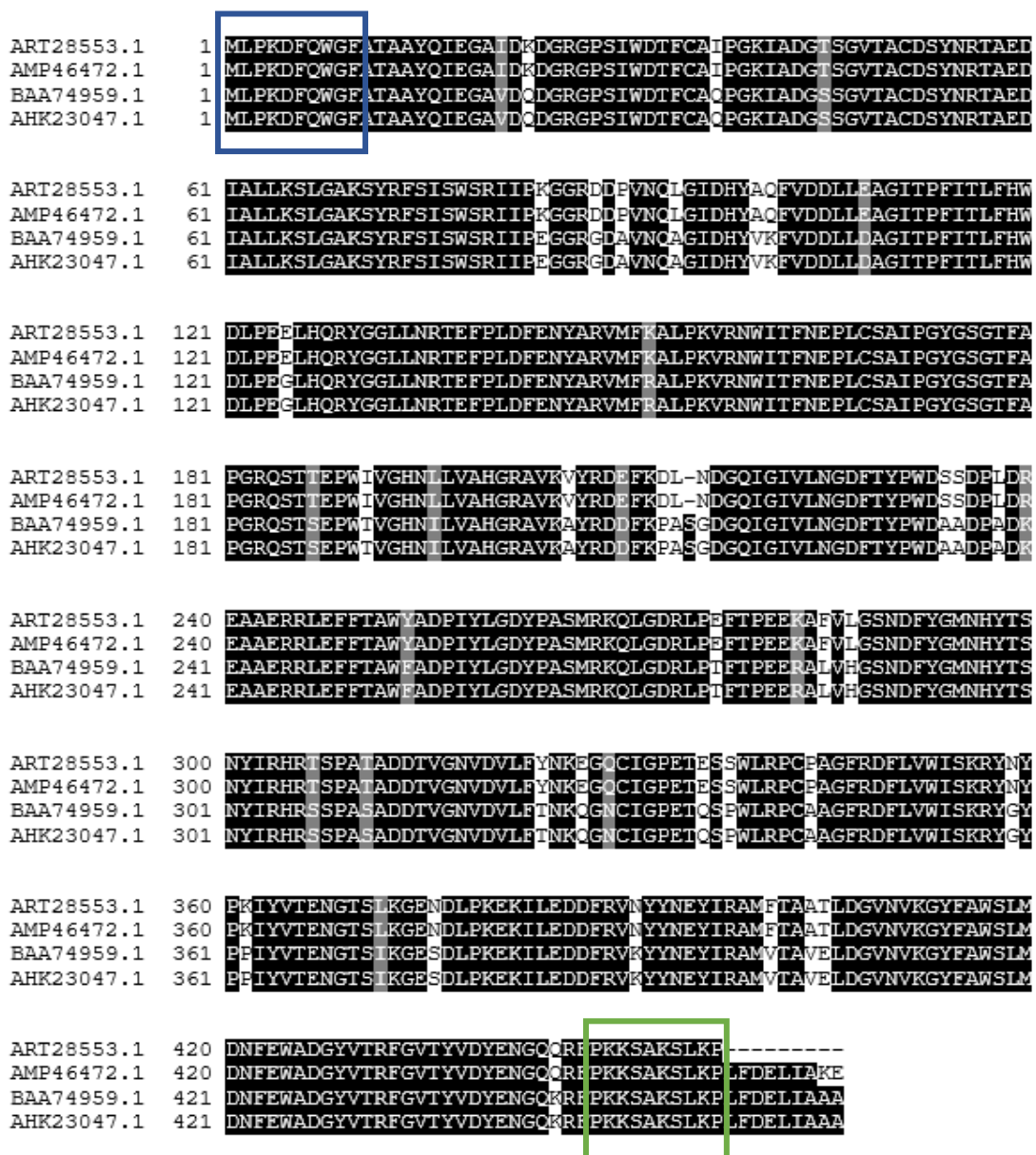


Figura 23. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo BG1. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o primer forward foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do primer reverso para serem utilizados na PCR.

BAP59014.1 1 -----
BAP59015.1 1 MTSFHDG**VKLS**STVTCVLSGLVALGSAGPTAASANAQVAA**AAAAQA**AVDPDGYVPPYPYAP
AJC01624.1 1 -----**MLMTAVAA**-----**LATA**TPFVRAGSAV
XP_024404907.1 1 -----**MRLH**TLSS**HA**-----**LP**PN**SD**PSQ-I**SLRT**-----

BAP59014.1 1 -----**MMGFDV**EDVLS**Q**LS**Q**NEK**I**ALL**S**GL**D**EW-----**HTY**PI**F**K**Y**N**V**PS**V**RL**I**
BAP59015.1 61 YGGWVED**WQ**ES**Y**TKAKAL**W**DSMT**L**A**E**K**T**NI**T**AG**T**GI**Y**M**G**ER**C**AG**N**T**G**S**A**FR**V**S**F**P**Q**LC**L**N
AJC01624.1 24 T**P**PG**S**W**A**T**A**Y**S**KA**Q**T**A**AK**L**SL**Q**DK**V**G**I**V**T**G**V**W**W**-**N**KG**F**C**V**G**N**T**S**P**A**SS**I**S**Y**P**Q**LC**L**Q
XP_024404907.1 33 H**S**N**E**NG**O**W**A**H**A**Y**R**RA**E**K**L**W**Q**MT**L**E**K**NI**T**R**G**F**Q**--**S**D**N**I**C**AG**N**T**G**S**V**PR**L**G**W**PC**M**CV**H**

BAP59014.1 45 **D**EP**N**GI**R**GT**K**FF**A**G**I**PA**A**CL**P**CG**T**AL**A**ST**W**DK**L**LL**K**K**A**G**K**L**L**G**D**E**C**T**A**K**G**A**H**C**W**L**G**P**T**I**N**
BAP59015.1 121 **D**SP**A**G**V**R**H**AD**N**VT-----**A**FD**G**I**T**VG**A**T**E**DK**L**MY**K**R**G**V**A**IG**K**EN**R**G**K**G**V**N**V**W**L**G**P**T**V**G
AJC01624.1 83 **D**SP**A**G**I**R**F**ST**G**NT-----**A**FT**P**GV**Q**A**S**T**W**LD**L**L**L**G**O**R**G**O**F**I**G**O**E**N**K**A**G**V**H**V**T**L**G**P**V**A**G**
XP_024404907.1 91 **D**AG**N**GV**R**AT**D**L**V**N-----**S**V**P**S**G**I**H**V**C**A**S**W**D**R**S**L**T**Y**E**R**G**F**Y**M**G**N**E**F**K**A**R**G**V**N**V**PL**G**P**N**A**G**

BAP59014.1 105 T-**P**R**S**PL**G**GR**G**E**F**S**F**SE**D**PY**L**SG**I**LA**A**SM**I**L**G**CE**S**T**G**VI**S**AV**K**H**F**V**A**ND**Q**E**H**E**R**-----
BAP59015.1 176 **P**L**G**R**T**PL**G**GR**N**W**E**G**F**GA**D**EW**L**Q**A**V**G**A**R**E**T**I**K**G**V**O**E**Q**G**V**I**A**T**I**K**H**F**I**G**N**E**Q**E**M**Y**R**M**Y**N**P**F**Q
AJC01624.1 138 **P**L**G**R**T**PL**G**GR**N**W**E**G**F**SP**D**PY**L**T**L**AM**A**T**I**NG**I**Q**G**AG**V**Q**A**T**A**K**H**Y**I**L**N**E**Q**E**L**N**R**-----
XP_024404907.1 146 **P**L**G**R**T**PL**G**GR**N**W**E**G**F**SV**D**PY**L**SG**L**NA**E**T**I**I**G**Q**E**AG**V**I**A**N**I**K**H**F**I**AN**E**Q**E**T**L**R**P**Y**Y**G**I**

BAP59014.1 158 **R**AV**D**CL**I**T**O**R**A**L**R**EV**L**R**P**Q**I**VAR**D**AR**P**GA**L**M**T**SY**N**K**V**NG**K**H**V**A**D**SA**E**F**L**O**G**I**L**R**T**E**W**N
BAP59015.1 236 **Y**AY**S**SN**I**DD**R**TL**H**E**V**Y**A**W**P**FA**E**GI**-**R**A**GV**G**AV**M**AY**N**AV**N**GT**A**C**S**Q**H**E**P**Y**L**MS**A**IL**K**D**E**M**G**
AJC01624.1 192 **E**SM**S**SN**A**DD**R**TL**H**E**L**Y**A**W**P**F**A**D**A**V**-**N**A**N**V**BA**V**M**C**S**Y**N**R**V**N**ST**Y**AC**E**D**T**Y**L**O**T**IL**K**N**Q**L**G**
XP_024404907.1 206 **E**AV**S**AN**I**DD**K**TL**H**E**Y**Y**L**W**P**FM**D**SV**-**R**A**GV**G**SV**M**C**S**Y**N**R**I**N**N**T**Y**G**C**K**N**D**K**L**M**NG**I**L**K**T**E**LS

BAP59014.1 218 **W**D**P**L**I**VD**S**D**W**Y**S**Y**T**I**T**I**D**A**I**K**A**GL**D**L**E**M**P**GV**S**R**Y**---**R**G**K**Y**E**S**A**L**Q**A**R**---**L**L**K**C**S**T**I**D
BAP59015.1 295 **F**Q**G**F**I**MT**D**W**L**A**H**MS**G**V**A**S**A**L**A**GL**D**M**D**MP**G**D**V**Q**I**P**F**F**G**S**Y**W**Y**E**L**T**R**S**A**L**NG**S**V**M**D**R**I**N
AJC01624.1 251 **F**Q**G**Y**V**MT**D**W**N**A**Q**H**S**T**V**Q**A**L**A**GL**D**MS**M**P**G**T**D**FN--**G**S**L**Y**W**G**S**A**L**T**N**AV**N**SN**Q**V**P**L**S**R**L**N
XP_024404907.1 265 **F**K**G**F**V**ML**D**W**N**A**Q**H**D**-**I**DS**A**E**A**GL**D**M**V**M**E**LA-----**G**A**W**G**K**N**L**T**D**A**V**A**NG**I**T**SE**A**R**V**T

BAP59014.1 271 **E**RA**R**RV**L**RF-----**A**Q**K**A**S**Y**L**K-----**V**SE**V**E**O**GR-----**D**-----**F**
BAP59015.1 355 **D**MA**T**R**I**AA**A**W**Y**K**G**OD**K**G**-**FP**A**T**N**F**D**T--**N**S**R**RA--**F**N**P**L**Y**E**A**AL**P**L**S**P**F**G**I**T**N**E**F**V**P**V**Q**
AJC01624.1 309 **D**M**A**T**R**I**L**AA**W**Y**L**G**Q**D**S**G**-**F**P**SV--**S**F**S**R**N**V**Q**S**H**N**T**N**V**R-----
XP_024404907.1 316 **D**MA**T**R**I**VA**A**W**Y**L**V**G**Q**D**E**K**F**PT**P**GV**G**I**K**Q**L**T**C**P**H**E**C**I**D**A**R**E**A**-----

BAP59014.1 298 **P**E**D**RV**L**N**R**O**I**C**G**SS**I**V**L**L**K**N**E**NS**I**L**P**L**P**K**S**V**K**K**V**A**L**V**G**S**H**V**R**L**P**A**I**SG**G**S**A**SL**W**E**Y**Y**A**I
BAP59015.1 410 **D**D**H**D**V**IAR**O**I**S**O**E**A**I**TL**L**K**N**D**G**D**I**L**P**L**S**PS**Q**H**T**-**K**V**F**G**T**D**A**O**K**-----
AJC01624.1 346 -----**S**I**A**R**D**G**I**V**L**L**K**N**T**G**N**L**L**P**L**K**T**P**S**S**T**A**-**L**I**G**S**A**T**I**V**GA**H**A-----
XP_024404907.1 359 --**S**I**P**V**I**LE**G**A**L**A**H**V**L**W**K**N**L**N**E**T**L**E**F**K**O**R**T**I**M**SV**F**G**Y**D**A**T**V**P**R**T**K**N**D**L**L**F**O**G**Y**T--

BAP59014.1 358 **S**L**Y**D**A**V**S**E**V**L**A**G**A**T**I**I**H**E**V**G**A**Y**H**Q**M**L**P**V**I**D**A**M**I**S**N**A**V**I**H**F**Y**N**D**P**I**D**V**K**D**R**K**L**L**G**S**E**N**V**S**
BAP59015.1 452 -----**N**-----**P**D**G**I**N**S**C**T
AJC01624.1 384 -----**N**N**S**A**S**C**S**
XP_024404907.1 415 -----**S**S**P**E**M**G**Q**A-----**V**L**G**D**E**A**H**F

BAP59014.1 418 **S**T**S**F**Q**L**M**D**Y**N**N**I**P**T**L**N**K**A**M**F**W**G**L**V**G**E**F**I**P**T**A**T**G**I**W**E**F**G**L**S**V**F**G**T**A**D**L**Y**I**D**N**E**L**V**I**E**N**T**I**
BAP59015.1 461 **D**R**N**-----**C**N**K**E**T**-**L**G**Q**G**W**G**S**-----**G**T**V**-----**D**Y**P**Y**I**D**D**P**I**S**A**I**T**A**E**
AJC01624.1 391 **D**H**G**-----**C**N**L**G**A**-**L**G**M**G**W**G**S**-----**G**T**A**-----**N**Y**P**Y**F**V**A**P**Y**D**A**I**N**T**K**
XP_024404907.1 431 **D**Q**A**-----**A**R**G**E**T**-**I**V**T**G**G**R**A**-----**G**A**N**-----**S**P**P**Y**I**D**D**P**L**S**A**I**O**R**R**

