Felipe Senne de Oliveira Lino

**Engenharia Evolutiva Aplicada a *Trichoderma* sp.
para Produção de Celulases**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2012

Felipe Senne de Oliveira Lino

**Engenharia Evolutiva Aplicada a *Trichoderma* sp.
para Produção de Celulases**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Beatriz Vahan
Kilikian

Versão corrigida

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lino, Felipe Senne de Oliveira.

Engenharia evolutiva aplicada a *Trichoderma* sp. para produção de Celulases / Felipe Senne de Oliveira Lino. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Beatriz Vahan Kilikian.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia Industrial

Versão do título para o inglês: Evolutionary engineering applied on *Trichoderma* sp. for cellulase production.

Descritores: 1. *Trichoderma* 2. Celulase 3. Mutagênese 4. Engenharia Evolutiva I. Kilikian, Beatriz Vahan II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB011/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Felipe Senne de Oliveira Lino.

Título da Dissertação: Engenharia evolutiva aplicada a *Trichoderma* sp. para produção de Celulases.

Orientador(a): Beatriz Vahan Kilikian.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais Carlos e Silvia

Agradecimentos

Inicialmente agradeço aos meus pais e família pelo apoio e incentivos constantes.

Agradeço também à Profa. Dra. Beatriz Vahan Kilikian pela orientação e ajuda.

Aos professores e funcionários do GENBio pelo apoio.

Aos meus colegas do GENBio (prefiro LEB). Tanto os do novo testamento, assim como os do Velho Testamento, assim como o do Muito Muito Velho Testamento. Tenho o prazer e honra de ter começado o trabalho com vários colegas e tê-lo terminado com alguns bons amigos.

Aos meus amigos, sempre presentes.

Às funcionárias da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas.

A todos que ajudaram na confecção do trabalho de alguma forma.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

"Insanity laughs under pressure we're cracking"

Queen and Mr. Bowie

"Stay Hungry. Stay Foolish."

Steve Jobs

Resumo

LINO, F. S. O. **Engenharia Evolutiva Aplicada a *Trichoderma* sp. para Produção de Celulases** 2012 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Na substituição de energias clássicas para transporte – gasolina e diesel - o etanol de biomassa (“etanol 2G”) obtido a partir de açúcares não diretamente fermentescíveis, sobretudo os polissacarídeos de celulose e hemicelulose, despertou grande interesse nos últimos anos. Contudo, sua produção viável exige avanços no pré-tratamento da biomassa, redução do custo das enzimas para sacarificação da celulose e hemicelulose e fermentação eficiente das pentoses. Este projeto tem por objetivo aumentar a produção específica de celulases em fungos do gênero *Trichoderma*, especificamente *Trichoderma harzianum* IPT 821 e *Trichoderma reesei* QM 9414, através de mutação por radiação UV, seguida de indução a mutações por meio de pressão ambiental (limitação da fonte de carbono, celulose) aplicada a sucessivas gerações. Na etapa inicial do plano, esporos foram submetidos à radiação UV-C, gerando a primeira biblioteca de mutações. Células das colônias mais capacitadas ao crescimento após a radiação UV foram sucessivamente cultivadas em meio solidificado, contendo concentrações progressivamente reduzidas da única fonte de carbono, celulose solúvel, de modo a resultar pressão ambiental seletiva e crescente. Após a etapa de pré-seleção usando-se meio solidificado, foram obtidas e isoladas 20 linhagens, as quais foram cultivadas em meio semi-sólido composto por bagaço de cana/farelo de trigo, na proporção 80/20, 60% de umidade, 30 °C e 72h de cultivo. Foi isolada uma linhagem, originária da cepa IPT 821 com atividade celulolítica de $3,7 \pm 0,57$ U/gms (unidades FP por grama de massa seca), a qual é 50% superior em relação à cepa parental: $2,6 \pm 0,27$ U/gms ($p=0,001$; para $p<0,05$). Análises referentes à composição das frações enzimáticas também indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$; $p<0,05$) na atividade de xilanase: $4,65 \pm 0,8$ U/gms para a mutante (*T. harzianum* IPT 821/10) versus $3,99 \pm 0,77$ U/gms (cepa parental *T. harzianum* IPT 821/1). Ensaio de hidrólise, usando-se Avicel como substrato (concentração final de 1% de sólidos; w/v) indicaram um aumento de quase 70% na hidrólise em 48h, da mutante em comparação à parental (conversão de celulose em glicose de 8,3% da mutante versus 4,8% da parental, usando-se uma concentração enzimática em FP de 2,5 U/gms). Este projeto, apesar de apresentar uma possível técnica para obtenção de linhagens produtoras de celulases ainda exige um estudo mais aprofundado acerca das possíveis diferenças bioquímicas e genéticas da linhagem mutante selecionada em comparação à parental.

Palavras-chave: *Trichoderma*. Celulase. Mutagênese. Engenharia Evolutiva

Abstract

LINO, F. S. O. **Evolutionary Engineering Applied in *Trichoderma* sp. for the Production of Cellulase**. 2012. 83 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In the replacement of classical transportation energies – like gasoline and diesel – biomass ethanol (ethanol 2G), obtained from non-direct fermentable substrates, such as cellulose and hemicellulose, had its interest sharply increased in last few years. However, its economically feasible production requires advances in pretreatment technologies and cost reduction of enzymes employed for biomass saccharification and efficient pentose fermentation. This project aims to increase the specific production of cellulase in fungus belonging to *Trichoderma* genus, specifically *Trichoderma harzianum* IPT 821 and *Trichoderma reesei* QM 9414, through UV radiation mutagenesis, followed by induced mutations from selective pressure (carbon source limitation – cellulose), through several generations. Initially, spores were exposed to UV-C radiation, thus creating a library of mutants. After UV exposure, colonies were plated and those showing best growth were selected. They were successively cultivated in plates containing increasingly stress conditions –reduced concentrations of the carbon source, soluble cellulose – thus creating a progressive selective pressure. After this pre-selection step, 20 strains were isolated, which were cultivated in solid state fermentation, with medium comprising sugar cane bagasse and wheat straw, in the proportion of 80/20 respectively, 60% of moisture, 30 °C for 72h. One strain, originated from *T. harzianum* IPT 821, was isolated and showed an increased cellulolytic activity: $3,7 \pm 0,57$ U/gdw (units of FP per gram of dry weight); which was about 50% superior to the parental strain: $2,6 \pm 0,27$ U/gdw ($p=0,001$; for $p<0,05$). Analysis of different fractions of the enzymatic cocktail also showed statistically significant differences ($p=0,001$; for $p<0,05$) on xylanase activity: $4,65 \pm 0,8$ U/gdw for the mutant strain (*T. harzianum* IPT 821/10) versus $3,99 \pm 0,77$ U/gdw (parental strain IPT 821/1). Hydrolysis assays, using Avicel as substrate (final solid concentration of 1% w/v) showed an increase on hydrolysis of about 70%, in 48h (8,3% conversion of cellulose to glucose for mutant strain IPT 821/10 versus 4,8% for parental strain, using a FP enzyme load of about 2,5 U/gdw). This project, while presenting a possible method for the generation and selection of cellulase producing strains, still requires a more profound biochemical and genetic analysis of the selected strain and its parental strain.

Key words: *Trichoderma*. Cellulase. Mutagenesis. Evolutionary Engineering.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Comparação entre os rendimentos na produção de etanol a partir de matérias amiláceas e de açúcares diretamente fermentescíveis	20
Figura 2 - Redução de custo das celulasas empregadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica para produção economicamente viável de etanol 2G	23
Figura 3 - Mecanismo de ação sinérgica das celulasas para hidrólise da biomassa lignocelulósica	24
Figura 4 - Esquema genérico apresentando os principais mecanismos reguladores da expressão dos genes das enzimas celulasas	29
Figura 5 - Mecanismo de dano à molécula de DNA pela radiação UV	34
Figura 6 - Fluxo de ações do projeto de Mestrado	37
Figura 7 - Esquema representativo indicando uma placa de Petri contendo meio solidificado com esporos na parte inferior, coberto pela camada de seleção	39
Figura 8 - Taxa de letalidade de esporos de <i>T. reesei</i> QM9414 expostos à radiação UV-C	45
Figura 9 - Taxa de letalidade de esporos de <i>T. harzianum</i> IPT 821 expostos à radiação UV-C	45
Figura 10 - Taxa de letalidade de esporos de <i>T. reesei</i> QM9414 expostos à radiação UV-C	46
Figura 11 - Taxa de letalidade de esporos de <i>T. harzianum</i> IPT 821 expostos à radiação UV-C	46
Figura 12 - Taxa de letalidade de esporos de <i>T. reesei</i> QM9414 expostos à radiação UV-C em períodos maiores	47
Figura 13 - Taxa de letalidade de esporos de <i>T. harzianum</i> IPT 821 expostos à radiação UV-C em períodos maiores	47
Figura 14 - Cultivo das cepas <i>T. reesei</i> QM9414 UV e <i>T. harzianum</i> IPT 821 UV em placas contendo camada de seleção	49
Figura 15 - Atividade enzimática FP (U/gms) dos isolados de <i>T. reesei</i> QM9414	51

Figura 16 - Comparação entre as atividades enzimáticas FP (U/gms) dos isolados de <i>T. harzianum</i> IPT 821	52
Figura 17 - Atividades enzimáticas FP (U/gms) obtidas nos cultivos das cepas <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	53
Figura 18 - Valores médios de atividade enzimática FP (U/gms), no teste t Student, para as cepas IPT 821/1 e IPT 821/10	54
Figura 19 - Valores médios da atividade enzimática FP (U/gms) das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10 obtidas em 12 cultivos	55
Figura 20 - Comparação entre as médias dos valores de FP dos cultivos das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10	56
Figura 21 - Valores médios da atividade de endocelulase (CMCase) em U/gms dos doze cultivos de <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	57
Figura 22 - Comparação entre as médias dos valores de CMCase obtidos nos cultivos das cepas de <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	57
Figura 23 - Valores médios de atividade de xilanase (U/gms) dos doze cultivos das cepas de <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	58
Figura 24 - Comparação entre as médias dos valores de xilanase obtidos nos cultivos das cepas de <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	59
Figura 25 - Comparação entre as conversões obtidas nos ensaios de hidrólise de Avicel com extratos enzimáticos das cepas de <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	61

Lista de tabelas

Tabela 1 - Atividade enzimática (FP U/gms) dos isolados de <i>T. reesei</i> QM9414	51
Tabela 2 - Atividade enzimática (FP U/gms) dos isolados de <i>T. harzianum</i> IPT 821	52
Tabela 3 - Resultados das análises de FP das repetições do cultivo das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10	53
Tabela 4 - Valores de FP obtidos após os novos cultivos das cepas IPT 821/1 e /10	55
Tabela 5 - Valores de CMCase obtidos nos cultivos das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10	56
Tabela 6 - Valores de atividade de xilanase obtidos nos cultivos das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10	58
Tabela 7 - Hidrólise do substrato Avicel pelo extrato enzimático bruto da cepa parental <i>T. harzianum</i> IPT 821/1	60
Tabela 8 - Hidrólise do substrato Avicel pelo extrato bruto enzimático da cepa mutante <i>T. harzianum</i> IPT 821/10	60

Lista de abreviaturas e símbolos

Abs – absorbância

BCA – bagaço de cana-de-açúcar

BG – beta glicosidase

CBH – celobiohidrolase

CER – velocidade de evolução de dióxido de carbono

CMC – carboxi-metil-celulose

EG – endoglucanase

FT – farelo de trigo

FP – “filter paper”

GEnBio – Grupo de Engenharia de Bioprocessos

Gms – grama de massa seca

HPLC – “High Performance Liquid Chromatography”

OUR – velocidade de consumo de oxigênio

Rpm – rotações por minuto

SSF – “simultaneous saccharification and fermentation”