BAP59014.1 478 **H**Q**T**R**G**T**A**FF**G**K**-**G**I**T**E**K**-**V**A**RR**V**AG**S**TY**K**L**R**L**E**F**G**S**A**N**T**T**K**M**E**T**T**G**V**V**N**F**G**G**A**V**H**L**G**
BAP59015.1 494 **A**--**D**N**V**T**F**Y**N**I---**D**K**-**F**P**S**V**G**E**V**S**D**S**-----**D**
AJC01624.1 424 **A**--**S**S**I**G**A**K**L**T**L**S**T**D**N**T**S**A**G**A**S**A**S**G**K**-----**D**
XP_024404907.1 464 **A**--**R**E**N**G**T**W**V**N**W**D**L**D---**S**S**N**P**D**V**N**A**S**-----**D**

BAP59014.1	536	ACLKVDPOEMIARAVKAAADADYTIICTGLSGEWESEGFDRPHMDLPPGVDTMTISOVLDA
BAP59015.1	516	VAIVF-----VN-SDAGENTYITVEGNHGDRDKSGLYAWH-----DGDKLVQDAASK
AJC01624.1	451	VAIVV-----IT-ADSGEGYITVEGNAGDR--NDLNAWH-----SGTALVQAVAAA
XP_024404907.1	488	ACLVF-----IN-AIATEGWDR-----EGLHD-D-----FSDDLVRKIVASK
BAP59014.1	596	APNA-VVVNQSGTPTVMSWAH--KAKAIVQAWYGGNETGHGISDVLFGNVNPSGKLSLSN
BAP59015.1	561	FSNVIVVIHTVGPLILEKWIIDLPSVKAVLVVAHLPGQEAAGKSLINVLFGHASPCGHLPYSI
AJC01624.1	494	NSNVIVVVHVSVAINLEQIVALSQVKAIVWAGLPSQENGNALVDILWGAISPSGKLVYIIT
XP_024404907.1	522	CSNTIVVIHAAGIRLVDQWIEHPNVTATIIAHLPGQDSGEALVKLLYGEANFSGKLPYIIT
BAP59014.1	653	PVDVKHNPAYLNY-----ASVGGRVLYGEDVYVGYKFDKTEREVLFPFGHGLSYATFKL
BAP59015.1	621	TKEEDDLPKSVTTLIDSEFLNQPDITYTEGLYIDYRWLNKNKTKPRYAFGHGLSYTNFTF
AJC01624.1	554	AKSPSDYNTRIS-----SGDDNYSEGLFIDYKHFDDAGITPRYEFGEGLSYTNFTY
XP_024404907.1	582	AKNESDYSIYAPCKRTSINDTDPQCFTEGVYLDYRAFDAKNIAPRYEFGEGLSYTSFRY
BAP59014.1	708	PDSTVRTVPETFHPDQ-----
BAP59015.1	681	KAASIKQVARLSAYPPARPAKGSTPDFAQSI PSASEAVAPSGFGKIPRYIYSWLSQGDAN
AJC01624.1	605	SGLSITSNAKSGPATG-----
XP_024404907.1	642	SSLSIKPSVHLFK-----
BAP59014.1	724	-----PTVAIVKIKNTSS-VPGAQV
BAP59015.1	741	RAISDGKTGKYPYPDGYSTTQKPGARAGGGEGGNPALWDVAYSITVTVQNTGDEYAGKAS
AJC01624.1	621	-----AVVPGGPSDLFQDVAIVTVSINKTGA-VIGAEV
XP_024404907.1	655	-----SKCNDNKLWQPVAKVSAITINSQP-VSGQEV
BAP59014.1	743	LQLYISAPNSP-THRPVKELHGFEKV-YLEAGEEKEVQIPIDQYATSEFWEITESMKSER
BAP59015.1	801	VQAYLQFPDDIDYDTPIIQLRDFEKTKEKPKGETTTVTLTLTRKDVSVWDVVAQDQKQPA
AJC01624.1	653	AQLYIITYPSSA-PRTPVRQLRGFDKL-SLTAGQSGTATFNIRKRDLTYNNVASQCVVPS
XP_024404907.1	685	AQLYVAIPNS-----PPKQLRGFYKA-QLSPQKAETVHFELTRRDLVWDVTSQAVVQEQ
BAP59014.1	801	--GIYDVLVGFSSQEIISGKGLIVPETRFWMGL--
BAP59015.1	861	VDGGYKVVIGDASDSLSIVCHTDITLCEETGVVGPV
AJC01624.1	711	--GTEGVSVGASSRDLRLIGSFTVTS-----
XP_024404907.1	739	--GEYDIFVGASSRDVRLQGTILRVADN-----

Figura 24. Alinhamento múltiplo entre as sequências proteicas pertencentes ao grupo BG2. 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 *primer reverso* para serem utilizados na PCR.

Em relação às endoglucanases, as mesmas análises foram realizadas, dividindo-se estas sequências em 3 grupos de acordo com a maior similaridade entre as oito sequências obtidas dos bancos de dados, como mostra a Tabela 24. As Figuras 25; 26 e 27 representam o alinhamento entre as sequências dos grupos EnG1, 2 e 3, respectivamente e onde os *primers* foram desenhados.

Tabela 24. Matriz das porcentagens de identidade entre as sequencias proteicas do grupo da endoglucanase.

	EnG1			EnG2			EnG3	
	AAM77711.1	AFK32784.1	AIK67328.1	ACE81432.1	ABO93399.2	QWE49772.1	AYN44081.1	AYN44080.1
AAM77711.1	100	83,76	82,05	19,52	17,06	14,71	16,28	16,28
AFK32784.1	83,76	100	96,6	20,85	18,87	20	20,45	18,18
AIK67328.1	82,05	96,6	100,00	20,38	18,40	20,00	18,18	15,91
ACE81432.1	19,52	20,85	20,38	100,00	93,03	95,10	21,46	21,23
ABO93399.2	17,06	18,87	18,40	93,03	100,00	100,00	21,95	21,70
QWE49772.1	14,71	20,00	20,00	95,10	100,00	100,00	22,02	21,71
AYN44081.1	16,28	20,45	18,18	21,46	21,95	22,02	100,00	87,21
AYN44080.1	16,28	18,18	15,91	21,23	21,70	21,71	87,21	100,00

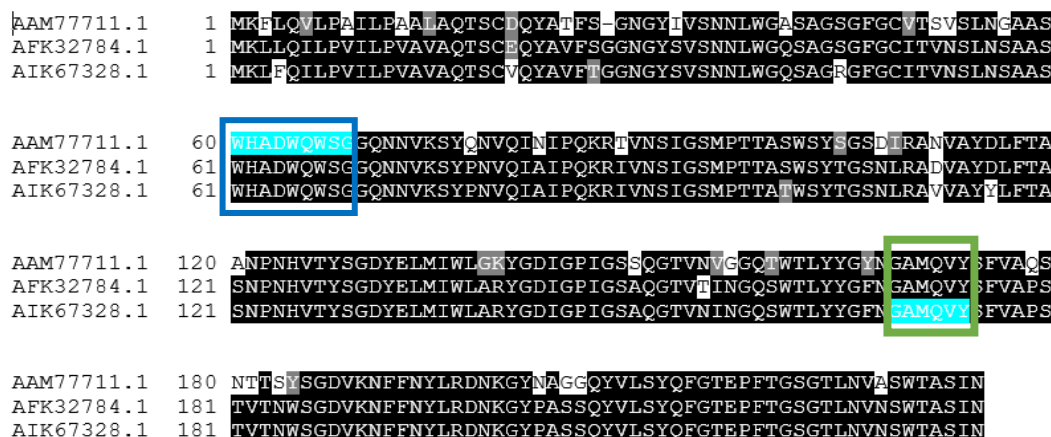


Figura 25. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo EnG1. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o *primer forward* foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do primer reverso para serem utilizados na PCR.

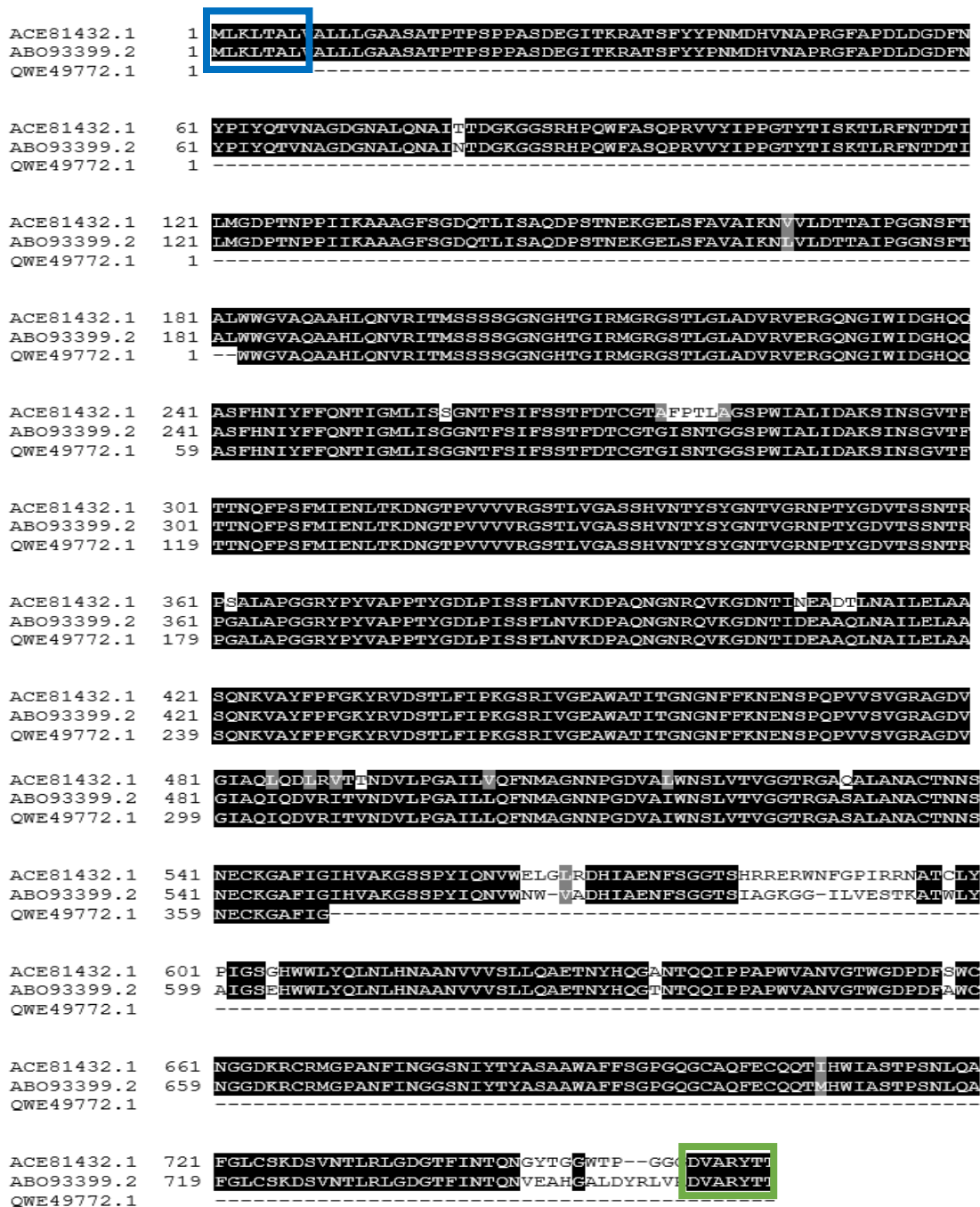


Figura 26. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo EnG2. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o *primer forward* foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do *primer reverso* para serem utilizados na PCR.



Figura 27. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo EnG3. 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 *primer reverso* para serem utilizados na PCR.

Para as ExG1 as mesmas análises foram realizadas com as 5 sequencias obtidas do banco de dados como mostra a Tabela 24. A Figuras 28 representa o alinhamento entre as sequências e onde os primers foram desenhados.

Tabela 25. Matriz das porcentagens de identidade entre as sequencias proteicas do grupo da exoglucanase.