XYN – xilanase

U – unidade de atividade enzimática

UNICA – União da Indústria de Cana de Açúcar

UV – ultravioleta

λ – comprimento de onda

μ - velocidade específica de crescimento celular

2G – segunda geração

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Energia e biocombustíveis	19
2.2 Etanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração (Etanol 2G)	20
2.3 Celulases	24
2.4 O gênero <i>Trichoderma</i>	25
2.4.1 <i>Regulação da expressão de celulases</i>	27
2.4.1.1 <i>Cre1</i>	27
2.4.1.2 <i>Ace1 e Ace 2</i>	27
2.4.1.3 <i>Complexo HAP2/3/5</i>	28
2.5 Geração de variabilidade e seleção de microrganismos	29
2.6 Mutações	30
2.7 Engenharia evolutiva	31
2.7.1 <i>Mutagênese induzida por radiação ou compostos químicos</i>	33
2.8 Mecanismos de seleção	35
3 OBJETIVOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Microrganismos e manutenção	37
4.2 Meios de cultura	38
4.3 Mutagênese através de radiação UV	38
4.4 Cultivos sob pressão ambiental	39
4.5 Cultivo em meio semi-sólido	40
4.6 Medidas das atividades enzimáticas	40
4.7 Ensaio de hidrólise e análise em HPLC	42
4.8 Cálculo de conversão de celulose em glicose	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Irradiação e geração de mutantes	43
5.2 Seleção dos mutantes irradiados, em meio sintético contendo celulose como fonte de carbono	48

5.3 Cultivos em meio semi-sólido dos mutantes selecionados em 5.2	50
5.4 Análise e comparação das frações enzimáticas da cepa selecionada e da cepa parental	55
5.4.1 <i>Comparação entre as frações de atividade de papel de filtro (FP) das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10</i>	55
5.4.2 <i>Comparação entre as frações de CMCase das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10</i>	56
5.4.3 <i>Comparação entre as frações de xilanase das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10</i>	58
5.5 Hidrólise de celulose pelo extrato enzimático de <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	59
6 CONCLUSÕES	61
6.1 Ensaios de mutagênese e seleção em placas com pressão seletiva	61
6.2 Cultivos em meio semi-sólido	62
6.3 Comparação entre as frações enzimáticas das cepas <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	62
6.4 Comparação entre a hidrólise de Avicel pelas cepas <i>T. harzianum</i> IPT 821/1 e IPT 821/10	62
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICES	73

1 INTRODUÇÃO

As reservas de petróleo são limitadas e sua utilização causa problemas ambientais. O uso de biomassa ou resíduos urbanos como matéria prima para produção de energia, ao contrário, leva à produção de energias renováveis e sustentáveis (SHEEHAN et al., 1998), para cujo uso há crescente investimento em tecnologias de conversão (PUHAN et al., 2005).

Biocombustíveis podem ser sólidos, líquidos ou gasosos dentre os quais predominam os seguintes: etanol, metanol, biodiesel, hidrogênio e metano (DEMIRBAS, 2007). No Brasil destaca-se o investimento na tecnologia do etanol, uma das commodities de maior volume de exportação, atingindo volume total superior a 27 bilhões de litros em 2008, safra recorde ainda hoje (UNICA).

Na produção de etanol de biomassa celulósica, um dos fatores limitantes é o custo proibitivo das enzimas (celulases) utilizadas necessárias à sacarificação (SUKUMARAN et al., 2009, ZHOU et al., 2008).

Celulases são um conjunto de enzimas formado por: endoglucanases (EC 3.2.1.4) que hidrolisam regiões internas do polímero da celulose, expondo as extremidades redutoras e não-redutoras da cadeia; exoglucanases (EC 3.2.1.91) e celobiohidrolases (EC 3.2.1.150) atuam nas extremidades redutoras e não-redutoras, liberando celobioses e celooligossacarídeos; e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) que clivam a celobiose em moléculas de glicose, o produto final da hidrólise (SCHULEIN, 1988).

A redução no custo de produção das enzimas aplicadas ao processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica só será alcançada com investimentos em novos processos na produção das enzimas, incluindo o uso de substratos baratos e programas de melhoramento de linhagens de microrganismos produtores através de, por exemplo, engenharia evolutiva. A proporção do custo das enzimas no custo da produção do etanol também pode ser reduzida por meio da definição de uma mistura das frações enzimáticas em proporções adequadas a um determinado substrato e determinado pré-tratamento para ele definido.

Engenharia evolutiva é a aplicação do princípio natural de “design” biológico (TOBIN et al., 2000) que envolve a diversificação genética e a seleção funcional de sistemas biológicos

em laboratório.

Bailey et al. (1991, 2002) dividiram a engenharia evolutiva em duas categorias: melhoramento de linhagens através do uso de genes heterólogos e reestruturação do fluxo metabólico.

Através da engenharia evolutiva é possível desenvolver, melhorar e estabilizar linhagens com características de interesse, ou descobrir novas rotas metabólicas (ZELDER e HAUER, 2000), com as seguintes vantagens de aplicação: (1) produção de proteínas recombinantes; (2) modificação no padrão de utilização de um substrato (e.g. inversão da enantiosseletividade); (3) desenvolvimento de novas propriedades biossintéticas e catabólicas; (4) redução da formação de produtos indesejáveis; (5) melhoramento na produtividade e rendimento de reações (NIELSEN, 2001).

Qualquer que seja o tipo de resultado esperado verifica-se a mesma abordagem, a qual consiste de três etapas: desenvolvimento de uma linhagem melhorada através do cultivo em condições ambientais específicas, análise do desempenho da linhagem melhorada nas condições desejadas e repetição do processo para estabilização (PETRI e SCHMIDT-DANNERT, 2004).

No cultivo sob pressão ambiental, promove-se estresse ao organismo (e.g. temperaturas extremas, presença de antibióticos), o qual pode ser aplicado de duas formas (ÇAKAR et al. 2005): estresse constante (sub-letal) por um longo período ou aumento gradual do estresse após cada geração isolada, que apresente o fenótipo de interesse. Em meios solidificados, a seleção dos mutantes obtidos por meio da pressão ambiental é facilitada, pois a característica de interesse dos clones pode ser verificada de forma direta (i.e. distinção da colônia possuidora do fenótipo de interesse em detrimento às outras), uma vez que é possível trabalhar com colônias isoladas (SAUER, 2001). Já cultivos em regime contínuo, em meio líquido, facilitam a imposição de uma dada condição de pressão ambiental a sucessivas gerações, além de gerarem amostras às quais um maior número de fatores pode ser analisado (e.g. ômicas, produção de metabólitos, cinética de consumo e crescimento, etc.).

O melhoramento de linhagens através de mutagênese por radiação UV é

método tradicional e amplamente utilizado, permitindo que resultados interessantes sejam alcançados (ADSUL et al., 2007; ZHANG et al., 2006), e é, ainda hoje, a técnica que apresenta os melhores resultados para produção de organismos super-produtores de celulasas (KÓVACS et al., 2008).

Para aplicação da pressão ambiental, subsequente à radiação UV, foi considerada uma das estratégias descritas por Çakar et al. (2005), qual seja a de aplicar pressão gradualmente crescente ao longo das gerações selecionadas. A outra estratégia, qual seja, a de aplicação de pressão moderada por sucessivas gerações de células em crescimento sob valores reduzidos da velocidade específica de crescimento, μ , encontra dificuldades na operação de reatores em regime contínuo usando-se fungos filamentosos. A aplicação da radiação UV anteriormente ao processo de indução e seleção de mutantes adaptados poderá, em tese, resultar maior variabilidade genética.

Além disso, para selecionar organismos hipersecretores de celulasas e não selecionar organismos com outras adaptações que não interessem a esse projeto (e.g. maior tolerância em autólise, maior velocidade de absorção do carbono presente no meio), aplicou-se metodologia de camada de seleção (TOYAMA; YAMAGISHI; TOYAMA, 2002). Esta técnica consiste em confeccionar uma placa contendo meio de cultura solidificado em duas camadas. A primeira camada recebe o inóculo contido em meio líquido o qual é derramado na placa, e uma segunda camada de meio de cultura de mesma composição, é derramada sobre a camada inicial, constituindo a camada de seleção. Após um período de incubação as colônias isoladas que surgiram na superfície da camada de seleção e, desse modo, apresentaram melhor crescimento, foram escolhidas para posteriores cultivos sob pressão ambiental. O propósito desta técnica é selecionar características como aumento da produção de celulasas ou produção de celulasas com atividade específica maior.

Foram feitos ensaios em reator de colunas de leito fixo do tipo Raimbault, com aeração forçada, com o objetivo de se calcular a velocidade de consumo de oxigênio (OUR) e velocidade de produção de CO₂ (CER) e, desta forma, obter-se parâmetros como produção de biomassa e coeficiente de manutenção permitindo o cálculo de unidades de atividade de enzimas por

grama de célula. Porém, devido a problemas no controle da vazão de ar e manutenção da umidade do meio, os resultados foram inconclusivos e, portanto, descartados. Além desses ensaios, também foram feitas análises das atividades enzimáticas de xilanase e CMCase, e ensaios de hidrólise, tendo Avicel como substrato.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Energia e biocombustíveis

Petróleo e gás natural representam cerca de 55% do consumo mundial de energia. Dentre vários problemas gerados pelo uso de tais recursos destacam-se: dependência externa dos países consumidores a políticas de cartéis dos países exportadores; alterações climáticas pela contínua emissão de gases do efeito estufa na atmosfera; esgotamento dos combustíveis fósseis, com consequente colapso do modelo atual (NOGUEIRA et al., 2008).

Uma alternativa a essas fontes é o uso de bioenergia, isto é, energia proveniente de biomassa, através de produção sustentada de biocombustíveis (FUKUDA et al., 2009).

O biocombustível mais usado é o etanol, empregado na forma hidratada, ou, anidra quando adicionada à gasolina. Por aumentar o volume relativo de oxigênio no combustível, ele diminui a necessidade da aplicação de aditivos. O maior volume de oxigênio também permite uma melhor oxidação dos hidrocarbonetos da gasolina, com uma consequente redução na emissão de CO, compostos a base de enxofre e compostos aromáticos através de sua queima, quando adicionado à mesma (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

Dentre os principais produtores de etanol destacam-se os Estados Unidos, com uma matriz de produção a partir do amido do milho, e o Brasil, produzindo etanol através dos açúcares fermentescíveis da cana-de-açúcar. A produção de etanol no Brasil atingiu, em 2010, o volume de quase 28 bilhões de litros (27,39 BL; UNICA) sendo uma das commodities de maior volume de exportação. Mediante rotas biológicas, o etanol pode ser produzido com base em qualquer biomassa que contenha quantidades significativas

de amido ou açúcares. Atualmente, há um discreto predomínio da produção com base em materiais amiláceos (53% do total) tais como o milho (etanol combustível), o trigo e outros cereais e grãos (etanol farmacêutico e para consumo humano, na forma de destilados). Apesar da atual tendência mundial em produzir etanol a partir de materiais amiláceos (e.g. milho) ou beterraba, os ganhos ambientais são pequenos, devido ao processo de hidrólise do substrato, para liberação dos açúcares fermentescíveis, processo esse consumidor de energia oriunda da queima de combustíveis fósseis. Além disso, esses substratos encontram alternativas de mercado mais nobres como alimentos (NOGUEIRA et al. 2008). A sacarose, açúcar diretamente fermentescível da cana-de-açúcar, é o substrato mais adequado para a produção de etanol, entretanto, a cana-de-açúcar não é apta a todos os climas do planeta, sendo que atualmente o maior investimento, é no desenvolvimento do processo de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.

Figura 1 - Comparação entre os rendimentos na produção de etanol a partir de matérias amiláceas e de açúcares diretamente fermentescíveis.

FONTE: Adaptado de AgDM (2012).