	ExG1				
	AHK23048.1	XP_018656467.1	AAP33112.1	CAA05375.1	ABY19519.1
AHK23048.1	100.00	55.00		19.61	19.80
XP_018656467.1	55.00	100.00	17.93	20.63	20.63
AAP33112.1		17.93	100.00	88.57	90.79
CAA05375.1	19.61	20.63	88.57	100.00	97.87
ABY19519.1	19.80	20.63	90.79	97.87	100.00

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 1 -----
AAP33112.1 1 MGFIRSAVISAALAAACRGLATPGTEAEPAVEKRASSYWYENIAHQGIAPFGPSGYTVF
CAA05375.1 1 MGFIRSAVISAATFAAACRGLATPGSEAEPSVEKRASSYWYENIAHQGIAPFAPSNYTVF
ABY19519.1 1 MGFIRSAVLSAATFAAACRGLATPGSEAEPSVEKRASSYWYENIAHQGIAPFAPSNYTVF
```

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 1 -----
AAP33112.1 61 RNVKDFGAKGDGVTDDTAAINNAILSGGRCGRLEKSSSTLTPAVVYFPAGTYVISTPIIDQ
CAA05375.1 61 RNVKDYGAKGDGVTDDTAAINNAILSGGRCGRLEKSSSTLTPAVVYFPAGTYVISTPIIDQ
ABY19519.1 61 RNVKDYGAKGDGVTDDTAAINNAILSGGRCGRLEKSSSTLTPAVVYFPAGTYVISTPIIDQ
```

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 1 -----
AAP33112.1 121 YLTNIIGDPTNLPTIKATAGFNGIALFDGDTYYGDNNPNDPNWISTNVFYRQVRNFKLDM
CAA05375.1 121 YYTNIIGDPTNLPTIKATAGFSGIALFDGDTYYGDNNPNDPNWISTNVFYRQVRNFKLDM
ABY19519.1 121 YYTNIIGDPTNLPTIKATAGFSGIALFDGDTYYGDNNPNDPNWISTNVFYRQVRNFKLDM
```

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 1 -----
AAP33112.1 181 TSIFVTEPGRIYGIHWPTAQATSLQNIQITMSTAAAGNNEVGLFVENGSAAGFLTDMTFNGGS
CAA05375.1 181 TSIFTSAPKIYGIHWPTAQATSLQNIQITMSTASGNSQVGLFVENGSAAGFLTDMTFNGGL
ABY19519.1 181 TSIFTSAPKIYGIHWPTAQATSLQNIQITMSTASGNSQVGLFVENGSAAGFLTDMTFNGGL
```

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 1 -----
AAP33112.1 241 IGAAIGNQOQYTMRNLFVFNCCGTAIVSGFDWEWVYQGISINNCGLGIDMTAAESITLIDSS
CAA05375.1 241 IGAAIGNQOQYTMRNLFVFNCAQPTSAASIGSGFTRAISINNCGLGIDMTAAESITLIDSS
ABY19519.1 241 IGAAIGNQOQYTMRNLFVFNCCGTAIVSGFDWEWVYQGISINNCGLGIDMTAAESITLIDSS
```

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 1 -----
AAP33112.1 301 ITGTPVGIKTSBSANQSPATSNLIVENLSLNNVPVAIQSSSGATILAGGTTTIAAWGQG
CAA05375.1 301 ISGTPVGIKTSBRRNQSPATSNLIVENLSLNNVPVAIQSSSGSTILAGGTTTIAAWGQG
ABY19519.1 301 ISGTPVGIKTSBSANQSPATSNLIVENLSLNNVPVAIQSSSGSTILAGGTTTIAAWGQG
```

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 1 -----
AAP33112.1 361 HEYTPNGPNTTFQCSITPNSRPSALLSGSKYYTRSKPQYETLPLVSSFRSVRSAGATGNAV
CAA05375.1 361 HOYTPNGPNTTFQCSITPNSRPSALLSGSNYYTRSKPQYETLPLVSSFRSVRSAGATGNAV
ABY19519.1 361 HOYTPNGPNTTFQCSITPNSRPSALLSGSNYYTRSKPQYETLPLVSSFRSVRSAGATGNAV
```

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 1 -----
AAP33112.1 421 DDTTALQNIINSATAAGQVYFDAGIYRITKTLTIPPGAKIVGEEYPIIMSSGFFNDQN
CAA05375.1 421 DDTAALQSVINSATACGQIVYFDAGIYRITSTLSIPPGAKIVGEEYPIIMSSGFFNDQS
ABY19519.1 421 DDTAALQSVINSATAAGQVYFDAGIYRITSTLSIPPGAKIVGEEYPIIMSSGFFNDQS
```

```
AHK23048.1 1 -----
XP_018656467.1 17 ---AQCVCCTQEBETHPALSNKCTSGG---
AAP33112.1 481 NPKPVVQVGTAGQTGQVEWSDMIVATQGTQAGAVLIEWNLATSGTPSGMWDVHTRIGGFK
CAA05375.1 481 NPKPVVQVGTGQTGQVEWSDMIVSTQGTQAGAVLIEWNLATSGTPSGMWDVHTRIGGFK
ABY19519.1 481 NPKPVVQVGTGQTGQVEWSDMIVSTQGTQAGAVLIEWNLATSGTPSGMWDVHTRIGGFK
```



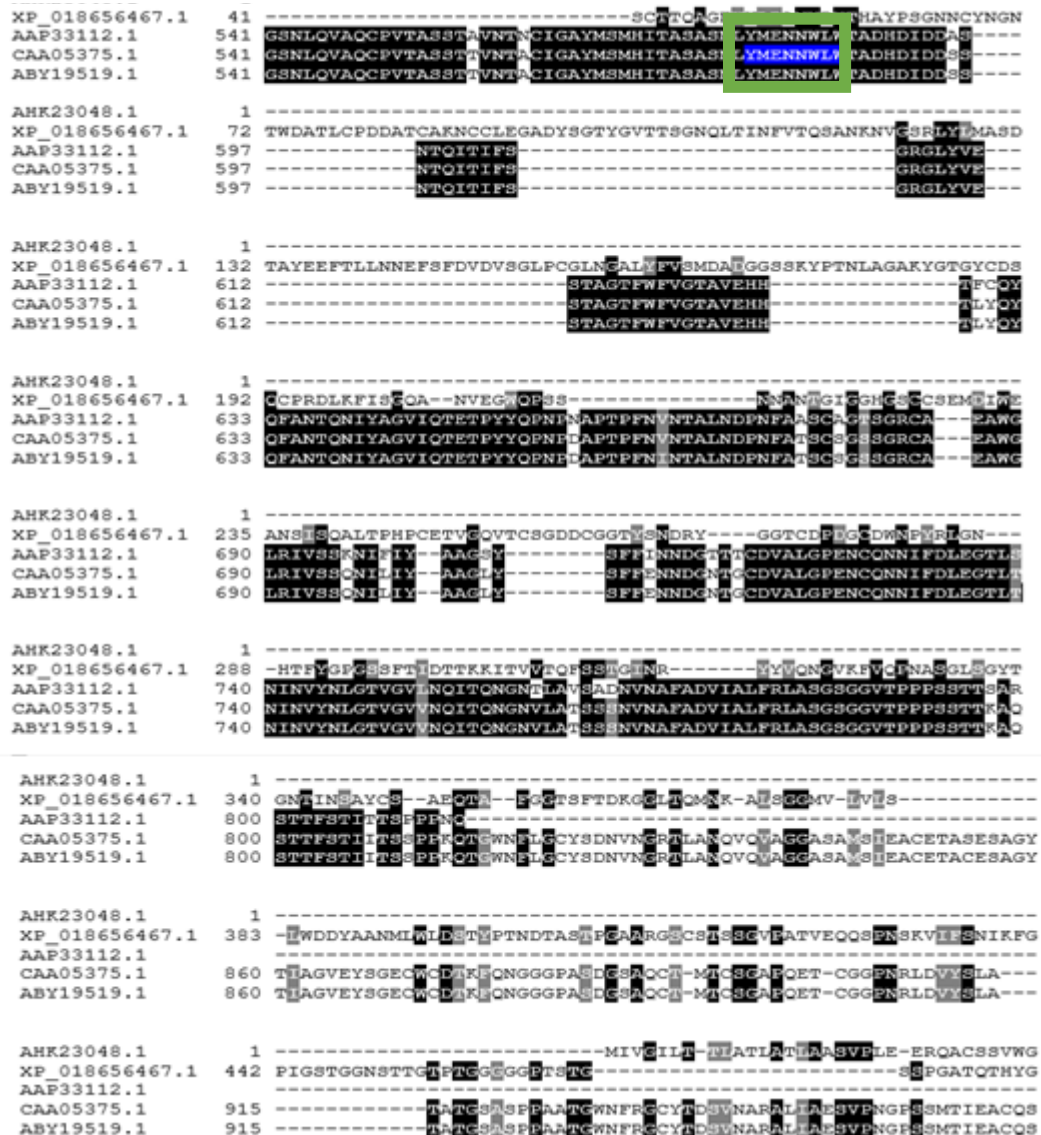


Figura 28. Alinhamento múltiplo entre as sequencias proteicas pertencentes ao grupo ExG1. Sequências dentro do quadro azul indicam a região onde o *primer forward* foi desenhado e as sequências dentro do quadro verde indicam o local do *primer reverso* para serem utilizados na PCR.

5.7 Reação em cadeia da Polimerase

Uma vez desenhados os primers para cada grupo das enzimas, foi realizada a PCR utilizando como molde o cDNA9 ou cDNA23.

Para amplificação dos fragmentos das BG foi utilizado o cDNA23, levando à amplificação de produtos de PCR principalmente de tamanho de aproximadamente 1400 pb para a BG1 e de 2300 pb para a BG2 como pode ser visualizado nas Figura 29 e 30 respectivamente.

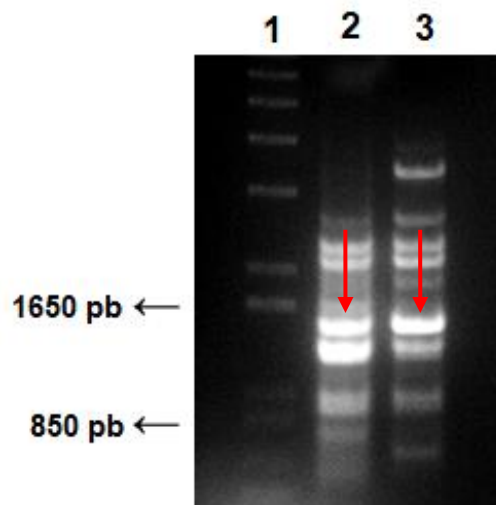


Figura 29. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para BG1. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA "Ladder" (Invitrogen). Canaleta 2 e 3 corresponde a Temperatura de anelamento de 57 e 60 °C respectivamente. As bandas selecionadas para purificação estão indicadas com as setas vermelhas.

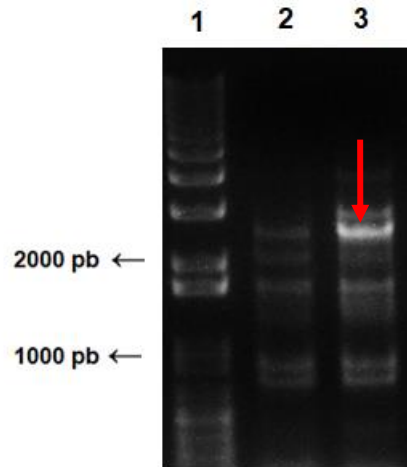


Figura 30. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para BG2. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA “Ladder” (Invitrogen). Canaleta 2 e 3 corresponde a Temperatura de anelamento de 50 e 55 °C respectivamente. A banda selecionada para purificação está indicada com uma seta vermelha.

A amplificação do gene das EnG foi feita a partir do cDNA9, com amplificação de fragmentos de tamanho esperado de aproximadamente 2400 pb para a EnG2 e 680 pb para a EnG3 como pode ser visualizado nas Figura 31 e 32.

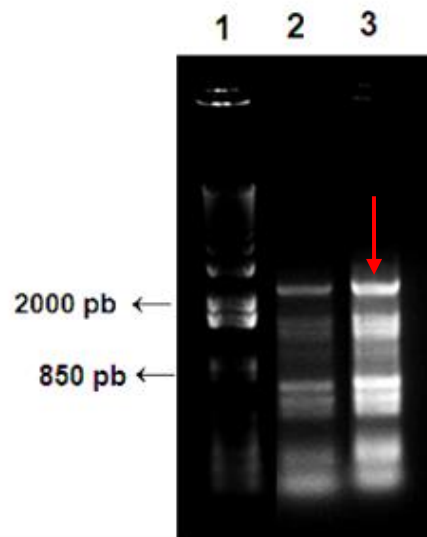


Figura 31. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para EnG2. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA “Ladder” (Invitrogen). Canaleta 2 e 3 correspondem a Temperatura de anelamento de 48 e 55 °C respectivamente. A banda selecionada está indicada com uma seta vermelha.

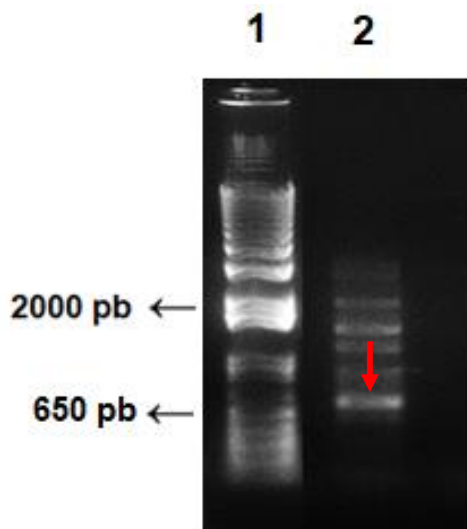


Figura 32. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para EnG3. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA "Ladder" (Invitrogen). Canaleta 2 corresponde a Temperatura de anelamento de 55 °C. A banda selecionada está indicada com uma seta vermelha.

Para obter a amplificação dos fragmentos esperados, foram realizadas diversas PCR mudando a temperatura de anelamento, como podemos observar nas Figuras 29-32. Contudo, ainda assim, foram obtidas bandas de tamanhos diferentes aos esperados, o que pode indicar interações não desejadas e, por este motivo, foi necessário realizar a purificação das bandas de tamanho esperado (indicadas pelas setas vermelhas) a partir do produto de PCR separado em gel de agarose.

Como exemplo, no caso da PCR para a EnG1 foi realizada a purificação como mostrado no item 4.12, obtendo-se apenas uma banda com o tamanho esperado de aproximadamente 845 pb como pode ser observado na figura 33.

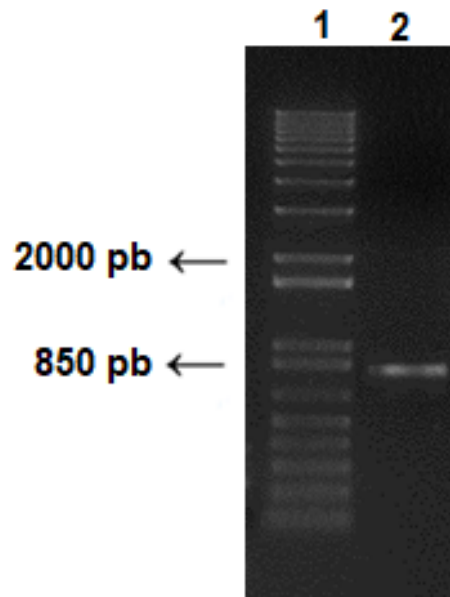


Figura 33. Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR para EnG1. A canaleta 1 indica o marcador 1Kb plus DNA “Ladder” (Invitrogen). Canaleta 2 corresponde a Temperatura de anelamento de 50 °C.

Ao realizar a amplificação para o grupo da ExG1, foram testadas diferentes estratégias variando as condições das reações da PCR, mas não obtivemos bandas com tamanhos esperados quando as PCRs foram visualizadas no gel de agarose.

5.8 Sequenciamento

Após purificação dos fragmentos de interesse, foi realizado o sequenciamento do produto de PCR obtido para o grupo das BG1. A sequência resultante foi analisada no formato FASTA utilizando alinhamento de nucleotídeos pelo BLAST, no NCBI, para comparação com sequências homólogas de proteínas depositadas no banco de dados. A BG1 de *Trichoderma lixii*-5A7 apresentou porcentagem de identidade entre 80 a 93% com enzimas β -glicosidases já depositadas no banco de dados como podemos observar na Tabela 26.

Tabela 26. Porcentagem de Identidade entre BG1 do fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii*-5A7 e β -glicosidases existentes no banco de dados.

Microrganismo	Descrição da enzima	Identidade (%)	E valor	Código de acesso
<i>Trichoderma harzianum</i> CBS 226.95	glycoside hydrolase	93,58	0,0	XM_024911655.1
<i>Trichoderma harzianum</i> strain T12	beta-glicosidase mRNA, parcial	93,58	0,0	KY199423.1
<i>Trichoderma harzianum</i> strain IOC 3844	beta-glicosidase (bgl)	93,58	0,0	KU201604.1
<i>Hypocrea lixii</i> strain T7	beta-1,4-glicosidase (bgl2)	93,58	0,0	EF426299.1
<i>Trichoderma harzianum</i> isolate WF5	1,4-beta-glicosidase mRNA	90,73	0,0	KM073255.1
<i>Trichoderma viride</i> strain cf1	beta-glicosidase 2 (BGII), parcial	88,95	0,0	HM178945.1
<i>Trichoderma viride</i> strain cf1	beta-glicosidase 1(BGI), parcial	88,77	0,0	HM178944.1
<i>Trichoderma gamsii</i>	beta-glicosidase	85,42	1e-148	XM_018806048.2

O alinhamento, utilizando o método de BLASTn, entre a sequência BG1 do fungo de ambiente marinho *T. lixii*-5A7 e as β -glicosidases existentes no banco de dados mostrou 65 sequências com identidade maior que 80% com a BG1, entretanto apenas 15 foram selecionadas para análise de alinhamento devido aos seus valores de E-value menores que 1.e-142.

Por sua vez, utilizando a ferramenta de busca por nucleotídeos traduzidos, BLASTx, que traduz os nucleotídeos da busca nos três possíveis quadros de leitura

e busca a homologia com proteínas do banco de dados, foram encontradas 100 sequências com homologia, sendo que 5 sequências apresentaram cobertura maior que 90%, E-value de 1^{-100} e identidade maior que 82%.

Na Figura 34 está apresentado o alinhamento global múltiplo (pela ferramenta CLUSTAL ômega) entre a sequência de BG1 clonada neste trabalho e as depositadas que apresentaram maior homologia.

BG1	-----DTFCAIPGKIADGTSVGTACDSYNRTAED	29
<i>Trichoderma lixii</i>	----MWFATAAYQIEGAIDKDGGRGSIWDTFCAIPGKIADGTSVGTACDSYNRTAED	54
<i>Trichoderma guizhouense</i>	MLPKDFQWGFATAAYQIEGAIDKDGGRGSIWDTFCAIPGKIADGTSVGTACDSYNRTAED	60
<i>Trichoderma harzianum</i>	----MWFATAAYQIEGAIDKDGGRGSIWDTFCAIPGKIADGTSVGTACDSYNRTAED	54
<i>Trichoderma harzianum b</i>	MLPKDFQWGFATAAYQIEGAIDKDGGRGSIWDTFCAIPGKIADGTSVGTACDSYNRTAED	60
<i>Trichoderma simmonsii</i>	MLPKDFQWGFATAAYQIEGAIDKDGGRGSIWDTFCAIPGKIADGTSVGTACDSYNRTAED	60

BG1	IALLKSLGAKSYRFSISWSRIIPKGGRRDPVNQLGIDHYAQFVDDLLEAGITPFITLFWH	89
<i>Trichoderma lixii</i>	IALLKSLGAKSYRFSISWSRIIPKGGRRDPVNQLGIDHYAQFVDDLLEAGITPFITLFWH	114
<i>Trichoderma guizhouense</i>	IALLKSLGAKSYRFSISWSRIIPKGGRRDPVNQLGIDHYAQFVDDLLEAGITPFITLFWH	120
<i>Trichoderma harzianum</i>	IALLKSLGAKSYRFSISWSRIIPKGGRRDPVNQLGIDHYAQFVDDLLEAGITPFITLFWH	114
<i>Trichoderma harzianum b</i>	IALLKSLGAKSYRFSISWSRIIPKGGRRDPVNQLGIDHYAQFVDDLLEAGITPFITLFWH	120
<i>Trichoderma simmonsii</i>	IALLKSLGAKSYRFSISWSRIIPKGGRRDPVNQLGIDHYAQFVDDLLEAGITPFITLFWH	120

BG1	DLPEELHQRVYGLLNRTEFPLDFENYARVMFKALPKVRNWITFNEPLCSAIPGYSGTFC	149
<i>Trichoderma lixii</i>	DLPEELHQRVYGLLNRTEFPLDFENYARVMFKALPKVRNWITFNEPLCSAIPGYSGTFA	174
<i>Trichoderma guizhouense</i>	DLPEELHQRVYGLLNRTEFPLDFENYARVMFKALPKVRNWITFNEPLCSAIPGYSGTFA	180
<i>Trichoderma harzianum</i>	DLPEELHQRVYGLLNRTEFPLDFENYARVMFKALPKVRNWITFNEPLCSAIPGYSGTFA	174
<i>Trichoderma harzianum b</i>	DLPEELHQRVYGLLNRTEFPLDFENYARVMFKALPKVRNWITFNEPLCSAIPGYSGTFA	180
<i>Trichoderma simmonsii</i>	DLPEELHQRVYGLLNRTEFPLDFENYARVMFKALPKVRNWITFNEPLCSAIPGYSGTFA	180

BG1	PWAARAPTEPWIRWPQTLVCPRAVLVKVYRDEFKGP-----	186
<i>Trichoderma lixii</i>	PGR-QSTTEPWIVGHY--LLVAHGRAVKVYRDEFKDLNDGQIGIVLNGDFTYPWSSDPL	231
<i>Trichoderma guizhouense</i>	PGR-QSTTEPWIVGHN--LLVAHGRAVKVYRDEFKDLNDGQIGIVLNGDFTYPWSSDPL	237
<i>Trichoderma harzianum</i>	PGR-QSTTEPWIVGHN--LLVAHGRAVKVYRDEFKDLNDGQIGIVLNGDFTYPWSSDPL	231
<i>Trichoderma harzianum b</i>	PGR-QSTTEPWIVGHN--LLVAHGRAVKVYRDEFKDLNDGQIGIVLNGDFTYPWSSDPL	237
<i>Trichoderma simmonsii</i>	PGR-QSTTEPWIVGHN--LLVAHGRAVKVYRDEFKDLNDGQIGIVLNGDFTYPWSSDPL	237
	* :: ***** *: :: ***** *	
BG1	-----	186
<i>Trichoderma lixii</i>	DREAAERRLEFFTAWYDPIYLDYPAASMRQLGDRLPEYTPPEKAFVLGSNDFYGMNIHY	291
<i>Trichoderma guizhouense</i>	DREAAERRLEFFTAWYADPIYLDYPAASMRKQLGDRLPEFTPEEKAFVLGSNDFYGMNIHY	297
<i>Trichoderma harzianum</i>	DREAAERRLEFFTAWYADPIYLDYPAASMRKQLGDRLPEFTPEEKAFVLGSNDFYGMNIHY	291
<i>Trichoderma harzianum b</i>	DREAAERRLEFFTAWYADPIYLDYPAASMRKQLGDRLPEFTPEEKAFVLGSNDFYGMNIHY	297
<i>Trichoderma simmonsii</i>	DREAAERRLEFFTAWYADPIYLDYPAASMRKQLGDRLPEFTPEEKAFVLGSNDFYGMNIHY	297

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

Com sua sequência de DNA determinada e classificada como uma β -glicosidase a sequência codificadora de BG1 foi então clonada para vetor de expressão em bactéria a fim de confirmar a sua atividade.

5.9 Clonagem dos fragmentos de interesse

Os fragmentos gerados nas PCRs para o grupo das BG1, e EnG1 foram purificados e submetidos ao processo de clonagem no vetor de expressão pNIC28-Bsa4 no caso da BG1 e em vetor de clonagem pJet1.2/blunt, para EnG1, sendo que após a transformação em *E. coli* DH5 α , as clonagens foram confirmadas nas colônias por reações de PCR. No caso de BG1 a PCR foi realizada com primers que amplificam parcialmente o gene, com tamanho aproximado de 550 pb e observou-se que das 8 colônias selecionadas, as colônias numeradas como 6 e 7 apresentaram amplificação (Figura 35). Das duas colônias selecionadas, apenas a colônia numerada como 1 para o grupo das EnG1 apresentaram um produto de amplificação do tamanho esperado de aproximadamente 845 pb (Figura 36).

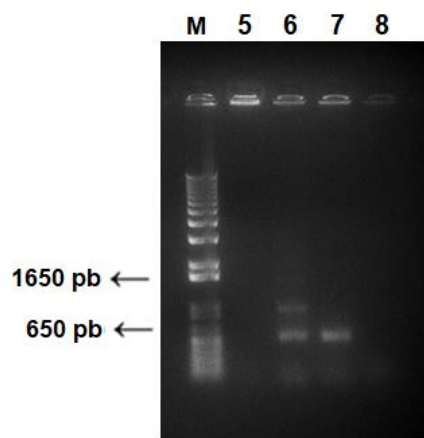


Figura 35. Identificação de colônias transformantes com sequência de interesse BG1. Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da PCR de colônia. Poço 6 e 7 contendo colônias transformantes. M: marcador de tamanho molecular.

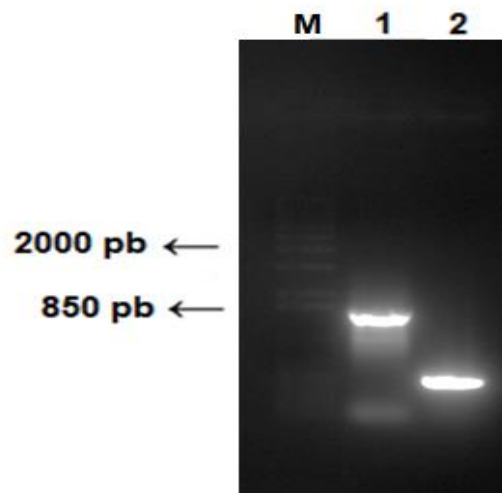


Figura 36. Identificação de colônias transformantes com sequência de interesse EnG1. Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da PCR de colônia. Poço 1 contendo colônia transformante. M: marcador de tamanho molecular.

Uma vez obtidos os clones com as sequências de interesse, as colônias selecionadas foram crescidas em meio LB contendo o antibiótico correspondente para recuperação do plasmídeo e sequenciamento dos possíveis fragmentos de *bg1* e *eng1* e para preservação em glicerol 20% de todos os clones positivos e armazenamento à temperatura de -80°C . Estes procedimentos visam a preservação do material de estudo para futuros testes envolvendo clonagem para expressão da proteína recombinante em bactérias competentes.

5.10 Expressão e atividade da BG1 recombinante em *E. coli*

Uma vez que foram obtidos dois clones positivos com a sequência de BG1, procedeu-se à etapa de expressão da BG1 recombinante. A indução foi realizada por 4 h e foram coletadas alíquotas no tempo 0 (antes da indução) e depois de 4 h de indução. Também foi realizado um controle seguindo os mesmos passos sem a adição do indutor. A produção da proteína BG1 de *T. lixii* recombinante em *E. coli* foi avaliada por SDS-PAGE 12% como pode ser observado na Figura 37.

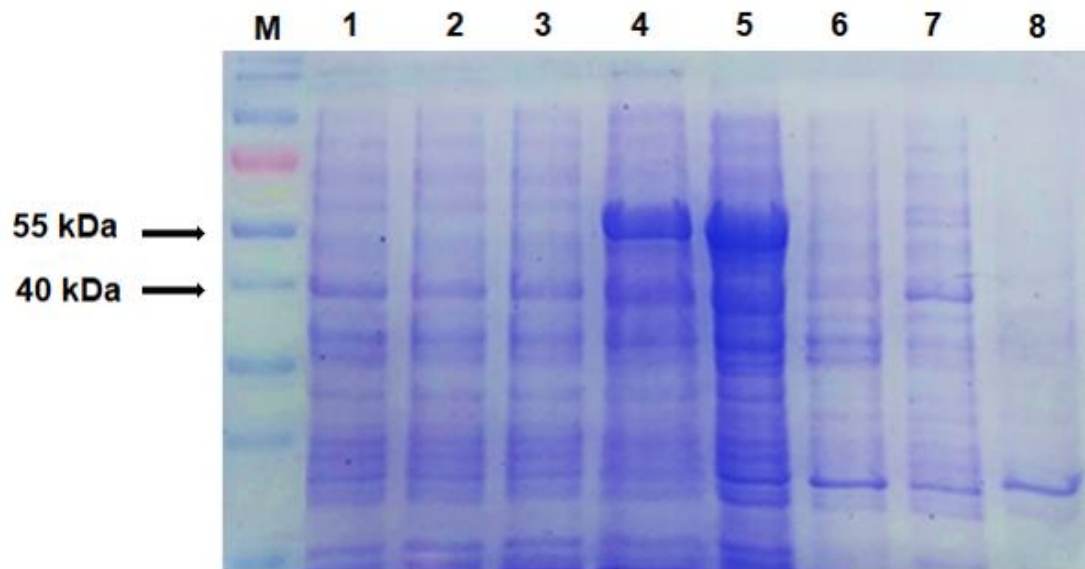


Figura 37. Teste de expressão e produção da BG1 em *E. coli* BL21 a 37°C. SDS-PAGE 12%. M: marcador de peso molecular; 1: amostra não induzida (Tempo 0); 2: amostra controle (Tempo 0); 3: amostra controle após 4 h; 4: amostra após 4 h de indução; 5: amostra da fração de proteínas insolúveis após lise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

Como pode ser observado na figura 36 a BG1 recombinante foi expressa no tamanho esperado de aproximadamente 52 kDa (visto que sua sequência codificadora é de 1400 pb). A expressão se mostrou eficiente no tempo de 4 horas de indução, no entanto, nessa indução a maioria da BG1 se apresentou na fração de proteínas insolúveis.