2.2 Etanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração (Etanol 2G)

Materiais lignocelulósicos são empregados na obtenção de etanol desde o final do século XIX (SAEMAN, 1945), porém apenas no final do século XX a biomassa

lignocelulósica passou a ser considerada de fato como alternativa na substituição de combustíveis líquidos derivados de petróleo. Anteriormente, isto é, em meados da década de 70, havia vários grupos de pesquisa estudando a hidrólise ácida da celulose e hemicelulose, inclusive no Brasil, onde se estudou a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, contudo, a redução do preço do petróleo no cenário internacional, tornou desinteressante o uso dessa matéria, reconhecidamente recalcitrante. Atualmente os principais programas para desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol de celulose encontram-se nos Estados Unidos.

Etanol 2G poderá ser produzido em qualquer local do mundo, levando-se em conta a disponibilidade de resíduos lignocelulósicos gerados pela agroindústria (MACEDO, 2005). No caso do Brasil são o bagaço e a palha da cana-de-açúcar as matérias-primas mais visadas para o etanol 2G. A biomassa lignocelulósica é composta por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e lignina, polímero constituído por um complexo entre grupos metoxi e fenilpropânicos, que mantém as células unidas.

As tecnologias para obtenção de etanol com base em materiais lignocelulósicos compreendem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em ao menos duas etapas. A hidrólise pode ser baseada no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina.

A primeira etapa do processo consiste no pré-tratamento mecânico da matéria-prima, que visa causar a destruição da sua macro estrutura e torná-la mais acessível aos tratamentos químicos ou biológicos. A etapa seguinte consiste na remoção da lignina e na hidrólise da hemicelulose, que também pode ser denominada pré-tratamento. Para essa etapa, existem diversos processos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e conseqüente impacto nas etapas subseqüentes (NOGUEIRA et al. 2008). Tais processos podem ser físicos (e.g. explosão a vapor, termo hidrólise), químicos (e.g. hidrólise ácida, alcalina, solventes orgânicos, enzimas) ou mistos (explosão a vapor catalisada, Afex, explosão de CO₂) (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

A hidrólise ácida (tanto concentrada quanto diluída) ocorre em dois estágios para aproveitar as diferenças entre a hemicelulose e a celulose. O primeiro envolve a

hidrólise da hemicelulose. No segundo estágio temperaturas mais altas são aplicadas para hidrólise da fração celulósica (DIPARDO, 2000). O processo com ácido diluído ocorre sob temperaturas e pressões elevadas, com tempos de reação de segundos a alguns minutos, o que facilita a operação contínua. Já os processos com ácido concentrado são conduzidos em condições de temperatura e pressão mais brandas que o processo com ácido diluído, mas com tempos de reação mais longos (GRAF e KOEHLER, 2000).

Na hidrólise enzimática, empregam-se as celulases, constituídas por um conjunto de enzimas composto por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (PHILIPPIDIS e SMITH, 1995). Assim como nos processos ácidos, existe a necessidade de um pré-tratamento para expor a celulose ao ataque das enzimas, assim como a remoção da lignina. Como o processo enzimático é conduzido em condições brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45 °C e 50 °C), o custo referente à manutenção da infra-estrutura e ao gasto energético é relativamente baixo (SUN e CHENG, 2002). Já que o rendimento em açúcares é elevado, é possível a fermentação alcoólica simultânea à sacarificação (processo SSF - simultaneous saccharification and fermentation) e, finalmente, não se verificam os problemas ambientais, como no processo de hidrólise ácida, produtora de resíduos poluentes. Por conta de seu grande potencial e redução de custos, muitos especialistas vêem a hidrólise enzimática como parte essencial da produção de etanol 2G a um custo competitivo num futuro próximo (DIPARDO, 2000; LYND et al., 1996). Porém, atualmente a aplicação desta tecnologia em grande escala ainda é limitada pelo custo proibitivo das enzimas utilizadas em tal processo (SUKUMARAN et al., 2009, ZHOU et al., 2008).

Figura 2 - Redução de custo das celulases empregadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica para produção economicamente viável de etanol 2G (coquetel Cellic)

FONTE: Novozymes (2009).

Há também a questão técnico-econômica da concentração final de açúcares no meio para que a concentração de etanol atinja concentrações de cerca de 4 a 5% (m/v) (LU et al., 2010) e o processo destilação seja economicamente viável. Para tal, é necessária uma alta concentração de sólidos no meio reacional. A produção de etanol a partir de matérias amiláceas já faz uso de meios com alta concentração de sólidos, por volta de 30% (m/v) ou mais (BAYROCK e INGLEDEW, 2001). Esta alta concentração de sólidos facilita os processos de *downstream* e recuperação do produto, reduzindo desta forma o custo final de produção. Porém, existem dificuldades técnicas em se operar com tal concentração de sólidos. Em processos de hidrólise de matérias lignocelulósicas, concentrações superiores a 15% (m/v) o aumento da viscosidade do caldo dificulta o processo de homogeneização e aumenta consideravelmente o custo com energia para produção de etanol, reduzindo a eficiência energética do processo (LU et al., 2010). Algumas alternativas propostas são processos de hidrólise por batelada alimentada (RUDOLF et al., 2005) e processos de sacarificação e fermentação simultânea, a qual receberia alimentação constante, a medida que o substrato é consumido e convertido em etanol (JØRGENSEN et al., 2007). Mas, à medida que a concentração de sólidos aumenta a eficiência na hidrólise cai acentuadamente (atingindo cerca de 30% de rendimento) e, por este motivo, ainda não existe processo economicamente viável para a hidrólise em escala industrial de substrato lignocelulósico para produção de etanol (LU et al., 2010).

2.3 Celulases

Celulases são enzimas extensivamente utilizadas nas indústrias têxteis, de alimentos, ração animal e na hidrólise da celulose. A degradação completa dos polímeros de celulose e hemicelulose exige a atuação sinérgica de várias enzimas (SUKUMARAN et al., 2009).

Celulases são um grupo de enzimas que inclui: (1) endoglucanases (EC 3.2.1.4) que hidrolisam o polímero da celulose nas suas ligações internas, expondo as extremidades redutoras e não-redutoras do polímero linear de glicose; (2) exoglucanases (EC 3.2.1.91) e celobiohidrolases (EC 3.2.1.150) atuam nessas extremidades, liberando celobioses e celooligossacarídeos; e (3) β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (BGL) que clivam a celobiose em moléculas de glicose, o produto final da hidrólise (SCHULEIN, 1988).

Figura 3 - Mecanismo de ação sinérgica das celulases para hidrólise da biomassa lignocelulósica.

FONTE: Adaptado de Rabinovich; Melnick; Bolova (2002). 1: o polímero da celulose apresenta regiões amorfas (região central, em X). 2: O ataque inicia-se na região amorfa, de maneira inespecífica, através de endoglucanases (vermelhas) que não possuem domínios de ligação com a celulose. 3: endocelulases possuidoras de domínio de ligação com celulose (principalmente I e II, das famílias 5 e 7; azul) atuam na região exposta. 4: A hidrólise e liberação de açúcares solúveis continua nas extremidades redutoras e não redutoras da celulose, através da ação celobiohidrolases I (não redutoras, família 7; amarelo) e celobiohidrolases II (redutoras, família 6; verde). Os oligômeros são finalmente convertidos em glicose pela ação de β -glicosidases (não mostrado).

A produção industrial de celulases dá-se hoje através do uso de uma variedade de

organismos como fungos filamentosos (e.g. *Fusarium*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Melanocarpus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, etc.), bactérias (e.g. *Acidothermus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Rhodothermus*) e actinomicetos (e.g. *Cellulomonas*, *Thermononospora*, etc.) (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005). O estado da arte compreende o uso de processos de cultivo tanto submersos quanto semi-sólidos, assim como o uso de microrganismos naturais e modificados geneticamente. As principais empresas que comercializam estas enzimas são: AB Enzymes GmbH, Advanced Enzyme Technologies Ltd., Amano Enzyme Inc., Asahi Kasei Pharma Corporation, BASF SE, BioResource International Inc., Cargill Texturizing Solutions, Chr. Hansen A/S, Codexis Inc., Danisco A/S, Genencor International Inc., Direvo Biotech AG, DSM Food Specialties, Enzymatic Deinking Technologies LLC, Hayashibara Company, NEXGEN Biotechnologies Inc., Novozymes A/S e Verenium Corporation (marketresearch.com). O mercado potencial anual dessas enzimas, usadas para a hidrólise da biomassa na produção de etanol 2G superaria a cifra dos U\$ 600.000.000,00 quando considerados apenas os Estados Unidos e o Brasil (ZHANG et al., 2006, POLITZER e BON, 2006).

2.4 O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos que crescem formando rede filamentosa de células, denominadas hifas. Um fungo individualizado cresce através da extensão das extremidades das hifas, assim como de suas ramificações e eventuais fusões (GLASS; JACOBSON; PATRICK, 2000).

Trichoderma são ascomicetos da ordem Hypocrales, família *Hypocraceae*. São fungos saprófitos encontrados em virtualmente todos os solos e poucos apresentam atividade patogênica para o Homem. A maioria das espécies do gênero pode ser definida como simbioses oportunistas e inofensivos para plantas (HARMAN et al., 2004). Ocorre também a presença de teleomorfos (i.e. teleomorfo, ou estágio meiospórico, forma do fungo capaz de reprodução sexuada). Espécies de *Trichoderma* são mais comumente isoladas em solos de áreas florestais ou agrícolas em todas as latitudes. Já as espécies de *Hypocrea* (anamorfo *Trichoderma*) são mais frequentes em cascas de árvores ou em madeira com o cerne exposto.

Espécies de *Trichoderma* destacam-se no controle biológico de doenças de solo e raiz em plantas de interesse econômico (e.g. *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum*), para produção de celulasas e hemicelulasas (*T. reesei*), assim como produção de xilanases por *T. longibratum* e quitinases por *T. harzianum*. Suas colônias podem se apresentar dispersas e flocosas ou compactadas em tufos. O tamanho e o formato dos conídios também são variáveis de espécie para espécie. Nas várias espécies do gênero é observada a presença de clamidiósporos, esporos assexuais originados pela modificação de segmentos da hifa, podendo apresentar-se de dois modos: intercalares ou terminais (BARCELLOS, 2002). Os conídios podem ser verdes, amarelos, verde-amarelados ou ainda incolores. Em espécies de *Trichoderma* não existem conidióforos definidos (SAMUELS, 1996), sendo os conídios formados nas extremidades das fiálides em determinadas hifas. Os conídios tendem a se agregar, sendo esses agregados constituídos de fiálides e, em algumas espécies, ocorre dependência por luz para a esporulação (GRESSEL e HARTMANN, 1968).

Na produção de celulasas destaca-se *Trichoderma reesei*, a espécie mais extensivamente estudada, capaz de secretar enzimas de duas classes gerais: celobiohidrolases (CBH I e II); endoglucanases (EG I, II, III, IV, V e BGV), além de duas xilanases (XYN1 e XYN2) (RECZEY et al., 1996; MIETTINEN-OINONEN e SUOMINEN, 2002). *Trichoderma reesei* foi isolado originalmente nas Ilhas Salomão (Melanésia, Pacífico Sul) durante a Segunda Guerra Mundial, devido à sua capacidade de decompor as barracas de algodão dos soldados norte americanos (REESE, 1976).

Trichoderma harzianum tem sido explorado, principalmente, no controle biológico de fungos causadores de doenças em plantas, reduzindo a aplicação de agrotóxicos e pesticidas em lavouras, com consequente redução de emissão de poluentes químicos (BARCELLOS, 2002). *Trichoderma harzianum* é o agente principal de formulações tais como Trichodex (Trichodex S.A.) e Binab-T (Binab Inc.). Sua ação no controle sobre insetos parasitas, se dá por meio da produção de quitinases. Também é capaz de degradar *in vitro* compostos organoclorados como DDT, Glifosato, Dieldrin, Endosulfan, entre outros (KATAYAMA e MATSUMURA, 1993). Devido à composição de seu coquetel celulolítico, *Trichoderma harzianum* também é utilizado na produção de hidrolases. Contudo, a regulação da síntese das enzimas é ainda menos elucidada do que em *T. reesei*. (KATAYAMA e MATSUMARA, 1993).