Posteriormente, foi realizado o ensaio da atividade enzimática tanto da fração solúvel quanto da fração insolúvel e os resultados podem ser observados na Figura 38.

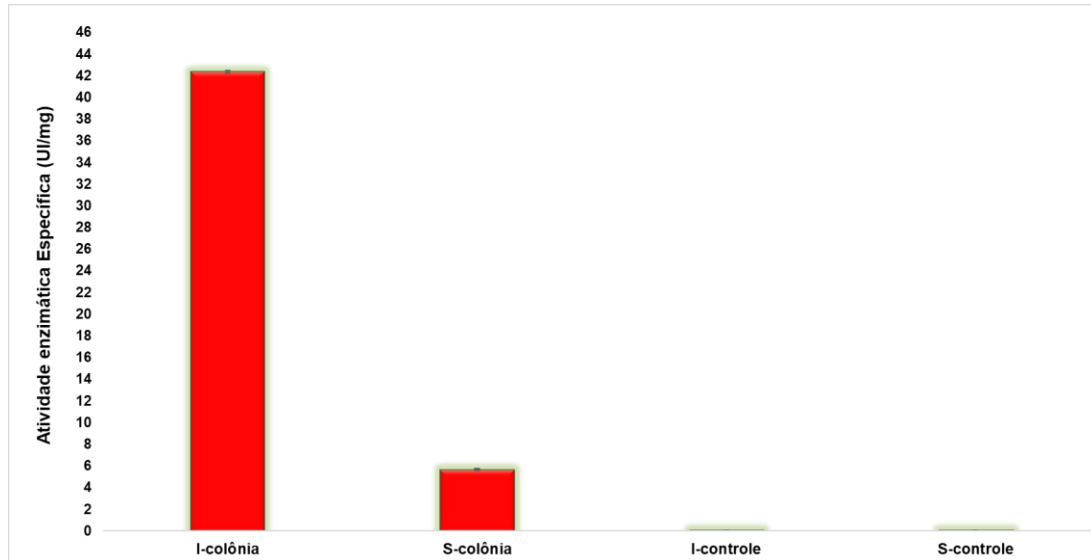


Figura 38. Atividade da BG1 heteróloga da colônia e do controle na fração solúvel (S) e insolúvel (I) por período de 4h de indução na temperatura de 37°C.

Avaliando os resultados de atividade específica e comparando com o gel de SDS-PAGE, é possível confirmar que uma sequência codificadora de β -glicosidase de *T. lixii* foi identificada e caracterizada funcionalmente em bactéria. A enzima, contudo, concentrou-se na fração insolúvel, com o material precipitado da lise celular, o que pode ser observado pela presença de uma forte banda de ~52 kDa no gel de SDS-PAGE e que se confirma pela maior atividade específica na fração insolúvel do que na fração solúvel, isto é, com valores de $42,36 \pm 0,12$ UI/mg na primeira fração em comparação a $5,65 \pm 0,09$ UI/mg na segunda. Além disso, embora tenha sido observada uma atividade 2x menor, a enzima recombinante manteve sua atividade glicolítica na mesma ordem de grandeza que a enzima produzida pelo organismo do qual ela é endógena, o fungo marinho *T. lixii*, cuja atividade foi de $88,22 \pm 0,30$ UI/mg.

6. DISCUSSÃO

O setor agroindustrial produz grandes quantidades de resíduos naturais os quais ao não serem aproveitados podem gerar perdas de nutrientes e biomassa de grande valor além de produzir um impacto ambiental pelo seu acúmulo (WANG et al., 2012). Os componentes presentes nesses resíduos, principalmente a celulose, podem ser facilmente degradados por enzimas microbianas, deixando o material mais acessível para processos futuros. As enzimas são catalisadores biológicos que modificam a velocidade de uma reação química, tornando-a mais rápida realizando essa função em organismos vivos, porém também podem ser extraídas das células e utilizadas com diferentes propósitos, alguns com grande importância industrial (ROBINSON, 2015), pois quando comparada com processos químicos convencionais elas trazem vários benefícios como, por exemplo, uma redução na geração de subprodutos químicos e tóxicos, além de elevar a qualidade final dos produtos (ARBIGE; SHETTY; CHOTANI, 2019). No caso da decomposição da celulose, é necessário um complexo enzimático celulolítico composto por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases capazes de gerarem produtos de interesse e reduzir a contaminação gerada pelos resíduos naturais. Entre os microrganismos produtores de celulases, o fungo *Trichoderma reesei*, é amplamente estudado, possui alta capacidade de produção de endoglucanases e exoglucanases; no entanto, com baixa produção de β -glicosidases. Portanto, a exploração de outros fungos (geralmente do gênero *Aspergillus* spp.) são necessários na hidrólise de celulose (ELLILÄ et al., 2017). Nossos resultados mostraram que o fungo *Trichoderma lixii-5A7* conseguiu uma boa produção de todo o complexo celulolítico nas primeiras etapas do trabalho, o que poderia facilitar a degradação da celulose.

Outros estudos realizados pelo grupo de pesquisa Souza et al., 2018 utilizaram fungos filamentosos para a degradação de celulose, apresentando resultados de 3,23 UI/mg (atividade FPAse), 7,03 UI/mg (atividade β -glicosidase) para *Trichoderma harzianum* e 2,47 UI/mg (FPAse); 1,53 UI/mg (β -glicosidase) para *Trichoderma reesei*, que são microrganismos amplamente estudados para a degradação de celulose (GARVEY et al., 2014; MACHADO et al., 2010; SCHMOLL

e SCHUSTER, 2010). Esses resultados comparados com os que obtivemos no presente trabalho nas primeiras etapas, mostraram que o fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii*-5A7 destaca-se como um microrganismo promissor para otimizar a produção das enzimas celulolíticas ao produzir maior atividade enzimática na temperatura de 20°C onde o pico de maior produção foi de 49,12 UI/mg (FPase) e 71,84 UI/mg (β -glicosidase).

Antes que um microrganismo seja utilizado em processos biotecnológicos e industriais, fatores ambientais e nutricionais fundamentais que possam afetar a atividade enzimática nos processos devem ser primeiramente estudados. O método clássico, onde só uma variável é testada por vez em diversas condições enquanto as demais são fixadas, é laboriosa e consome muito tempo, principalmente quando temos um número de variáveis grande (PEREIRA et al., 2010). Uma alternativa eficiente para sistemas microbianos é o uso de métodos estatísticos, que utilizam um número menor de medidas e explora todo o espaço experimental. Como exemplo, podemos mencionar a técnica conhecida por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que explora todo o espaço experimental. Esta técnica permite avaliar os efeitos de cada variável individualmente e de suas interações sobre uma dada resposta e é indispensável para obter resultados mais confiáveis, assim como, oferece as vantagens da redução do número de experiências e melhora na qualidade da informação obtida através dos resultados (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Por tais motivos, realizamos um DCCR para otimização do meio de cultivo D onde diversas variáveis foram estudadas no presente trabalho (glicose, KH_2PO_4 , YNB e CMC) tendo como resultado um aumento na atividade enzimática específica das enzimas celulolíticas comparadas com a produção antes de ser otimizada quando a concentração da variável CMC foi 4 vezes diminuída para o ensaio 23 e no caso do ensaio 9 a glicose foi 1,6 vezes diminuída e o componente CMC foi aumentado em 1,37 vezes. Pesquisas realizadas visando a produção de celulasas pelo co-cultivo de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, por FES, utilizando casca de soja e farelo de trigo como substratos, observaram em condições otimizadas as atividades máximas 10,78 U/g FPase e 10,71 U/g de β -glicosidase após o período de incubação de 96 horas (BRIJWANI, OBEROI e

VADLANI, 2010). Nossos resultados apresentaram com destaque uma atividade específica de 126,97 UI/mg; 70,96 UI/mg e 87,30 UI/mg para endoglucanase, FPase e exoglucanase respectivamente no ensaio 9 e 88,22 UI/mg para β -Glicosidase no ensaio 23, com 15 dias de cultivo. O estudo realizado por Silva (2004), por exemplo, avaliou a produção de endoglucanase em diversos fungos, apresentando, contudo, alta atividade apenas para *Aspergillus flavus* e *A. dimorphicus*, com 142 e 145 ug glicose/min/mg, também no décimo quinto dia de incubação. Ghorri et al., (2011) avaliaram o efeito da temperatura em cultivo submerso sobre a atividade endoglucanase da cepa *A. niger* NRRL e observaram na temperatura de 30 °C uma maior atividade da enzima e temperaturas superiores diminuíram a atividade enzimática, o que corrobora com nossos resultados obtidos na temperatura de 40°C, onde a produção das enzimas foi muito baixa.

Na etapa a seguir realizamos a produção das celulases em biorreator utilizando os meios otimizados. Os resultados obtidos mostraram uma alta produção das enzimas comparadas com os trabalhos feitos por outros grupos de pesquisa que selecionaram três linhagens por sua alta atividade enzimática: *Aspergillus ustus* para endoglucanase (4,76 UI/mg), *Talaromyces bruneus* para β -glicosidase (11,71 UI/mg) e *Aspergillus sp.* (CBMAI 1926) para FPase (1,70 UI/mg) (PAULA et al., 2019), nossos resultados mostraram uma atividade específica de 100,53 UI/mg , 97,31 UI/mg e 71,10 UI/mg para β -glicosidase, endoglucanase e FPase respectivamente o que faz do fungo de ambiente marinho *T.lixxi-5A7* uma alternativa na utilização da produção das celulases. Nessa etapa, também observamos um crescimento do fungo em forma de hifas o que de acordo com a literatura, a morfologia de hifas normalmente favorece a produção de enzimas, devido à secreção das enzimas ocorrer nas pontas das hifas uma vez que essas extremidades são mais porosas, facilitando a passagem das enzimas pela parede celular (El-Enshasy, 2007; ROBSON et al., 2008). Tal fato pode ter contribuído na alta produção das enzimas num tempo menor de cultivo.

Ainda, com a finalidade de posteriormente avaliarmos a sequência codificadora das enzimas celulolíticas, realizamos a extração do RNA total e síntese de cDNA para amplificação de fragmentos dessas sequências. A estimativa da

qualidade e quantidade do RNA total extraído frequentemente é realizada por espectrofotometria. A leitura realizada em um comprimento de onda a 260 nm é utilizada para mensurar a quantidade de ácidos nucleicos, pois esse é o comprimento de onda de máxima absorvância dessas moléculas (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A razão entre as medidas a 260 nm e 280 nm e entre 260 nm e 230 nm indica a pureza do RNA, considerando os valores de 1,8 e 2,2 para amostras de boa qualidade. Medidas inferiores podem indicar contaminação por proteínas, fenóis ou outros compostos que absorvem luz próxima a 280 nm ou indicar a presença de agentes como EDTA, fenol, carboidrato, glicogênio ou guanidina, contaminantes que absorvem luz a 230 nm, (BARBAS et al., 2007; SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

No presente trabalho, a extração de RNA total do fungo *T. lixii-5A7* dos ensaios 9 e 23 apresentou boa qualidade e integridade, como visto pela presença das bandas referentes as subunidades 28S e 18S bem definidas em gel de agarose, não apresentando sinais de degradação. Em seguida, o cDNA foi sintetizado e utilizado como molde na etapa de PCR de fragmentos das sequências codificadoras das enzimas.

Dando continuidade, as sequências proteicas selecionadas na base de dados foram usadas para desenhar *primers* empregados na amplificação dos fragmentos nucleotídicos das enzimas celulolíticas do fungo *Trichoderma lixii-5A7*. Alinhamentos dessas sequências mostraram áreas conservadas que serviram de molde para o desenho de *primers* degenerados para cada um dos grupos de celulasas definidos pela identidade entre as sequências. A área conservada das proteínas corresponde a uma região de sua sequência de aminoácidos que está fortemente relacionada à sua função ou estrutura sendo que esses dois aspectos estão relacionados, pois a função de uma proteína depende de sua estrutura e dos aminoácidos que ela possui em seu sítio ativo. Como qualquer modificação nessas zonas pode afetar a ação das proteínas, elas foram conservadas na evolução (MARCHLER-BAUER et al., 2007; LINDER, M., TERRI, 1997). Utilizando como molde o cDNA de *T. lixii-5A7* fragmentos com tamanhos esperados de acordo com

as sequências depositadas em bancos de dados que codificam as celulasas foram amplificadas, purificados e sequenciados.

Infelizmente, pelo sequenciamento, observou-se que o fragmento clonado relativo à endoglucanase não apresentou identidade com nenhuma das sequências dessas enzimas depositadas em banco de dados, mesmo que de outro organismo. Entretanto, foi possível amplificar a sequência codificadora completa da beta-glicosidase, o que foi indicado pela alta identidade e cobertura com outras beta-glicosidades depositadas e, posteriormente, foi confirmado pela produção heteróloga de uma proteína com tamanho e atividade esperados.

Assim, a sequência codificadora da beta-glicosidase foi caracterizada funcionalmente em bactéria *E. coli*. Vários trabalhos reportam a utilização de ferramentas de Biologia Molecular na produção de celulasas, obtendo uma melhora na qualidade e eficiência das enzimas secretadas, tornando estes estudos atrativos e que representam uma eficiente estratégia para a questão de bioconversão de resíduos celulósicos (LIMA e RODRIGUES, 2007).

Com os resultados de atividade celulolítica da beta-glicosidase de *T. lixii* – 5A7 expressa em linhagem de *E. coli* BL21 co-expressando chaperonas, observou-se que mesmo em menor concentração, a BG1 presente na fração solúvel do lisado celular apresentou uma atividade de 5,65 UI/mg, o que é maior se comparada com o grupo de pesquisa de Haq et al. (2012), que obteve atividade de 0,98 UI/mg na fração solúvel da enzima clonada do organismo *Thermotoga petrophila* utilizando a cepa *E.coli* BL21.

Outro estudo realizado por Jiang et al. (2021) utilizando também a cepa *E.coli* BL21 como hospedeiro obtiveram uma atividade enzimática de 2,04 UI/mg com um tempo de indução de 20 h. Por outro lado, no presente trabalho, foi dosada uma atividade celulolítica de 42,36 UI/mg na fração insolúvel, que corresponde ao precipitado obtido após a lise do inóculo celular. Tal atividade é comparável com a atividade específica de beta-glicosidase apresentada pelo extrato proteico extracelular do fungo *T. lixii*, mostrando que quando expressa heterologicamente, a beta-glicosidase perdeu pouca atividade e que, portanto, o sistema de *E. coli* pode

ser utilizado não só para a caracterização desta enzima, mas também pode ser otimizado para sua produção e aplicação biotecnológica.

E. coli é o hospedeiro mais utilizado para produção de proteínas heterólogas devido à facilidade de manipulação, baixo custo referente ao seu crescimento e facilidade na ampliação para escala industrial das moléculas de interesse (CUI et al., 2017). Além do mais, enzimas de aplicação ambiental ou para o tratamento têxtil não precisam ter um nível muito alto de purificação, o que exige maior dificuldade e maior custo quando a proteína heteróloga se concentra na fração insolúvel. Assim, a beta-glicosidase pode ser produzida com sucesso em *E. coli* e ser empregada a partir do lizado celular.

Com os dados obtidos no presente trabalho, podemos observar que o fungo de ambiente marinho *T. lixii-5A7* possui um complexo enzimático celulolítico promissor, que pode ser utilizado em processos de fermentação com maior atividade enzimática ou até mesmo pode ser explorada a produção heteróloga de sua enzima beta-glicosidase. Portanto, podemos destacar os benefícios da exploração de ambientes extremos como os ambientes marinhos para encontrar novas linhagens microbianas potencialmente valiosas.



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 verrucosum* 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. **Biotecnologia 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-URIOSTE, 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.

CRUCCELLO, 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.

GMOSEK, 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

statistical experimental design. **Biotechnological Products and Process Engineering**, v. 79, p. 915–923, 2008.

HÄKKINEN, Mari et al. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, 2014.

HAN, Xiaolong et al. Improving cellulase productivity of *Penicillium oxalicum* RE-10 by repeated fed-batch fermentation strategy. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 155-163. doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.079.

HAQ, Ikram Ul et al. Cloning, characterization and molecular docking of a highly thermostable β -1,4-glucosidase from *Thermotoga petrophila*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 9, 2012.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, n. 2, 1991.

ILMÉN, Marja et al. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, 1997.

JAYASEKARA, Sandhya; RATNAYAKE, Renuka. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. In: RODRÍGUEZ PASCUAL. A.; MARTÍN, M.E.E (ed.). **Cellulose**. , IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84531.

JIANG, Zedong et al. Characterization of a glucose-stimulated β -glucosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1. **Microbiological Research**, v. 251, 2021.

JUHÁSZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, 2005.

JUHÁSZ, Tamás et al. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 113, p. 201–211, 2004. <https://doi.org/10.1385/ABAB:113:1-3:2012004>.

JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–2031, 2014.

KAVANAGH, Kevin. Fungal Fermentations Systems and Products. **Fungi Biol. Appl. Second Ed.** p. 125-146, 2011.

KHAN, Shaukat.A. et al. Epidemiology of mucopolysaccharidoses. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 121, n. 3, p. 227–240, 2017.

KILIKIAN, B. V. et al. Filamentous fungi and media for cellulase production in solid

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

dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 12, p. 2176–2182, 2012.

NIRANJANE, Ajay P.; MADHOU, Priya; STEVENSON, Trevor W. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, 2007.

NIYONZIMA, Francois N.; MORE, Sunil S. Coproduction of detergent compatible bacterial enzymes and stain removal evaluation. **Journal of Basic Microbiology**. v. 55, n. 10, p. 1149-58, 2015. doi: 10.1002/jobm.201500112.

NOGUCHI, Yuji et al. Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 1, 2009.

OBENG, Eugene M. et al. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. **Bioresources and Bioprocessing**. v. 4, Article number: 16, 2017.

OKADA, Hirofumi et al. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, 1998.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al. Use of agro-industrial wastes as substrates for α -amylase production by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 3, 2017.

PATEL, S.; SHUKLA, S. Fermentation of Food Wastes for Generation of Nutraceuticals and Supplements. In: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E. (Ed.). **Fermented Foods Health and Disease Prevention**, London: Academic Press, 2017. Chapter 30, p. 707-734. Disponível em: <http://csu-cvmb.colostate.edu/Documents/erhs-fermentedfoods-HDprevention-2016.pdf>.

PAULA, Caio C.P.De et al. High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (Catão cave) in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, e20180583, 2019. doi: 10.1590/0001-3765201920180583.

PETERSON, Robyn; NEVALAINEN, Helena. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - Thirty years of strain improvement. **Microbiology**. v. 158, Pt 1, p. 58-68, 2012. doi: 10.1099/mic.0.054031-0.

PIETRO-SOUZA, William et al. Endophytic fungal communities of *Polygonum acuminatum* and *Aeschynomene fluminensis* are influenced by soil mercury contamination. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 2017.

REYES-SOSA, Francisco Manuel et al. Management of enzyme diversity in high-performance cellulolytic cocktails. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 156, 2017.

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.

9. APÊNDICE

Apêndice A

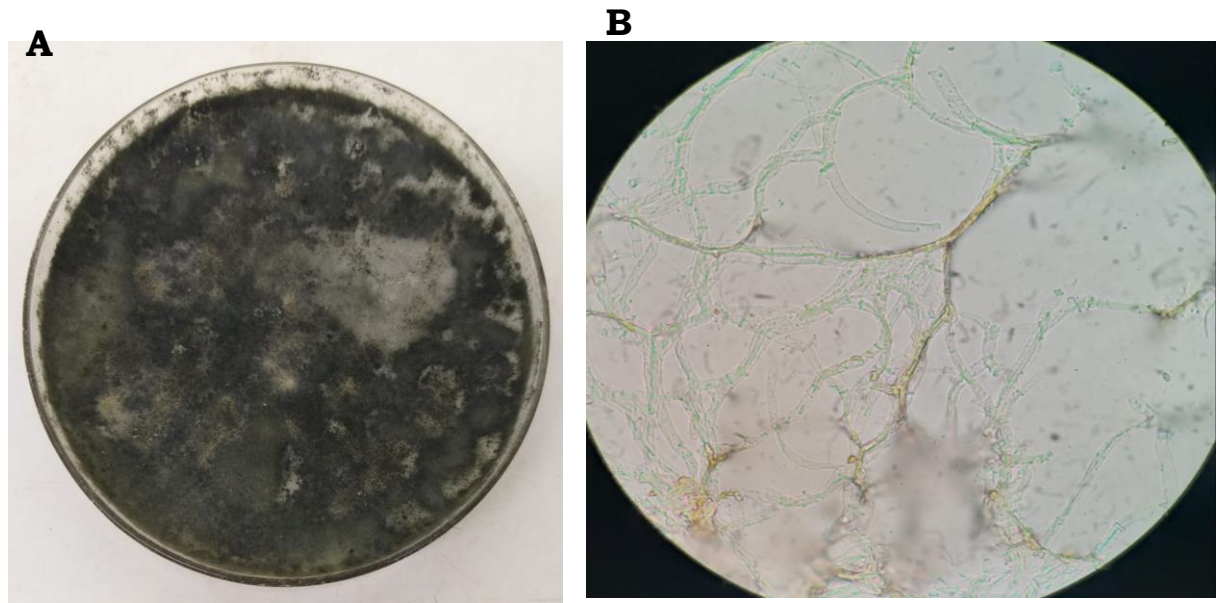


Figura 39. Cultura e morfologia do fungo de ambiente marinho *Trichoderma lixii-5A7*. A) em meio PDA depois de 9 dias de incubação a 28°C B) visto ao microscópio óptico 100x

Apêndice B

Curvas Analíticas

1. Curva Analítica de Soro Albumina Bovina

A curva de calibração de Proteínas Totais foi realizada com a metodologia de Bradford e concentrações conhecidas de 0,01 a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Soro Albumina Bovina (BSA). A curva está retratada na Figura 33 e foi mensurada em Espectrofotômetro BEL ENGINEERING® UV-M51 e o reagente de Bradford foi preparado como indicado no item 3.3.1. Esta curva foi utilizada para determinação da contração de proteínas totais presentes nos diferentes meios de cultivos na produção de enzimas.

Curva Analítica de Soro Albumina Bovino (BSA)

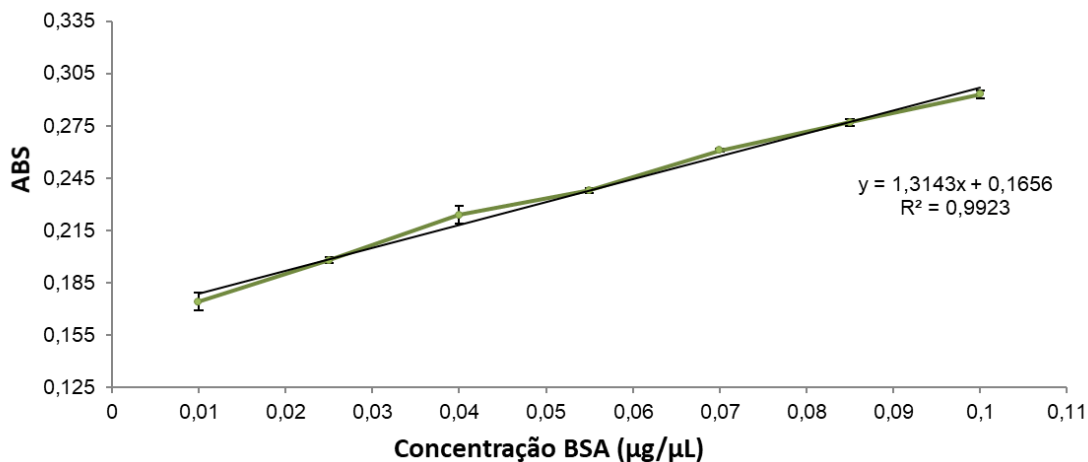


Figura 40. Curva Analítica de Proteínas Totais no Espectrofotômetro BEL ENGINEERING® UV-M51

2. Curva Analítica D-Glicose

Para a determinação da atividade enzimática das EnG, ExG e FPases fúngicas produzidas foi utilizada uma curva analítica de D-glicose, um dos produtos da atividade enzimática. A curva está representada na Figura 34, cuja concentração de D-Glicose variou de 0,55 a 2,775 µmols/mL. A absorbância foi mensurada no Espectrofotômetro BEL ENGINEERING® UV-M51.

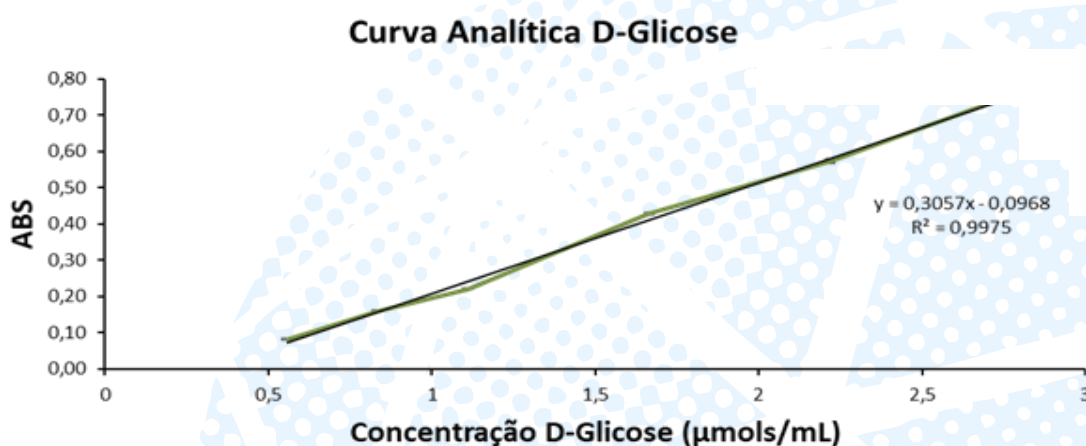


Figura 41. Curva Analítica de D-Glicose.

3. Curva Analítica *p*-nitrofenol

Para a determinação da atividade enzimática da BG foi utilizada uma curva analítica de *p*-nitrofenol. A concentração de glicose produzida pela atividade enzimática da β -glicosidase foi determinada indiretamente pela medida da concentração de *p*-nitrofenol no meio reacional, por leitura em espectrofotômetro a 410 nm. A curva está representada na Figura 35, cuja concentração de *p*-nitrofenol variou de 0,01 a 0,1 $\mu\text{mol/mL}$.