2.4.1 Regulação da expressão de celulases

T. reesei produz celulases de forma constitutiva, contudo, a transcrição pode ser induzida por celulose. O indutor mais forte é o dissacarídeo soforose (duas moléculas de glicose unidas por ligações exóticas do tipo β -1,2), considerado o indutor natural da síntese de celulases. A soforose é naturalmente formada nas espécies de *Trichoderma*, derivando de moléculas de celobiose convertidas através da atividade transglicolítica da β -glicosidase (VAHERI; VAHERI; KAUPINEN, 1979). Além dos mecanismos indutores, a regulação da expressão das celulases se dá por mecanismos repressores.

2.4.1.1 Cre1

Em *T. reesei* o mecanismo de repressão catabólica do metabolismo do carbono, Cre1, está parcialmente envolvido na repressão de genes de duas hidrolases (cbh1 e xyn1). Para os genes cbh2 e xyn2 não é conhecida nenhuma ação direta de Cre1, mas uma ação indireta, através do rearranjo dos nucleossomos, i.e. um filamento de DNA (fita dupla) enrolado em volta de um complexo de proteínas histônicas (H1A, H2B, H3 e H4). Este é um dos níveis de compactação do DNA eucariótico (ALBERTS et al., 2003) na região upstream do gene cbh2. Tal rearranjo faz com que a região do TATA-box (i.e. uma sequência de DNA encontrada no sítio promotor de genes de Archaea e Eukaria; que age como um elemento regulatório cis.; ALBERTS et al., 2003) fique desbloqueado pela ligação com histonas, e assim permita a transcrição do mRNA referente aos genes (MACH e ZEILINGER, 2003). Hoje também são conhecidos outros fatores regulatórios de celulases, Ace1 e Ace2.

2.4.1.2 Ace1 e Ace2

Ace1 funcionaria como indutor na expressão de celulases, uma vez que mutantes deficientes no mesmo (Δ ace1) apresentaram crescimento menor em meio contendo celulose como fonte de carbono, indicando uma deficiência na produção das mesmas (SALOHEIMO et al., 2004).

Porém Aro et al. (2003) observaram exatamente o contrário, Ace1 agindo como repressor da expressão de celulases e xyn1. Já Ace2 se trata de uma proteína que possui uma região *zinc finger* que se liga à sequência genética 5'- GGCTAA - 3' (preferencialmente seguida por uma sequência rica em A+T). Mutantes Δ ace2 apresentaram sinais claros de crescimento e níveis de expressão diminuídos de cbh1 em celulose, mas não em soforose.

Isso sugere que a indução de genes de celulases por soforose e por celulose apresenta mecanismos diferentes. Ilmen et al. (1996) descreveram um promotor reduzido de cbh1 (30 pb, na região upstream do TATA) que ainda é induzível por soforose, mas não por celulose (ARO et al., 2001). Mas a atuação de Ace1 e Ace2 não é totalmente compreendida, bem como o completo mecanismo de regulação da expressão de celulases em *Trichoderma* é conhecido de forma fragmentada (MACH e ZEILINGER, 2003).

2.4.1.3 Complexo HAP2/3/5

O complexo protéico HAP2/3/5 é altamente conservado em eucariotos e é capaz de se ligar especificamente a regiões do DNA do microrganismo, atuando como regulador da expressão de genes na célula. É capaz de ligar-se à região reguladora do elemento ativador de cbh2 em *Trichoderma* (ZEILINGER et al., 2001). Este gene possui duas regiões reguladoras (CCAAT-box, na fita principal, e GGTTA-box na fita complementar, promovendo a expressão do mesmo. Porém outros trabalhos indicam que atua como um repressor da expressão de uma xilanase de *Trichoderma* (xyn2), ao complexar-se com a região reguladora CCAAT-box do mesmo (WÜRLEITNER et al., 2003).

Figura 4 - Esquema genérico apresentando os principais mecanismos reguladores da expressão dos genes das enzimas celulasas.

FONTE: Adaptado de Kubicek et al. (2010). Em vermelho: repressores; em azul: indutores.

2.5 Geração de variabilidade e melhoramento de microrganismos

Existe uma enorme diversidade de microrganismos a ser prospectada, oferecendo, portanto, uma vasta quantidade de genes, enzimas e rotas metabólicas a serem identificadas pelo Homem (ROBERTSON et al., 1996). A capacidade de adaptação dos microrganismos a diferentes condições ambientais apresenta papel crucial no desenvolvimento e manutenção de fenótipos de interesse. A elucidação dos mecanismos que atuam no processo de adaptação natural pode auxiliar no melhoramento de linhagens de microrganismos de interesse econômico (ZELDER e HAUER, 2000). Condições ambientais impostas pela natureza, tais como umidade, temperatura, ciclos, ou impostas em laboratório, tais como pressão osmótica, composição do meio e disponibilidade de O₂, levam à adaptação de fenótipos. Por exemplo, em resposta a um novo substrato, a população microbiana altera sua composição, com a variação dos fenótipos mais comuns. Indivíduos capazes de utilizar tal substrato prevalecem e se reproduzem, em detrimento de microrganismos incapazes de executar a rota metabólica necessária. Células conseguem modificar sua fisiologia de maneira reversível, em processos regulatórios baseados na adaptação a condições ambientais oriundas de algum estresse presente no meio (e.g. a melhoria na tolerância à altas pressões osmóticas (LUCHT e BREMER, 1994); a adaptação da estrutura da membrana celular de bactérias à presença de solventes orgânicos (PEDROTTA e WITHOLT, 1999; RAMOS; MØLBAK; MOLIN, 1997)).

Além disso, a adaptação pode ser um processo de modificação genética. Numa

minoria da população ocorrem alterações genéticas que proporcionam à célula uma melhor resposta ao ambiente em mudança. A base para tal alteração varia de simples mutações pontuais no DNA (e.g., alteração de bases, inserção ou deleção de bases) a eventos maiores tal como a reestruturação do genoma do organismo (e.g. “embaralhamento genômico”, como numa reprodução sexuada).

Existem diferentes mecanismos de geração de mutações numa população resultando variabilidade genética. Um desses mecanismos é um tipo diferenciado de mutações, que foge do cânone das mutações dependentes de divisão celular. São chamadas de mutações adaptativas e são originadas em células que não estão se dividindo e, conseqüentemente, não estão necessariamente transferindo a mutação adquirida para as próximas gerações (CAIRNS et al., 1988).

As mutações adaptativas podem resultar na estabilização de linhagens e, portanto, serem úteis na melhoria de processos biotecnológicos.

2.6 Mutações

Organismos capazes de promover grandes números de mutações podem ser vantajosos. Vários modelos matemáticos foram desenvolvidos para explicar tais resultados (ARJAN et al., 1999; LEIGH, 1973; TADDEI et al., 1997). De modo geral, tais modelos demonstram que pequenas populações expostas a rápidas alterações das condições ambientais favorecem células com maiores índices de mutações.

Quando confrontadas com restrições ao crescimento, se as células forem capazes de aumentar o índice de mutações de forma transiente, é possível desenvolver uma resposta adaptativa à condição desfavorável, sem precisarem carregar o fardo futuro de um índice, possivelmente deletério, de mutações. Isso pode ser feito basicamente de duas maneiras, ignorando-se os mecanismos moleculares envolvidos no processo: (1) diminuindo a eficácia de mecanismos de reparo do DNA ou (2) aumentando a atividade de rotas mutagênicas (HALL, 1998; TADDEI et al., 1997).

Em 1988, Cairns et al. publicaram um artigo no qual contrapunham o dogma que

defendia que mutações espontâneas surgem através de erros aleatórios no material genético durante o processo de reprodução. O trabalho apresentou dado que indicavam que apenas mutações benéficas (em detrimento a mutações neutras ou deletérias) eram detectadas numa dada população durante algum processo seletivo. Atualmente compreende-se a mutação não como um fenômeno único, mas como vários mecanismos de geração de variabilidade genética, relacionados a diferentes fatores (e.g. estresse ambiental, deslocamento e inserção de transposons no material genético, etc).

2.7 Engenharia evolutiva

Atualmente, grande atenção é dada para processos de melhoramento de linhagens usando-se ferramentas de engenharia metabólica, a qual consiste no uso da tecnologia do DNA recombinante. Porém a complexidade das interações dinâmicas de sistemas celulares, e a necessidade de se conhecer o mecanismo molecular do processo metabólico a ser modificado muitas vezes impedem o uso de tais técnicas. Outra desvantagem é a impossibilidade de se prever possíveis efeitos colaterais envolvidos na modificação de certa rota metabólica.

Alterações pontuais usando-se técnicas de engenharia metabólica, como melhoramento de proteínas através de biologia molecular já são lugares comuns no estado da arte da biotecnologia. Exemplos interessantes do estudo da estrutura de enzimas em suas funções são encontrados nos trabalhos de Wang et al. (2005), onde o papel de um único aminoácido na atividade enzimática em diferentes pHs foi analisada. Após uma vasta triagem da biblioteca de enzimas gerada por técnica de error-prone PCR identificou-se um mutante apresentando uma maior estabilidade e atividade enzimática em uma faixa de pH mais extensa que a enzima selvagem. Tal mutante possuía uma alteração no aminoácido 321 (originalmente uma asparagina, N). Estudos posteriores indicaram que a substituição da asparagina por aminoácidos com carga positiva (no caso, histidina: N321H) aumentavam a atividade enzimática da enzima em pHs alcalinos. Do mesmo modo a alteração por aminoácidos com carga negativa (por ácido aspártico: N321D) pioravam seu desempenho. Outro exemplo interessante de estratégia envolvendo pouco ou nenhum

conhecimento sobre a estrutura da enzima e seu mecanismo de reação é encontrado no trabalho de Jaeger e Reetz (2000). Os pesquisadores apresentam uma proposta de melhoramento de enzimas *in vitro* através de mutações aleatórias. Após a triagem inicial, os mutantes selecionados por apresentarem a característica de interesse passam por um novo processo de mutagênese, num ciclo *ad infinitum*. Análises posteriores na sequência genética da enzima permitiram a identificação de hot-spots para a modificação da atividade enzimática.

Porém a alteração de mecanismos mais complexos através de engenharia evolutiva como redes metabólicas, sem conhecimento dos mecanismos regulatórios envolvidos tende a ser desastrosa (ÇAKAR et al., 2005).

Em contrapartida, processos empíricos são particularmente eficientes quando usados para obterem-se organismos com algum fenótipo industrialmente interessante, sendo usados há décadas para melhoramento de linhagens industriais (SAUER, 2001). Mecanismos de seleção simples e diretos podem ser aplicados, como por exemplo, a seleção de organismos resistentes a intermediários metabólicos tóxicos. Um exemplo clássico é o aumento na produção de penicilina de cerca de 4000x, através de técnicas de melhoramento clássico, ao longo da história da biotecnologia industrial (PAREKH; VINCI; STROBEL, 2000).

Porém, nem sempre os fenótipos desejados podem ser obtidos através do aumento gradual da resistência por alguma substância. Outro ponto crítico é a existência de fenômenos pleiotrópicos, os quais causam resultados adversos em características fenotípicas e que fogem do controle dos cientistas. O que costuma correr é o acúmulo de mutações deletérias que não sofrem seleção durante o processo de engenharia evolutiva da cepa, resultando em uma linhagem altamente especializada, porém extremamente frágil (MÜLLER, 1964; ANDERSSON e KURLAND, 1998). Desta forma é necessário desenvolver mecanismos que reduzam este risco, por exemplo, optando-se por diferentes mecanismos de geração de variabilidade (recombinação genética, mutagênese, etc), além de um eficiente mecanismo de seleção da variabilidade gerada (SAUER, 2001).