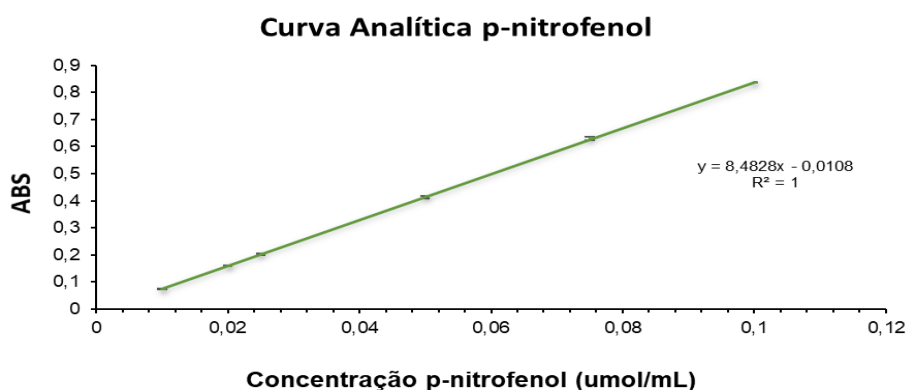


Figura 42. Curva Analítica *p*-nitrofenol.

4. Curva Analítica L-Tirosina

Para a determinação da atividade enzimática das Proteases fúngicas produzidas foi utilizada uma curva analítica de L-Tirosina, um dos produtos da atividade enzimática. A curva está representada na Figura 36, cuja concentração variou de 0,11 a 0,33 $\mu\text{mol/mL}$. A absorbância foi mensurada no Espectrofotômetro BEL ENGINEERING® UV-M51 a 660 nm.

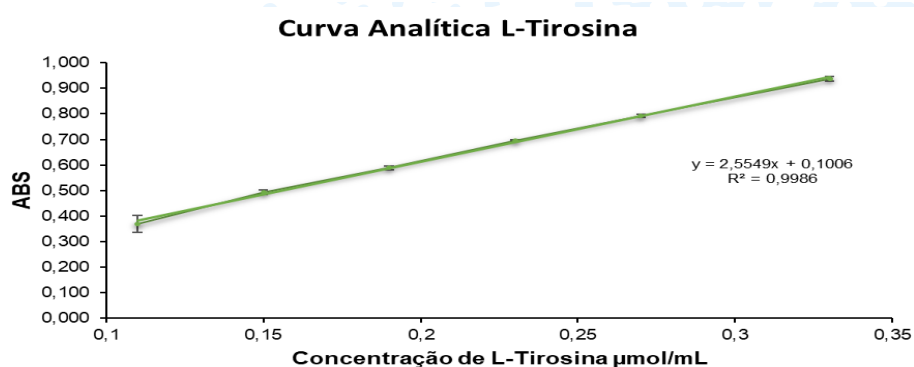


Figura 43. Curva analítica L-Tirosina

Apêndice C

Análise Estatístico utilizando o programa Statgraphics 19 para atividade celulolíticas dos meios de cultivo A, B, C e D

Tabela 27 Análise de variância (ANOVA) para a atividade BG nos quatro diferentes meios de cultivo ao nível de 95% de confiança.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	*Valor-p
Entre grupos	29,7482	3	9,91605	2,5	0,0887
Dentro dos grupos	79,2702	20	3,96351		
Total (Corr.)	109,018	23			

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

Tabela 28 Comparações de médias da atividade enzimática da BG nos quatro diferentes meios feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Contraste	Sig.	Diferença	+/- Limites
Meio A - Meio B		-1,91	2,22
Meio A - Meio C		-0,01	2,22
Meio A - Meio D		-2,84	2,87
Meio B - Meio C		1,91	2,22
Meio B - Meio D		-0,93	2,87
Meio C - Meio D		-2,84	2,87

* indica uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança

Tabela 29. Análise de variância (ANOVA) para a atividade EnG nos quatro diferentes meios de cultivo ao nível de 95% de confiança.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	Valor-p
Entre grupos	2530,01	3	843,336	3,99	0,0222
Dentro dos grupos	4223,17	20	211,159		
Total (Corr.)	6753,18	23			

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

Tabela 30. Comparações de médias da atividade enzimática da EnG nos quatro diferentes meios feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Contraste	Sig.	Diferença	+/- Límites
Meio A - Meio B	*	-9,90	16,20
Meio A - Meio C	*	-14,35	16,20
Meio A - Meio D	*	-32,76	20,92
Meio B - Meio C	*	7,51	16,20
Meio B - Meio D	*	-22,86	20,92
Meio C - Meio D	*	-30,37	20,92

* indica uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança

Tabela 31. Análise de variância (ANOVA) para a atividade FPase nos quatro diferentes meios de cultivo ao nível de 95% de confiança.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	Valor-p
Entre grupos	901,73	3	300,577	4,8	0,0112
Dentro dos grupos	1251,35	20	62,5673		
Total (Corr.)	2153,08	23			

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

Tabela 32. Comparações de médias da atividade enzimática da FPase nos quatro diferentes meios feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Contraste	Sig.	Diferença	+/- Límites
Meio A - Meio B	*	-2,09	8,82
Meio A - Meio C		0,05	8,82
Meio A - Meio D	*	-19,00	11,39
Meio B - Meio C	*	2,14	8,82
Meio B - Meio D	*	-16,91	11,39
Meio C - Meio D	*	-19,05	11,39

* indica uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança

Tabela 33. Análise de variância (ANOVA) para a atividade ExG nos quatro diferentes meios de cultivo ao nível de 95% de confiança.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	Valor-p
Entre grupos	29,4399	3	9,81329	4,87	0,0105
Dentro dos grupos	40,2619	20	2,0131		
Total (Corr.)	69,7018	23			

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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

Contraste	Sig.	Diferença	+/- Limites
Meio A - Meio B		0,32	1,58
Meio A - Meio C		0,33	1,58
Meio A - Meio D	*	-3,11	2,04
Meio B - Meio C		0,02	1,58
Meio B - Meio D	*	-3,42	2,04
Meio C - Meio D	*	-3,44	2,04

* indica uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança

Apêndice D

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

DIA	BG	EnG	FPase	ExG
3	0,002	0,219	2,128	1,219
4	0,006	0,274	4,286	1,920
5	0,010	0,937	5,511	1,630
6	0,011	0,595	7,059	1,104
7	0,155	1,398	3,648	1,345
8	0,119	1,046	4,406	1,516
9	0,120	1,274	5,325	2,034
10	0,203	1,771	1,790	1,895
11	0,099	1,014	1,195	0,706
13	0,330	1,816	4,537	2,762
15	0,332	5,932	7,005	4,923
17	0,477	5,555	7,525	5,997
18	0,613	6,930	8,729	5,680
19	0,164	7,572	6,661	2,483
21	0,225	3,686	7,820	1,941
23	0,284	2,115	3,343	1,063
24	0,329	4,031	2,450	1,124
25	0,190	4,106	2,851	1,213

Apêndice E

Análise Estatístico utilizando o programa Statgraphics 19 para atividade celulolíticas dos ensaios 9 e 23 do DCCR nos dias 13, 14, 15 e 16

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

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	Valor-p
Entre grupos	29027	7	4146,72	15,4	0,00
Dentro dos grupos	14005,5	52	269,337		
Total (Corr.)	43032,5	59			

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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.

Contraste	Sig.	Diferença	+/- Limites
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-13	*	-14,03	16,47
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-14		0,75	16,47
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-14	*	-43,23	16,47
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-15	*	-21,39	16,47
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-15	*	-62,66	16,47
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-16		2,68	17,79
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-16	*	-15,52	17,79
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-14	*	14,78	16,47
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-14	*	-29,20	16,47
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-15	*	-7,36	16,47
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-15	*	-48,63	16,47
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-16	*	16,71	17,79
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-16		-1,49	17,79
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-14	*	-43,98	16,47
Ensaio 9-14 - Ensaio 9-15	*	-22,14	16,47
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-15	*	-63,41	16,47
Ensaio 9-14 - Ensaio 9-16		1,93	17,79
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-16	*	-16,27	17,79
Ensaio 23-14 - Ensaio 9-15	*	21,84	16,47
Ensaio 23-14 - Ensaio 23-15	*	-19,44	16,47
Ensaio 23-14 - Ensaio 9-16	*	45,90	17,79
Ensaio 23-14 - Ensaio 23-16	*	27,70	17,79
Ensaio 9-15 - Ensaio 23-15	*	-41,27	16,47
Ensaio 9-15 - Ensaio 9-16	*	24,07	17,79
Ensaio 9-15 - Ensaio 23-16	*	5,87	17,79
Ensaio 23-15 - Ensaio 9-16	*	65,34	17,79
Ensaio 23-15 - Ensaio 23-16	*	47,14	17,79
Ensaio 9-16 - Ensaio 23-16	*	-18,20	19,01

* indica uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança

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

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	Valor-p
Entre grupos	24767,6	7	3538,23	5,78	0,00
Dentro dos grupos	39158,6	64	611,854		
Total (Corr.)	63926,3	71			

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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.

Contraste	Sig.	Diferença	+/- Limites
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-13	*	8,51	22,10
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-14	*	-11,46	22,10
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-14		-0,61	22,10
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-15	*	-33,37	22,10
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-15		-5,16	22,10
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-16	*	25,82	25,52
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-16	*	35,05	25,52
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-14	*	-19,97	22,10
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-14	*	-9,11	22,10
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-15	*	-41,87	22,10
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-15		-13,66	22,10
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-16		17,31	25,52
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-16	*	26,55	25,52
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-14	*	10,85	22,10
Ensaio 9-14 - Ensaio 9-15	*	-21,90	22,10
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-15	*	6,31	22,10
Ensaio 9-14 - Ensaio 9-16	*	37,28	25,52
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-16	*	46,51	25,52
Ensaio 23-14 - Ensaio 9-15	*	-32,76	22,10
Ensaio 23-14 - Ensaio 23-15		-4,55	22,10
Ensaio 23-14 - Ensaio 9-16	*	26,43	25,52
Ensaio 23-14 - Ensaio 23-16	*	35,66	25,52
Ensaio 9-15 - Ensaio 23-15	*	28,21	22,10
Ensaio 9-15 - Ensaio 9-16	*	59,19	25,52
Ensaio 9-15 - Ensaio 23-16	*	68,42	25,52
Ensaio 23-15 - Ensaio 9-16	*	30,98	25,52
Ensaio 23-15 - Ensaio 23-16	*	40,21	25,52
Ensaio 9-16 - Ensaio 23-16	*	9,23	28,53

* indica uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança

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

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	Valor-p
Entre grupos	12781,6	7	1825,95	524,04	0,00
Dentro dos grupos	139,376	40	3,48439		
Total (Corr.)	12921	47			

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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.

Contraste	Sig.	Diferença	+/- Limites
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-13	*	38,15	2,18
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-14	*	6,97	2,18
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-14	*	35,61	2,18
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-15	*	-2,40	2,18
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-15	*	29,14	2,18
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-16	*	29,82	2,18
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-16	*	38,35	2,18
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-14	*	-31,18	2,18
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-14	*	-2,54	2,18
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-15	*	-40,54	2,18
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-15	*	-9,01	2,18
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-16	*	-8,33	2,18
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-16	*	0,20	2,18
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-14	*	28,64	2,18
Ensaio 9-14 - Ensaio 9-15	*	-9,37	2,18
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-15	*	22,17	2,18
Ensaio 9-14 - Ensaio 9-16	*	22,84	2,18
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-16	*	31,38	2,18
Ensaio 23-14 - Ensaio 9-15	*	-38,01	2,18
Ensaio 23-14 - Ensaio 23-15	*	-6,48	2,18
Ensaio 23-14 - Ensaio 9-16	*	-5,80	2,18
Ensaio 23-14 - Ensaio 23-16	*	2,74	2,18
Ensaio 9-15 - Ensaio 23-15	*	31,53	2,18
Ensaio 9-15 - Ensaio 9-16	*	32,21	2,18
Ensaio 9-15 - Ensaio 23-16	*	40,74	2,18
Ensaio 23-15 - Ensaio 9-16	*	0,68	2,18
Ensaio 23-15 - Ensaio 23-16	*	9,21	2,18
Ensaio 9-16 - Ensaio 23-16	*	8,53	2,18

* indica uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança

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

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	Valor-p
Entre grupos	15540,4	7	2220,06	8,00	0,00
Dentro dos grupos	14438,3	52	277,66		
Total (Corr.)	29978,7	59			

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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.

Contraste	Sig.	Diferença	+/- Limites
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-13	*	10,49	16,72
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-14	*	6,25	16,72
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-14	*	21,26	16,72
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-15	*	-22,86	16,72
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-15	*	4,08	16,72
Ensaio 9-13 - Ensaio 9-16	*	27,69	18,06
Ensaio 9-13 - Ensaio 23-16	*	32,14	18,06
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-14	*	-4,24	16,72
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-14	*	10,77	16,72
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-15	*	-33,35	16,72
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-15	*	-6,42	16,72
Ensaio 23-13 - Ensaio 9-16	*	17,20	18,06
Ensaio 23-13 - Ensaio 23-16	*	21,65	18,06
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-14	*	15,01	16,72
Ensaio 9-14 - Ensaio 9-15	*	-29,11	16,72
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-15	*	-2,17	16,72
Ensaio 9-14 - Ensaio 9-16	*	21,44	18,06
Ensaio 9-14 - Ensaio 23-16	*	25,89	18,06
Ensaio 23-14 - Ensaio 9-15	*	-44,12	16,72
Ensaio 23-14 - Ensaio 23-15	*	-17,19	16,72
Ensaio 23-14 - Ensaio 9-16	*	6,43	18,06
Ensaio 23-14 - Ensaio 23-16	*	10,88	18,06
Ensaio 9-15 - Ensaio 23-15	*	26,94	16,72
Ensaio 9-15 - Ensaio 9-16	*	50,55	18,06
Ensaio 9-15 - Ensaio 23-16	*	55,00	18,06
Ensaio 23-15 - Ensaio 9-16	*	23,61	18,06
Ensaio 23-15 - Ensaio 23-16	*	28,07	18,06
Ensaio 9-16 - Ensaio 23-16	*	4,45	19,30

* indica uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança

Apêndice F

Análise Estatístico utilizando o programa Statgraphics 19 para atividade celulolíticas dos ensaios 9 e 23 do DCCR no dia 15.