Duas estratégias principais são aplicadas na tentativa de aliviar tal problema de

obtenção de linhagens frágeis envolvendo processos evolutivos de microrganismos: a recombinação genética e a seleção contínua em grandes populações durante várias gerações. A recombinação genética e a subsequente seleção de fenótipo mais adequado é usada para combinar mutações benéficas de diferentes variantes em uma linhagem de interesse, reduzindo a carga de mutações deletérias acumuladas naturalmente pelo processo. A seleção contínua *in vivo* de grandes populações evita que apenas um clone da população seja selecionado após cada ciclo, minimizando assim a carga de mutações deletérias selecionadas. Obtendo-se um número maior de clones e trabalhando-se com uma variabilidade genética maior, o risco da deriva genética extinguir genes capazes de conferir ao microrganismo certa robustez é menor (SAUER, 2001).

2.7.1 Mutagênese induzida por radiação ou compostos químicos

Uma técnica frequentemente utilizada para obtenção de variabilidade é a aplicação de agentes mutagênicos de natureza química (etil-metano-sulfonato EMS, metil-nitroso-guanidina NTG) ou física (radiação ultravioleta, UV) para geração de variabilidade. Cada agente mutagênico possui seu próprio mecanismo para modificação do material genético do organismo alvo. Etil-metano-sulfonato (EMS) é capaz de gerar mutações pontuais (deleção de poucos pb's) resultando em alterações no quadro de leitura, mas também induz deleções de tamanho considerável, resultando em rearranjos no DNA (cerca de 10% das deleções causadas por EMS no verme *Caenorhabditis elegans* possuem um tamanho médio de 1 Kb) (LIU et al., 1999). Já o uso de guanidina-metil-nitroso (NTG) costuma resultar em mutações que ocorrem em locais próximos umas das outras no genoma, devido à sua especificidade em modificar o DNA próximo à forquilha de replicação. A radiação UV (UV-A 400 - 320 nm; UV-B 320-280 nm; UV-C 280 - 100 nm) age através da formação de dímeros de pirimidinas (CPDs) e fotoprodutos de pirimidinas-pirimidonas (6-4 PPs), além da formação de espécies reativas de oxigênio (e.g. radicais hidroxila, peróxidos) capazes de promover a oxidação e maior degradação do material genético.

Figura 5 - Mecanismo de dano à molécula de DNA pela radiação UV.

FONTE: Wikipedia (2011).

Para um que um processo de engenharia evolutiva seja eficiente, o tratamento com uma dose adequada do mutagênico é crucial (ROWLANDS, 1984). Apesar de a dose mais adequada ser de difícil determinação devido à dificuldade de observação dos fenótipos desejados, outras características facilmente observáveis podem ser usadas para se determinar a dose ideal, como índice de sobrevivência das células, quando diretamente relacionada à geração de mutantes (KAPLAN et al., 1989).

Ao longo da história evolutiva, os organismos vivos desenvolveram mecanismos para proteção contra as lesões causadas pela radiação ultravioleta no material genético das células (EKER et al., 2009). Um destes mecanismos faz uso de enzimas foto-dependentes chamadas fotoliasas (WEBER, 2004). Fotoliasas são flavoproteínas, divididas em duas classes principais, que possuem dois cofatores foto-receptores, sendo um deles o cofator reduzido FADH^- . A natureza do outro cofator define a classe a qual a fotoliase se encaixa. Este cofator pode ser a molécula pterina-meteniltetrahidrofolato (MTHF) nas folato fotoliasas e o cofator deazaflavina-8-hidroxi-7,8-didemetil-5-deazarriboflavina (8-HDF) nas fotoliasas deazaflavinas (WEBER, 2004).

O reparo direto na molécula de DNA ocorre através da complexação da enzima com a região apresentando o dímero de pirimidina. A absorção de energia pelos cofatores da enzima excita um elétron do cofator FADH^- , resultando num espécie instável $^*\text{FADH}^-$. Este cofator, por fim, transfere a energia do elétron excitado para o complexo pirimidina-pirimidina, desfazendo-o. Desta forma, o reparo é energeticamente favorável, por não apresentar perda de elétrons pelos cofatores, além de evitar a necessidade de excisar uma parte do material genético (EKER

et al., 2009).

Fungos do gênero *Trichoderma* possuem fotoliasas contendo MTHF como segundo cofator, sendo responsáveis pela fotorreativação de células expostas à radiação UV-C, além de promover a fotoindução da esporulação (SAMETZ-BARON et al., 1997). Estudos posteriores indicaram que a fotoliasa PHR1 de *T. artroviride* é capaz de autorregular sua fotoindução, através da interação da mesma com proteínas do sistema de regulação à luz azul (BLR), estimuladas por luminosidade no comprimento de onda visível do espectro azul (BERROCAL-TITO et al., 2007).

Tendo em mente a capacidade destes organismos de promoverem reparo direto do material genético através de fotoliasas e sua respectiva foto-dependência para esta atividade, é recomendado que esporos irradiados de *Trichoderma* sejam mantidos sob ausência de estímulo luminoso durante seu cultivo.

2.8 Mecanismos de seleção

Para evitar selecionar fenótipos não interessantes, o processo de seleção deve refletir características do processo industrial no qual o microrganismo será empregado, como por exemplo, aeração, limitação ou abundância da fonte de carbono, complexidade e concentração das fontes de nutrientes, pH, osmolaridade. Em certos casos, porém, efeitos pleiotrópicos (e.g. o controle de diversas características de um fenótipo por um único gene) podem mascarar a fragilidade do genótipo escolhido, quando confrontado em condições específicas, uma vez que o gene ou cluster genético tem influência em mais de uma característica fenotípica do organismo (VELICER, 1999; WEIKERT; SUAER; BAILEY, 1997; ÇAKAR et al., 2005). O cultivo em meios solidificados é uma das técnicas mais utilizadas na seleção de fenótipos, devido ao grande número de mutantes nas bibliotecas geradas e pelo fato de que permite um processo simples de seleção, que é a observação a olho nu de alguma característica das colônias que permite inferir sobre a presença de um fenótipo de interesse (e.g. tamanho da colônia, crescimento em placa contendo alguma toxina, halo formado em volta da colônia devido ao consumo de algum substrato no meio).

A vantagem desta técnica de seleção é permitir a observação direta de cada clone isolado com a característica detectável de interesse (WALKER e MIROUX, 1999), enquanto a desvantagem recai em sua simplicidade sendo ineficiente na seleção de fenótipos complexos, que exijam várias mutações.

3 OBJETIVOS

Obter mutantes dos fungos *Trichoderma harzianum* IPT 821 e *Trichoderma reesei* QM9414 por meio de mutação causada por radiação UV-C e evolução causada pela aplicação de pressão ambiental, com vistas ao aumento da capacidade de síntese de celulasas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O plano de trabalho para este projeto de mestrado baseia-se em duas etapas: geração de variabilidade por mutação (radiação UV-C e pressão ambiental) e seleção dos melhores fenótipos.

As etapas para realização deste plano são apresentadas na Figura 6. Esporos em estoque foram semeados em placas, e, em seguida foram expostos à radiação UV. Após incubação, as colônias esporuladas foram transferidas para placa contendo uma camada superior de meio, denominada “camada de seleção”. Os esporos que surgiram mais rápido na superfície da camada de seleção foram isolados e cultivados em meio semi-sólido (BCA/FT) para comparação da produção de celulasas com a produção verificada nas linhagens parentais. Em seguida as linhagens escolhidas foram cultivadas, e seus coquetéis enzimáticos foram avaliados através da análise de atividade enzimática das frações FP (filter paper), endocelulase ou carboximetilcelulase (CMCase) e xilanase, e através de ensaios de hidrólise.

Figura 6 - Fluxo de ações do projeto de Mestrado.

FONTE: Lino (2012).

4.1 Microrganismos e manutenção

Os fungos escolhidos neste projeto foram: *Trichoderma harzianum* IPT 821 e *Trichoderma reesei* QM 9414. A linhagem de *T. harzianum* é uma linhagem selvagem, ou seja, não passou por nenhum processo de melhoramento ou seleção, originalmente isolada de solos de canaviais do estado de São Paulo. A linhagem *T. reesei* QM9414 foi gerada através de programas de melhoramento genético aplicados aos estoques originais de *Trichoderma* das forças armadas norte americanas (STERNBERG, 1976), e é tido como um dos maiores produtores de celulasas. Estoques de esporos foram armazenados em suspensão em meio com glicerol a 20% (v/v) e mantidos a -80 °C.

Quando do preparo do inóculo, as cepas preservadas a -80 °C foram cultivadas em meio constituído de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e farelo de trigo (FT), na proporção 80%/20%, a 30 °C, por aproximadamente 10 dias, resultando concentração de esporos de aproximadamente 10^9 esporos/grama de substrato. A partir desta cultura rica em esporos e mantida em frascos erlenmeyers a temperatura ambiente, suspensões de

esporos em água esterilizada (um grama de BCA em 100 mL de água estéril, resultando 10^7 a 10^9 esporos/mL), foram obtidas e empregadas como inóculo nos cultivos em meio solidificado e meio sólido.

4.2 Meios de cultura

O meio de cultura a ser empregado nos ensaios para indução de mutações e seleção de fenótipos foi o meio Mandels (1974), pois este meio é citado em vários estudos com espécies do gênero *Trichoderma*. Foram introduzidas algumas modificações, quais sejam: retirada da peptona e da ureia, ficando assim como única fonte de carbono a celulose microcristalina Avicel, com uma concentração gradativamente menor, ao longo da seleção de linhagens mutantes, e aumento da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de modo a aportar a mesma concentração de nitrogênio do meio original. O meio foi esterilizado por autoclavagem durante 21 minutos. Para 1L de meio a constituição é a seguinte: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 21g; KH_2PO_4 15 g; CaCl_2 3g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 3g.

A solução traço de metais foi preparada de forma concentrada (1000x) e adicionada ao meio de cultivo na concentração adequada previamente à esterilização. Era constituída de (1L): FeSO_4 2,55 g; MnSO_4 0,93 g; ZnCl_2 1,78 g; CoCl_2 1 g.

4.3 Mutagênese através de radiação UV

Esporos dos microrganismos inoculados no meio Mandels conforme descrito em 4.2, foram expostos à radiação UV-C (lâmpada de 30 W, $\lambda = 254 \text{ nm}$, avaliada com o uso de dosímetro Vilber Loumart VLX 3W, França), a uma distância de 60 a 80 cm, a intervalos de tempo definidos através de dados de literatura e experimentos exploratórios. A aplicação da radiação e posterior cultivo foram feitos em triplicata, ou seja, para cada período de exposição eram usadas três placas contendo esporos. O critério utilizado para a avaliação do dano causado ao DNA da célula pela exposição à radiação foi a letalidade observada, ou seja, a diminuição na viabilidade de esporos expostos à

radiação, quando comparadas ao grupo controle, não irradiado. Dessa forma, quanto maior mortalidade pela irradiação, maior o número de erros no DNA e, possivelmente, o de mutações. A contagem de colônias foi feita visualmente. Nos ensaios iniciais as placas foram expostas por períodos variando de 1 a 5 minutos e incubadas a 30°C durante 4 dias. Como inóculo, uma suspensão de esporos, armazenados em meio sólido (bagaço de cana/farelo de trigo) foi ressuspensa em água (1g em 100 mL, contabilizando cerca de 10^7 esporos/mL. Foi aplicado um volume de 0,5 mL de suspensão por placa irradiada.

4.4 Cultivos sob pressão ambiental

Figura 7 - Esquema representativo indicando uma placa de Petri contendo meio solidificado com esporos na parte inferior (verde), coberto pela camada de seleção (bege).

FONTE: Lino (2012).

O meio solidificado utilizado nesta etapa consiste de duas camadas: uma camada basal formada ao despejar-se na placa o meio ainda líquido contendo os esporos, os quais foram adicionados ao meio através de uma suspensão contendo cerca de 10^7 esporos/mL, e a camada de cobertura obtida após resfriamento do meio derramado na placa cujo volume era de cerca de duas vezes o volume da camada basal (TOYAMA; YAMAGISHI; TOYAMA, 2002). Colônias selecionadas após a mutagênese por UV foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Mandels solidificado com concentração limitante de carbono (Avicel). Após o período de incubação, o qual teve acompanhamento diário, as colônias que apresentaram maior padrão de atividade celulolítica, avaliado indiretamente pela velocidade de formação de esporos na superfície da camada de meio de cultivo, foram selecionadas e continuaram sendo cultivadas sob concentrações gradativamente reduzidas de AVICEL (celulose microcristalina) como única fonte de carbono. A bateria de testes continuou até onde o crescimento não pôde mais ser detectado.

4.5 Cultivos em meio semi-sólido

As cepas parentais e as selecionadas na etapa de cultivo em meio solidificado foram cultivadas em meio semi-sólido. O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyers com volume de 500 mL contendo 10 g de meio com a seguinte composição: BCA/FT na proporção 80%/20%. A umidade foi ajustada para o valor de 60% através da adição de 15 mL da solução Urbanszki: 5 g/L KH_2PO_4 ; 5 g/L $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L NaCl; 5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 mg/L MnSO_4 ; 3,45 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Os cultivos foram conduzidos em duplicata usando-se o mesmo inóculo, em estufa a 30 °C, durante 72h, que são condições previamente estabelecidas no laboratório que forneciam a maior produtividade de enzimas (SOUZA, 2009).

Para extração das enzimas, 4 g de meio contendo as hifas foram adicionados de 40 mL de água destilada, 40 mL de tampão citrato de sódio (pH 4,8) e Tween 80. A suspensão foi mantida em incubador rotativo a 180 rpm, 30 °C, durante 1h, após o que, a suspensão passou por filtração grosseira em gaze, a fim de separar as partículas sólidas do meio e em seguida, por centrifugação a 10000 rpm (aproximadamente 4470 g) durante 15 min, separando-se, assim, a biomassa e partículas sólidas remanescentes do sobrenadante. O extrato bruto assim obtido foi aplicado a ensaios de atividade enzimática. A umidade relativa de cada cultivo foi determinada usando-se uma balança equipada com lâmpada de halogênio (OHAUS MB35, EUA). O valor da umidade foi usado para calcular a atividade enzimática por grama de massa seca.

4.6 Medida de atividades enzimáticas

A atividade celulolítica total foi determinada por método de hidrólise de papel de filtro segundo Ghose (1987) e expresso em U (unidades de atividade) de FP (Filter Paper) a qual é definida como a liberação de 1 μmol de açúcar redutor por minuto. Para tal, 500 μL do extrato enzimático bruto foram diluídos em 1 mL de tampão citrato de sódio em um tubo Follin Wu, junto a uma tira de papel de filtro (1x6 cm; Whatman

n° 1) e incubado em banho-maria a 50 °C, durante 1 h. A reação enzimática foi paralisada pela adição de 3 mL de DNS (ácido dinitro-salicílico), seguida de manutenção dos tubos a aproximadamente, 90 °C durante 5 min. em banho-maria. Decorrido o tempo de reação com DNS, os tubos foram colocados em banho de água e gelo e o volume de amostra de cada tubo foi elevado para 12,5 mL com água destilada. Na reação com DNS ocorre a formação de um produto com coloração específica junto aos açúcares redutores (AR) presentes na solução, cuja concentração foi determinada de forma indireta através da medida de absorbância em espectrofotômetro (Beckman DU® 530, EUA) em $\lambda = 540$ nm. As leituras obtidas nas reações eram comparadas com o branco de cada amostra, obtido através da adição do extrato enzimático diluído em tubo Follin, sem a presença do substrato, no caso uma tira de papel. Isso é feito para se comparar a concentração de açúcares obtida no final da reação com a concentração inicial, resultante do cultivo do microrganismo em meio semi-sólido. Para definir o valor em U/grama de massa seca de substrato, foi definida uma curva de calibração do DNS empregado, com soluções de glicose com concentração conhecida. O valor de x dessa reta foi usado nos cálculos de FP.

A atividade de endocelulase, CMCase, foi determinada utilizando carboxi-metil-celulose (CMC) como substrato. A reação foi realizada adicionando 500 μ L da enzima diluída (sobrenadante do meio de cultivo) em 500 μ L de tampão acetato sódio 50mM (pH 5) com 1% CMC. Após 30 minutos a 50 °C, a reação era interrompida pela adição de 3 mL do reagente contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico 40mM, NaOH 400 mM e tartarato duplo de sódio e potássio 1M, o meio foi fervido (95 °C) por 5 minutos, à alteração de cor determinada a 540 nm corresponde concentração de açúcar redutor com base numa curva padrão preparada com glicose e foi expresso em U de CMCase, definida como a quantidade de enzimas que catalisa a hidrólise de 1 μ mol de açúcar redutor por minuto.

A atividade da xilanase foi determinada utilizando arabinoxilana como substrato. A 500 μ L da enzima diluída (sobrenadante do meio de cultivo) eram adicionados 500 μ L de tampão acetato sódio 50 mM (pH 5) com 1% arabinoxilana. Após 30 minutos a 50 °C, a reação era interrompida pela adição de 3 mL do reagente contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico 40 mM, NaOH 400 mM e tartarato duplo de sódio e potássio 1 M. Para determinação da quantidade de açúcar redutor produzido, o material foi fervido (95 °C) por 5 minutos, a alteração de cor no meio medida a 540 nm e a concentração de açúcar

reductor foi calculada utilizando curva padrão preparada com xilose. A atividade enzimática foi expressa em U, definida como a quantidade de enzimas necessárias para a liberação de 1 μmol de açúcar redutor por minuto.

A concentração de açúcares redutores totais em g/L é calculada a partir da absorbância medida e da curva de calibração do DNS. Esta concentração é convertida para $\mu\text{mol/mL}$. Dividindo pelo tempo de reação, essa medida fica na unidade $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, sendo que $\mu\text{mol}/\text{min}$ corresponde à unidade U. Multiplicando o resultado anterior pela diluição utilizada na extração chega-se a uma atividade em U/g de meio de cultura. Considerando-se a umidade inerente ao meio de cultura (obtida como descrito no item 4.5), divide-se o resultado pela massa seca de meio de cultura, obtendo-se assim U/gms (grama de massa seca).

$$U \cdot V_{dil} / 1 - U_m \quad \text{Eq.1}$$

Onde:

U : Unidade de atividade enzimática (μmol produto/min); V_{dil} : volume de tampão usado na extração enzimática; U_m : umidade do meio de cultura (%).

Para comparar se as atividades enzimáticas das linhagens parentais e das linhagens selecionadas apresentam diferenças estatísticas uma análise de variância (ANOVA) foi feita usando-se o programa MINITAB[®] 16, além de teste t Student para verificar se as médias das atividades obtidas divergem de forma significativa, sendo que para ambos os testes foi considerado um intervalo de confiança de $p < 0,05$.

4.7 Ensaios de hidrólise e análise em HPLC

Os ensaios de hidrólise foram executados usando-se Avicel como substrato. A carga de sólidos (m/v) total foi de 1%.

Em um Erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 0,5 g de Avicel. Cada frasco teve o volume reacional acertado com a adição de um volume adequado de extrato enzimático (conforme

descrito no item 4.5) e tampão citrato de sódio (pH 4,8) obtendo-se uma atividade final (FP) de 2,5 U/gms.

A reação teve duração de 48h. Foram retiradas amostras nos instantes 0h, 3h, 6h, 24h e 48h. Os frascos foram colocados em um incubador rotacional (New Brunswick C24, EUA), a 180 rpm e 50 °C. Os experimentos foram feitos em duplicata. O frasco controle consistiu de Avicel acrescida de tampão citrato de sódio.

A análise de açúcares das amostras da hidrólise foi realizada em um HPLC Shimadzu UFLC (Shimadzu, Japão) com detector de índice de refração RID – 10A (Shimadzu, Japão) e coluna HPX 87H (BioRad, EUA) nas seguintes condições: temperatura do forno de coluna de 65 °C, H₂SO₄ 2 mM como fase móvel na vazão de 0,6 mL/min e tempo de corrida de 25 minutos. Foi analisado apenas o monossacarídeo glicose.

4.8 Cálculo de conversão de celulose em glicose

O cálculo da conversão de celulose em glicose é feito a partir da equação:

$$X(\%) = C_{Glicose} \left(\frac{g}{L} \right) \cdot \frac{V_{Tampão} (L)}{m_{hidrolisável} (g)} \cdot \frac{1}{f \left(\frac{g \text{ celulose}}{g \text{ hidrolisável}} \right)} \cdot FE \cdot 100$$

Eq.2

Onde $V_{Tampão}$ é o volume de solução tampão adicionado na hidrólise, $m_{hidrolisável}$ é a massa de material hidrolisável utilizada no ensaio de hidrólise, f é a fração de celulose no material hidrolisável utilizado e FE é o fator estequiométrico da reação de celulose a glicose (0,9).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Irradiação e geração de mutantes

Preliminarmente aos ensaios de mutagênese por radiação UV-C, determinou-se o

centro da capela de fluxo laminar como sendo o ponto com maior incidência de radiação UV-C ($0,0173\text{J}/\text{cm}^2.\text{min}$), com base em medidas fornecidas por um dosímetro (Vilber-Lounart VLX 3W, França).

Desta forma poderíamos trabalhar com a maior dose de radiação UV-C por tempo de exposição e, conseqüentemente aumentar o número de erros no DNA dos microrganismos expostos à mesma. O aumento no número de erros no DNA pode ser inferido de forma indireta através da observação da letalidade produzida pela dose de radiação.

Letalidade pode ser definida como a diferença entre o número de colônias formadas após exposição à radiação UV de uma placa de Petri com meio solidificado inoculado com o microrganismo em questão (C1), em comparação ao número de colônias formadas noutra placa preparada da mesma forma, porém, não exposta à radiação UV (C2) (Golan *et al.*, 2011).

$$(C2-C1/C2)*100$$

Eq.3

Onde:

C1: Número de colônias que cresceram na placa exposta à radiação; C2: Número de colônias que cresceram na placa não exposta (controle).

Por exemplo, uma letalidade de 50% corresponde à formação de metade do número de UFC contabilizadas em placa irradiada em relação ao grupo controle (GOLAN *et al.*, 2011).

O tempo de exposição dos microrganismos à irradiação foi inicialmente definido levando em consideração dados de literatura (KÓVACS *et al.*, 2008) e os ensaios foram realizados em triplicata (três placas para cada tempo de exposição). Cada ensaio foi repetido quatro vezes para cada período de exposição e cada cepa, totalizando 12 repetições para uma dada cepa. A partir desses resultados, foram construídas curvas de letalidade para cada cepa. A medida de letalidade é uma forma indireta de inferir a quantidade de erros aleatórios provocados no DNA de um organismo. Desta forma, quanto maior a letalidade maior a variabilidade gerada por mutações, teoricamente.

Com base num primeiro ensaio exploratório, verificou-se que a linhagem *T. reesei* QM9414 é mais resistente à radiação do que a linhagem *T. harzianum* IPT 821, uma vez que o índice de letalidade para a primeira foi de 27% enquanto que para *T. harzianum* IPT 821 foi

de 52%, considerando os pontos na curva de observação. De acordo com Sternberg (1976), o índice de letalidade apresentado por uma determinada cepa pode ser atribuído às características tais como concentração de pigmentos foto-protetores nos esporos e história das linhagens. Programas de melhoramento de linhagens, por exemplo, selecionam fenótipos mais resistentes à radiação e produtos químicos, caso da cepa *T. reesei* QM 9414, quando comparadas as linhagens selvagens.

Figura 8 – Curva de sobrevivência de *T. reesei* QM9414 expostos à radiação UV-C.

FONTE: Lino (2012).

Figura 9 – Curva de sobrevivência de esporos de *T. harzianum* IPT 821 expostos à radiação UV-C.

FONTE: Lino (2012).