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

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor-p
Entre grupos	95852,4	26	3686,63	0,000
Dentro dos grupos	4,12816	108	0,0382237	
Total (Corr.)	95856,6	134		

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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

Número de ensaio	Média	Grupos Homogêneos
Ensaio 16	0,066	X
Ensaio 10	0,086	X
Ensaio 22	0,180	X
Ensaio 18	0,202	X
Ensaio 14	0,280	XX
Ensaio 12	0,300	XX
Ensaio 13	0,498	XX
Ensaio 15	0,636	XX
Ensaio 8	0,748	XX
Ensaio 6	0,756	XX
Ensaio 17	0,768	XX
Ensaio 11	0,908	X
Ensaio 1	1,290	X
Ensaio 24	1,520	XX
Ensaio 20	1,692	XX
Ensaio 3	1,866	XX
Ensaio 5	1,918	XXX
Ensaio 2	2,014	XX
Ensaio 21	2,054	XX
Ensaio 19	2,122	X
Ensaio 7	2,388	X
Ensaio 4	5,288	X
Ensaio 9	30,928	X
Ensaio 26	67,286	X
Ensaio 25	73,326	X
Ensaio 27	75,338	X
Ensaio 23	85,906	X

14 grupos homogêneos foram identificados de acordo com o alinhamento dos X's nas colunas. Não há diferenças estatisticamente significativas com um nível de 95% de confiança entre os níveis que compartilham a mesma coluna de X's.

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

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor-p
Entre grupos	143586	26	5522,55	0,000
Dentro dos grupos	74,1763	135	0,549454	
Total (Corr.)	143660	161		

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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

Número de ensaio	Média	Grupos Homogêneos
Ensaio 6	1,12	X
Ensaio 22	1,29	XX
Ensaio 5	1,33	XX
Ensaio 13	1,52	XXX
Ensaio 18	2,03	XX
Ensaio 24	2,19	X
Ensaio 19	2,33	X
Ensaio 12	3,39	X
Ensaio 15	3,63	XX
Ensaio 20	4,03	XXX
Ensaio 3	4,19	XXX
Ensaio 1	4,36	XX
Ensaio 10	4,68	X
Ensaio 17	6,56	X
Ensaio 11	7,81	X
Ensaio 8	8,79	X
Ensaio 2	8,99	X
Ensaio 16	9,84	X
Ensaio 14	11,36	X
Ensaio 21	11,40	X
Ensaio 4	12,09	X
Ensaio 7	22,75	X
Ensaio 26	55,65	X
Ensaio 25	59,33	X
Ensaio 27	60,54	X
Ensaio 23	79,00	X
Ensaio 9	126,00	X

16 grupos homogêneos foram identificados de acordo com o alinhamento dos X's nas colunas. Não há diferenças estatisticamente significativas com um nível de 95% de confiança entre os níveis que compartilham a mesma coluna de X's.

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

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor-p
Entre grupos	35218,4	26	1354,55	0,000
Dentro dos grupos	25,8739	135	0,191659	
Total (Corr.)	35244,3	161		

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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

Número de ensaio	Média	Grupos Homogêneos
Ensaio 22	0,57	X
Ensaio 5	1,07	XX
Ensaio 18	1,26	X
Ensaio 24	1,48	XX
Ensaio 17	1,85	XX
Ensaio 6	1,95	XXX
Ensaio 13	2,05	XX
Ensaio 19	2,34	XXX
Ensaio 15	2,39	XX
Ensaio 12	2,64	X
Ensaio 20	2,71	X
Ensaio 10	3,63	X
Ensaio 8	4,02	X
Ensaio 1	4,10	X
Ensaio 3	4,96	X
Ensaio 4	5,26	XX
Ensaio 11	5,53	XX
Ensaio 2	5,78	XX
Ensaio 14	6,04	XX
Ensaio 21	6,39	X
Ensaio 16	11,83	X
Ensaio 7	13,33	X
Ensaio 23	29,41	X
Ensaio 26	33,94	X
Ensaio 25	35,03	X
Ensaio 27	37,08	X
Ensaio 9	60,94	X

19 grupos homogêneos foram identificados de acordo com o alinhamento dos X's nas colunas. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis que compartilham a mesma coluna de X's.

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

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor-p
Entre grupos	94535	26	3635,96	0,000
Dentro dos grupos	17,3717	135	0,12868	
Total (Corr.)	94552,3	161		

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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

Número de ensaio	Média	Grupos Homogêneos
Ensaio 1	0,76	X
Ensaio 2	0,78	X
Ensaio 24	1,01	XX
Ensaio 18	1,03	XX
Ensaio 5	1,16	XXX
Ensaio 16	1,33	XX
Ensaio 3	1,47	X
Ensaio 12	1,49	X
Ensaio 10	1,92	X
Ensaio 6	2,40	X
Ensaio 15	2,54	XX
Ensaio 22	2,56	XXX
Ensaio 17	2,57	XXX
Ensaio 14	2,91	XXX
Ensaio 19	2,95	XX
Ensaio 8	3,03	X
Ensaio 21	3,16	X
Ensaio 20	3,61	X
Ensaio 13	3,80	XX
Ensaio 4	4,15	X
Ensaio 11	8,21	X
Ensaio 7	10,99	X
Ensaio 23	47,54	X
Ensaio 26	60,43	X
Ensaio 25	60,96	X
Ensaio 27	64,92	X
Ensaio 9	83,60	X

17 grupos homogêneos foram identificados de acordo com o alinhamento dos X's nas colunas. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis que compartilham a mesma coluna de X's.

Apêndice G

Análise Estatístico utilizando o programa Statgraphics 19 para atividade celulolíticas nas diferentes condições para o composto YNB dos ensaios 9 e 23.

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.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor-p
Entre grupos	30919,6	13	2378,43	0,0003
Dentro dos grupos	161470	70	768,907	
Total (Corr.)	192390	83		

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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.

Condição	Média	Grupos Homogêneos
Condição 5-Ensaio 23	5,59	X
Condição 5-Ensaio 9	6,37	X
Condição 4-Ensaio 23	8,50	X
Condição 4-Ensaio 9	10,35	X
Condição 3-Ensaio 23	11,52	XX
Condição 3-Ensaio 9	12,88	XX
Condição 2-Ensaio 9	13,09	XX
Condição 2-Ensaio 23	11,70	XX
Condição 0-Ensaio9	30,88	X
Condição 0a-Ensaio 9	33,58	X
Condição 1-Ensaio 9	39,93	X
Condição 0a-Ensaio 23	80,08	X
Condição 0-Ensaio 23	82,77	X
Condição 1-Ensaio 23	88,22	X

6 grupos homogêneos foram identificados de acordo com o alinhamento dos X's nas colunas. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis que compartilham a mesma coluna de X's.

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.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor-p
Entre grupos	190665	13	14666,5	0,00
Dentro dos grupos	97,9086	70	1,39869	
Total (Corr.)	190763	83		

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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.

Condição	Média	Grupos Homogêneos
Condição 5-Ensaio 23	5,49	X
Condição 5-Ensaio 9	5,56	X
Condição 4-Ensaio 23	5,70	X
Condição 3-Ensaio 23	6,20	X
Condição 4-Ensaio 9	12,10	X
Condição 3-Ensaio 9	13,39	X
Condição 2-Ensaio 23	21,92	X
Condição 2-Ensaio 9	69,47	X
Condição 0a-Ensaio 23	81,37	X
Condição 0-Ensaio 23	86,06	X
Condição 1-Ensaio 23	89,63	X
Condição 0-Ensaio 9	121,07	X
Condição 0a-Ensaio 9	124,22	X
Condição 1-Ensaio 9	126,97	X

8 grupos homogêneos foram identificados de acordo com o alinhamento dos X's nas colunas. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis que compartilham a mesma coluna de X's.

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.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor-p
Entre grupos	50932,6	13	3917,89	0,00
Dentro dos grupos	34,4747	70	0,492496	
Total (Corr.)	50967,1	83		

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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.

Condição	Média	Grupos Homogêneos
Condição 3-Ensaio 23	4,85	X
Condição 5-Ensaio 23	5,84	X
Condição 4-Ensaio 23	6,91	X
Condição 2-Ensaio 23	7,92	X
Condição 5-Ensaio 9	12,60	X
Condição 4-Ensaio 9	12,88	X
Condição 3-Ensaio 9	13,27	X
Condição 2-Ensaio 9	14,66	X
Condição 0a-Ensaio 23	39,22	X
Condição 0-Ensaio 23	42,48	X
Condição 1-Ensaio 23	45,59	X
Condição 0a-Ensaio 9	68,43	X
Condição 0-Ensaio 9	68,79	X
Condição 1-Ensaio 9	70,96	X

9 grupos homogêneos foram identificados de acordo com o alinhamento dos X's nas colunas. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis que compartilham a mesma coluna de X's.

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.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor-p
Entre grupos	89824,7	13	6909,59	0,00
Dentro dos grupos	41,1279	70	0,587541	
Total (Corr.)	89865,9	83		

*p valores menores que 0,05 indicam uma diferença estatisticamente significativa

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.

Condição	Média	Grupos Homogêneos
Condição 5-Ensaio 23	2,29	X
Condição 5-Ensaio 9	3,08	X
Condição 3-Ensaio 9	3,91	XX
Condição 4-Ensaio 9	4,41	X
Condição 2-Ensaio 23	5,29	X
Condição 4-Ensaio 23	6,68	X
Condição 3-Ensaio 23	7,27	X
Condição 2-Ensaio 9	19,04	X
Condição 0a-Ensaio 23	47,49	X
Condição 0-Ensaio 23	49,46	X
Condição 1-Ensaio 23	51,32	X
Condição 0a-Ensaio 9	83,27	X
Condição 0-Ensaio 9	86,49	X
Condição 1-Ensaio 9	87,30	X

10 grupos homogêneos foram identificados de acordo com o alinhamento dos X's nas colunas. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis que compartilham a mesma coluna de X's.



Anexo 2

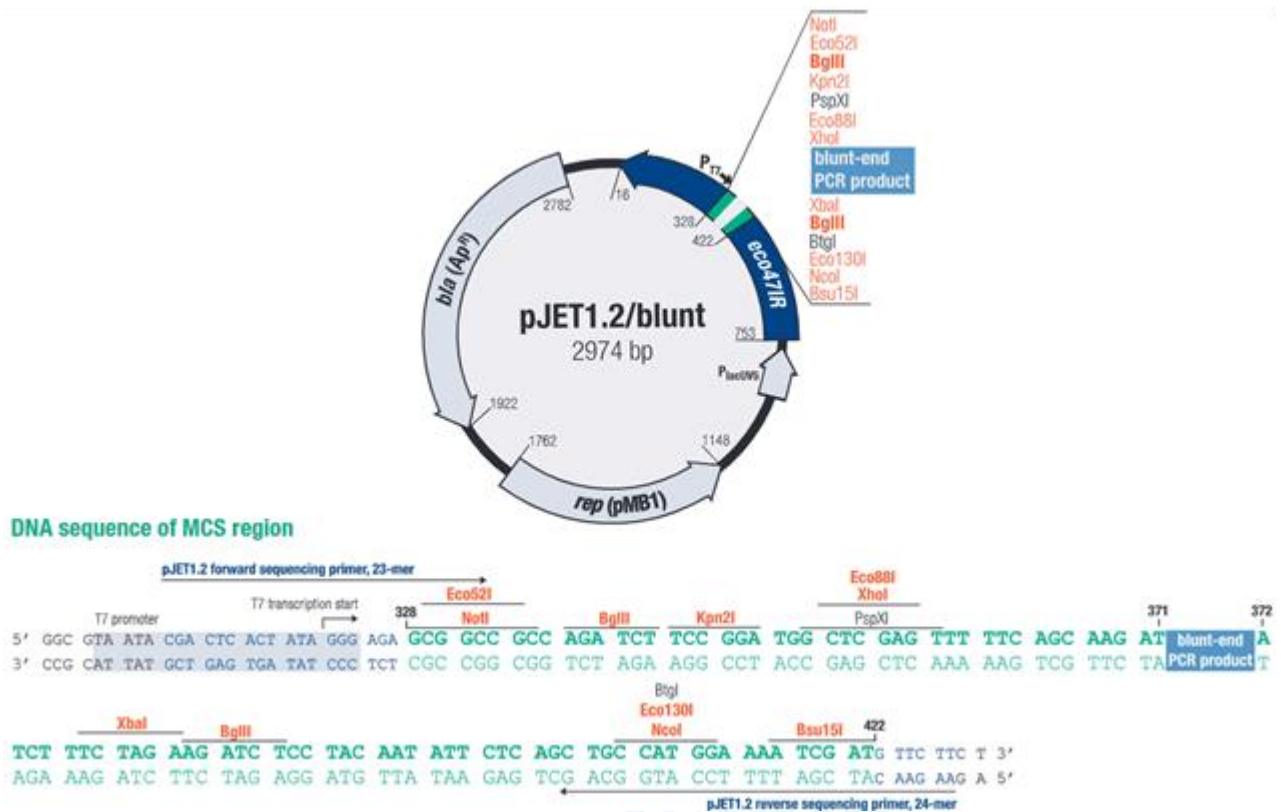


Figura 45. Diagrama do vetor de clonagem pJET1.2/blunt.

O vetor de 2974 pb contém uma região de clonagem múltipla (MCS). Esta sequência, abrangendo os nucleotídeos 322-428, possui muitos sítios de enzimas de restrição (vermelho). Os produtos de PCR ligam-se entre os nucleótidos 371 e 372 do vector. Este vetor de clonagem foi fornecido no CloneJet™ PCR Cloning Kit (Fermentas).