Feita a repetição do ensaio, verificou-se que a sensibilidade à radiação UV manteve-se semelhante ao ensaio anterior, isto é, com a linhagem *T. harzianum* mais vulnerável aos

efeitos da radiação UV-C. Entretanto, verificou-se que a letalidade de ambas as linhagens foi consideravelmente maior (42% *versus* 27% para *Trichoderma reesei* e 71% *versus* 52% para *T. harzianum*). Isso pode ter ocorrido devido ao erro elevado na contagem visual das colônias. Embora não tenha sido possível definir a letalidade das cepas com precisão, pode-se dizer que variou entre 30% e 40% para *T. reesei* QM9414 e 50% a 70% para *T. harzianum* IPT 821. A partir destes dados foram definidos os seguintes valores médios de letalidade para as duas cepas: 34% para *T. reesei* QM9414 e 61% *T. harzianum* IPT 821, para o maior tempo de exposição, 5 min.

Figura 10 – Curva de sobrevivência de esporos de *T. reesei* QM9414 expostos à radiação UV-C.

FONTE: Lino (2012).

Figura 11 – Curva de sobrevivência de esporos de *T. harzianum* IPT 821 expostos à radiação UV-C.

FONTE: Lino (2012).

Com base nos valores de letalidade determinados estimou-se o tempo de exposição necessário para atingir uma letalidade de 90%: 15 minutos para *T. reesei* QM9414 e 7 minutos para *T. harzianum* IPT 821. Desta forma, os tempos de exposição dos ensaios subsequentes foram: *T. reesei* QM9414: 13, 15 e 17 minutos; *T. harzianum* IPT 821: 6, 7 e 8 minutos.

Figura 12 – Curva de sobrevivência de esporos de *T. reesei* QM9414 expostos à radiação UV-C em períodos maiores.

FONTE: Lino (2012).

Figura 13 – Curva de sobrevivência de esporos de *T. harzianum* IPT 821 expostos à radiação UV-C em períodos maiores.

FONTE: Lino (2012).

A despeito da exposição à radiação UV por tempos estimados para promover a morte de cerca de 90% dos esporos, uma letalidade de 90% não foi observada. Mas, por gerar erros aleatórios no material genético, foi considerado desnecessário continuar os ensaios até atingir-se tal patamar de letalidade e assim, optou-se por continuar o projeto usando os valores de tempo de exposição mais altos testados para cada espécie, com a finalidade de se obter a maior variabilidade genética (em teoria): 17 minutos para *T. reesei* QM9414, gerando cerca de 60% de letalidade; 8 minutos para *T. harzianum* IPT 821, gerando cerca de 70% de letalidade. Além do mais, observa-se uma vasta gama de valores de letalidade usados em outros trabalhos (BESOAIN *et al.*, 2007; MELO; FAULL; GRAEME-COOK, 1997), existindo alguns que sequer especificam qual foi a dose utilizada (JOGLEKAR; KARANTH, 1983).

5.2 Seleção dos mutantes irradiados em meio sintético com celulose como fonte de carbono

A fim de selecionar as cepas melhor produtoras de celulasas, os esporos irradiados foram cultivados em meio sintético contendo celulose como fonte exclusiva de carbono (4 dias a 30 °C em escuridão, uma vez que ciclos luminosos têm influência na esporulação e produção de celulasas (SAAVEDRA *et al.*, 2006)). Após o crescimento passou-se para a etapa de cultivo em meio contendo camada de seleção e pressão ambiental. Para tal, todas as colônias esporuladas foram raspadas com auxílio de uma alça de platina e transferidas para um béquer contendo cerca de 33 mL de meio de cultura descrito no Item 4.2, adicionado da fonte de carbono Avicel (celulose microcristalina), de modo a totalizar 10g/L. O meio estava a cerca de 50 °C, temperatura sub-letal. Depois de homogeneizado, o meio foi despejado em uma placa de Petri e o conjunto, mantido a -80 °C por 10 minutos, tempo necessário para que o meio solidificasse. Em seguida foi derramada a camada de seleção, de mesma constituição do meio (66 mL), e o conjunto foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos, para a solidificação da camada de seleção.

Desta forma montou-se um meio solidificado em bicamada na placa de Petri. A camada inferior continha os esporos irradiados (cultivados previamente, pós-irradiação) e a camada superior consistia de meio de mesma composição e que serviria para avaliar a velocidade de crescimento das células presentes.

Foram preparados quatro cultivos, a saber: esporos não irradiados de *T. reesei* QM9414 (QM9414 C); esporos não irradiados de *T. harzianum* IPT 821 (IPT 821 C); esporos de *T. reesei* QM9414 (QM9414 UV) irradiados por 17min; e, esporos de *T. harzianum* IPT 821 (IPT 821 UV) irradiados por 8 min. Ensaios feitos em duplicata.

Em paralelo aos cultivos nas placas de Petri, alíquotas de 10 mL de uma suspensão dos esporos irradiados, em meio contendo glicerol (20% v/v), foram obtidas através da raspagem das colônias com alça de platina e suspensão em água destilada estéril, e mantidas sob criopreservação a -80 °C, com a finalidade de se gerar um estoque com toda a variabilidade gerada pelos ensaios de mutagênese. As placas foram mantidas em estufa com controle de temperatura a 30 °C e o crescimento dos microrganismos foi acompanhado diariamente. Após 3 dias de incubação foi feita uma avaliação qualitativa do crescimento microbiano nas placas. Observou-se que o cultivo QM9414 UV apresentou o maior crescimento, já com a formação de esporos, seguido da placa QM9414 C. As placas IPT 821 C e IPT 821 UV não apresentaram diferenças visíveis significativas no crescimento dos fungos.

Depois de colonizadas, as superfícies das camadas de seleção das placas, foram raspadas novamente com auxílio de alça de platina, e os esporos e células transferidos para um meio liquefeito contendo metade da concentração da fonte de carbono – celulose – em relação ao meio da etapa anterior, ou seja, 5 g/L. Novamente o acompanhamento do crescimento microbiano foi feito diariamente, e após quatro dias, os esporos foram raspados da superfície da camada de seleção e transferidos para um meio liquefeito contendo metade da concentração de Avicel da placa anterior, ou seja, 2,5 g/L.

Figura 14 - Cultivo das cepas *T. reesei* QM9414 UV (esquerda) e *T. harzianum* IPT 821 UV (direita) em placas contendo camada de seleção.

FONTE: Lino (2012). As maiores colônias foram raspadas com alça de platina e cultivadas isoladamente.

Transcorridos três dias de observação foram isoladas 11 colônias do cultivo *T. reesei* QM9414 UV e 9 colônias do fungo *T. harzianum* IPT 821 UV. Estas colônias foram cultivadas em placas específicas para cada uma delas. As colônias foram isoladas com base na velocidade em que surgiram na superfície da placa (segundo dia) e tamanho.

Após período de incubação, os esporos foram raspados com alça de platina da superfície da placa e suspensos em água estéril. As suspensões foram usadas como inóculo em cultivo em meio semi-sólido (BCA/FT; 80/20) a fim de se obter estoque (armazenados a temperatura ambiente, em local escuro) de esporos dos fungos cultivados em meio contendo o substrato de interesse. Este procedimento teve por objetivo prevenir eventual redução da capacidade de produção das enzimas caso o microrganismo esteja em meio dotado de fonte de carbono de fácil assimilação (KILIKIAN; FACCIOITI; SCHMIDDEL, 1992).

5.3 Cultivos em meio semi-sólido dos mutantes selecionados em 5.2

As células das colônias que apresentaram crescimento vigoroso (conforme discutido no item 5.2), oriundas das cepas irradiadas *T. reesei* QM9414 e *T. harzianum* IPT 821 e cultivadas em meio com celulose AVICEL como única fonte de carbono (item 5.2), foram submetidas a cultivos em meio semi-sólido, juntamente com as respectivas cepas parentais, com o objetivo de se determinar a capacidade de produção de celulasas pelas cepas, num meio de cultura comercialmente viável (bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 80:20 (% em massa)). Os cultivos foram conduzidos em meio com umidade de 60%, durante 5 dias, como indicado no item 4.5. Tais condições foram definidas com base em trabalhos prévios do laboratório envolvendo produção de celulasas em meio semi-sólido (PINHEIRO, 2009).

A atividade celulolítica ("Filter Paper", FP) foi determinada pelo método descrito por Ghose (1982), conforme descrito no item 4.7. Cada cepa foi cultivada em duplicata (A e B) e para cada extrato enzimático foram feitas duas medidas de atividade enzimática de celulasas. Desta forma, cada cepa apresenta quatro valores de FP. As cepas selecionadas depois da irradiação (item 5.1) são identificadas pelo nome da cepa original e o número indica a ordem de obtenção das mesmas através do isolamento por raspagem com alça de platina (item 5.2, e.g. IPT 821/1 é a linhagem parental; QM9414/5 a quarta isolada, ou seja, quinta na coleção, etc.). As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados quanto a produção de

celulases para as cepas de *T. reesei* QM9414 e *T. harzianum* IPT 821. São apresentadas barras de desvio padrão das médias entre as 4 determinações dos valores de FP (U/gms) para cada cepa nas figuras 8 e 9. Os cultivos foram feitos em meio semi-sólido (BCA/FT; 80/20%), com umidade a 60%, durante 72h a 30 °C. O método de cultivo foi baseado em dados de trabalhos anteriores do grupo (Fernandes, 2008).

Tabela 1 - Atividade enzimática FP (U/gms) dos isolados de *T. reesei* QM9414.

Isolados		QM9414/1	QM9414/2	QM9414/3	QM9414/4	QM9414/5	QM9414/6
U/gms	A	3,5	3,1	2,7	2,9	3,3	3,0
	B	3,1	3,2	2,7	-	3,0	3,1
Isolados		QM9414/7	QM9414/8	QM9414/9	QM9414/10	QM9414/11	QM9414/12
U/gms	A	3,6	1,9	2,9	2,7	2,8	2,8
	B	3,0	2,4	2,6	2,7	3,6	2,9

FONTE: Lino (2012).

Figura 15 - Atividade enzimática FP (U/gms) dos isolados de *T. reesei* QM9414.

FONTE: Lino (2012).

Tabela 2 - Atividade enzimática FP (U/gms) dos isolados de *T. harzianum* IPT 821.

		Isolados	IPT821/1	IPT821/2	IPT821/3	IPT821/4	IPT821/5
U/gms	A		2,9	3,0	2,9	3,0	2,7
	B		3,0	2,7	2,7	3,0	3,1
		Isolados	IPT821/6	IPT821/7	IPT821/8	IPT821/9	IPT821/10
U/gms	A		3,1	2,7	3,4	2,2	3,6
	B		3,0	2,7	3,5	2,8	2,8

FONTE: Lino (2012).

Figura 16 - Comparação entre as atividades enzimáticas FP (U/gms) dos isolados de *T. harzianum* IPT 821.

FONTE: Lino (2012).

A significância da diferença entre os resultados de atividade enzimática dos isolados foi avaliada através de análise de variância (ANOVA) para $p < 0,05$. Porém, devido ao pequeno número amostral e a alta variabilidade dos resultados obtidos através da metodologia de cultivo em meio sólido, os resultados foram inconclusivos para ambas as cepas. Selecionou-se a cepa IPT 821/10 por ter apresentado um dentre os dois valores de atividade, significativamente maior a todos os demais valores (3,6 U/gms), apesar da cepa IPT 821/8 ter apresentado valor médio maior no cultivo em meio sólido. Foram feitos mais cultivos das cepas parental (IPT 821/1) e a selecionada (IPT 821/10), a fim de se comprovar se há de fato

diferença estatística entre ambas, no quesito atividade total enzimática. Desta forma as cepas parental - IPT 821 - e selecionada - IPT 821/10 – foram cultivadas em um maior número de repetições (6 para cada cepa; A,B,C,D, E e F), sob as mesmas condições de cultivo anteriormente aplicadas.

Tabela 3 - Resultados das análises de FP das repetições do cultivo das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10.

Cepa	FP (U/gms)					
IPT 821/1	1,98	2,12	2,66	2,21	2,38	2,2
IPT 821/10	3,13	4,14	2,7	3	3,21	3,23

FONTE: Lino (2012).

Figura 17 - Atividades enzimáticas FP (U/gms) obtidas nos cultivos das cepas *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10.

FONTE: Lino (2012).

Aplicou-se o teste estatístico t Student independente (avalia se as médias de dois grupos são significativamente diferentes, ou seja, se os valores das médias das atividades enzimáticas variam) aos resultados de atividade enzimática obtidos nas seis repetições dos cultivos em meio sólido das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10. A hipótese nula H_0 (considera que não existam diferenças reais nas duas populações; *i.e.* a fim de se confrontar com os dados experimentais obtidos deve-se gerar uma hipótese contrária) foi descartada.

Figura 18 - Valores médios de atividade enzimática FP no teste t Student, para as cepas IPT 821/1 (C1) e IPT 821/10 (C2).

FONTE: Lino (2012).

O resultado indicou ($p = 0,003$) que as médias dos dois grupos diferem de forma significativa (2,26 U/gms de IPT 821 e 3,24 U/gms de IPT 821/10). Observaram-se também diferenças visuais no cultivo das duas linhagens: ao terceiro dia a cepa isolada IPT 821/10 maior concentração de esporos no meio (evidenciada pela coloração esverdeada do meio, típico da pigmentação dos esporos) em comparação a cepa parental.

Após a comprovação estatística da diferença entre a atividade enzimática (U/gms) obtida nos cultivos da cepa *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10, ambas foram cultivadas em reator do tipo coluna de Raimbault para avaliação da produção específica de U/g cel (Unidades por grama de células). Porém, apesar da vazão utilizada ser baixa (cerca de 30 mL/min por coluna), foi o suficiente para promover o ressecamento do meio, influenciando o crescimento microbiano e, finalmente, a produção enzimática. Houve também dificuldades na leitura da concentração de oxigênio pelo sensor paramagnético do analisador, impossibilitando o cálculo de OUR. Devido à essas dificuldades operacionais, foi optado por descartar tais dados.

5.4 Análise e comparação das frações enzimáticas da cepa selecionada e da cepa parental

Dando continuidade à proposta original do projeto, novos cultivos das cepas *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10 foram realizados em erlenmeyer, como descrito no item 4.5, para determinação das três frações enzimáticas, a saber: FP (referente à atividade celulolítica total do coquetel enzimático), CMCase (referente à fração de endocelulase,

responsável pela quebra das ligações internas do polímero de glicose, assim destruindo sua estrutura microcristalina) e xilanase (responsável pela hidrólise de polímeros de pentose, como hemicelulose). Esperava-se desta forma, obter mais dados sobre a possível diferença entre as atividades FP determinadas para as duas cepas.

5.4.1 Comparação entre as frações de atividade de papel de filtro (FP) das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10

Foram feitos 12 cultivos independentes para cada uma das duas cepas, com duração de três dias, já que ensaios prévios indicaram a maior atividade enzimática em 72h, com declínio a partir deste instante. A tabela 4 apresenta os valores de FP (U/gms) obtidos.

Tabela 4 - Valores de FP obtidos após os novos cultivos das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10.

Cepas	FP (U/gms)					
IPT 821/1	1,96	2,18	2,17	2,14	2,41	2,76
	2,8	2,32	2,53	2,8	2,49	2,48
IPT 821/10	3,09	3,87	3,48	3,87	3,74	2,44
	3,67	3,74	2,57	4,03	3,9	4,26

FONTE: Lino (2012).

Figura 19 - Valores médios da atividade enzimática FP (U/gms) das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10 obtidas em 12 cultivos. As barras de erro referem-se aos desvios padrões.

FONTE: Lino (2012).

Foi-se usado o programa Minitab[®] 16 a fim de se avaliar a diferença estatística entre as médias através do teste t Student ($p < 0,05$). O teste indicou uma diferença significativa para ambas as cepas, no quesito atividade enzimática ($p = 0,001$).

Figura 20 - Comparação entre as médias dos valores de FP dos cultivos das cepas IPT 821/1 (C1) e IPT 821/10 (C2).

FONTE: Lino (2012).

A cepa IPT 821/10 apresenta atividade enzimática FP (U/gms) cerca de 50% superior em relação ao valor obtido pela cepa parental IPT 821/1.

5.4.2 Comparação entre as frações de CMCase das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10

A fração de CMCase corresponde à atividade de endocelulases, sendo que o complexo celulolítico de *Trichoderma* compreende cerca de 5 principais endocelulases (EG I, II, III, IV e V, além de BGV). Vale observar que também apresentam endocelulases intra e extracelulares (Sprey, 1988) e, através do método de extração enzimática empregado neste projeto, apenas a fração extracelular foi disponibilizada.

Devido ao baixo volume de amostra disponível, apenas 6 análises enzimáticas foram feitas para CMCase. Os valores obtidos para ambas as cepas são apresentados na tabela abaixo:

Tabela 5 - Valores de CMCase obtidos nos cultivos das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10.

Cepa		CMCase (U/gms)					
IPT 821/1	8,13	6,00	8,37	6,93	8,73	12,96	
IPT 821/10	6,39	6,70	9,25	9,23	6,63	8,16	

FONTE: Lino (2012).

Figura 21 - Valores médios da atividade de endocelulase (CMCase) em U/gms dos cultivos de *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10. As barras de erros referem-se aos desvios padrões.

FONTE: Lino (2012).

Os valores obtidos foram novamente inseridos em tabela do programa estatístico Minitab[®] 16 para se avaliar uma possível diferença estatística entre as médias, através do teste t Student ($p < 0,05$). O teste indicou que não há diferença estatística significativa em relação às médias de ambas as cepas ($p = 0,49$).

Figura 22 - Comparação entre as médias dos valores de CMCase obtidos nos cultivos das cepas de *T. harzianum* IPT 821/1 (C1) e IPT 821/10 (C2).

FONTE: Lino (2012).

É possível afirmar através destes dados que a atividade extra-celular (a fração que de fato nos interessa, por ser a passível de extração através de métodos simples em FES) de

endocelulases dos coquetéis enzimáticos não difere de forma significativa. Porém é necessário observar que este valor não representa, necessariamente, o valor total da atividade de CMCase, uma vez que a fração intracelular da mesma (assim como a atividade de β -glicosidase; BG V) não foi medida.

5.4.3 Comparação entre as frações de xilanase das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10

A fração do coquetel enzimático responsável pela hidrólise da hemicelulose em *Trichoderma* corresponde às enzimas XYN1 e XYN2, além de uma β -xilosidase extracelular (GH3; capaz de clivar ligações de xilooligossacarídios, assim como também apresenta atividade de arabinofurosidase). A metodologia empregada neste projeto permitiu inferir a atividade total das frações de xilanases, as quais atuam em sinergia para a hidrólise do substrato. Abaixo tabela apresentando os valores de atividade de xilanase obtidos.

Tabela 6 - Valores de atividade de xilanase obtidos nos cultivos das cepas IPT 821/1 e IPT 821/10.

Cepa	Xilanase (U/gms)						
IPT 821/1	2,66	2,95	3,4	2,2	3,62	3,98	4,65
	3,43	4,51	4,1	4,72	4	4,45	4,12
IPT 821/10	4,6	4,7	4,1	4,55	3,53	4,44	4,16
	5,33	6,08	5,25	3,82	5,46	5,56	6

FONTE: Lino (2012).

Figura 23 - Valores médios de atividade de xilanase (U/gms) dos doze cultivos das cepas de *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10. As barras de erros referem-se aos desvios padrões.

FONTE: Lino (2012).

Assim como com as outras frações enzimáticas, os valores obtidos foram analisados no programa Minitab[®] 16 usando-se o teste t Student. O teste indicou que para um intervalo o intervalo de confiança estipulado ($p < 0,05$), os valores das médias diferem de forma significativa ($p = 0,001$).

Figura 24 - Comparação entre as médias dos valores de xilanase obtidos nos cultivos das cepas de *T. harzianum* IPT 821/1 (C1) e IPT 821/10 (C2).

FONTE: Lino (2012).

Verificou-se que os coquetéis enzimáticos de ambas as cepas apresentam diferenças estatisticamente significativas em sua composição quanto à atividade enzimática de xilanase (valores médios de 4,65 U/gms para a cepa IPT 821/10 versus 3,99 U/gms para a cepa IPT 821/1), sendo o valor da cepa mutante 16% superior à cepa parental.

5.5 Hidrólise de celulose pelo extrato enzimático de *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10

Para os ensaios de hidrólise enzimática, foram usados extratos de cultivos em meio semi-sólido (item 4.5). Conhecendo a atividade enzimática dos extratos, foi possível aplicar a mesma atividade enzimática, FP (U)/grama de massa seca de substrato, para as duas cepas (IPT 821/1 e IPT 821/10), com base no ajuste do volume de extrato, permitindo desta forma comparar o potencial de hidrólise dos coquetéis enzimáticos. Devido ao baixo valor de FP obtido neste trabalho, aplicou-se concentração enzimática de apenas 2,5 U/gms nos ensaios de hidrólise, sendo que na maioria dos trabalhos publicados, aplica-se entre 10 e 30 U/gms. Nos ensaios de hidrólise promovidos pelo grupo (AFONSO; GOMES; KILIKIAN, 2010), utilizou-se títulos de 10 U/gms, obtendo-se cerca de 20% de conversão de Avicel em 48h.

Os ensaios foram feitos em duplicata, ensaios A e B, para ambas as cepas. Os baixos resultados de rendimento de hidrólise obtidos neste mestrado não permitiram observar

diferença na concentração de glicose, quantificada através de HPLC, entre as duas cepas para tempos de 3h e 6h de reação. Para os tempos de 24h e 48h já é possível observar uma diferença considerável nas amostras de hidrolisado da cepa mutante IPT 821/10 em relação à parental IPT 821/1.

Tabela 7 - Hidrólise do substrato Avicel pelo extrato enzimático bruto da cepa parental *T. harzianum* IPT 821/1 (2,5 U/gms).

	Tempo (h)	Concentração glicose (g/L)	Conversão de celulose a glicose (%)
A	0	0	0,0
	3	0,121	1,1
	6	0,182	1,6
	24	0,373	3,4
	48	0,535	4,8
B	0	0	0,0
	3	0,102	0,9
	6	0,199	1,8
	24	0,335	3,0
	48	0,541	4,9

FONTE: Lino (2012).

Tabela 8 - Hidrólise do substrato Avicel pelo extrato enzimático bruto da cepa mutante *T. harzianum* IPT 821/10 (2,5 U/gms).

	Tempo (h)	Concentração glicose (g/L)	Conversão de celulose a glicose (%)
A	0	0,063	0,0
	3	0,188	1,1
	6	0,176	1,0
	24	0,56	4,5
	48	0,964	8,1
B	0	0,033	0,0
	3	0,144	1,0
	6	0,199	1,5
	24	0,589	5,0
	48	0,97	8,4

FONTE: Lino (2012).

Observa-se que após 48h, obteve-se uma conversão de celulose em glicose cerca de 70% superior nos ensaios da cepa mutante em relação à parental (8,3% versus 4,8%).

Quatro hipóteses podem explicar essas diferenças: (1) diferença na constituição do coquetel enzimático da cepa de *T. harzianum* IPT 821/10 em relação à parental, como uma maior concentração de β -glicosidase ou de alguma celobiohidrolase; (2) maior afinidade pelo substrato, (3) menor inibição pelo produto final (glicose), ou (4) uma menor concentração de proteases no extrato enzimático da cepa mutante. Tais hipóteses explicariam o porquê de coquetéis com a mesma atividade enzimática FP (2,5 U/gms) resultarem rendimentos consideravelmente diferentes nos ensaios de hidrólise.

Figura 25 - Conversões de celulose a glicose obtidas nos ensaios de hidrólise de Avicel com extratos enzimáticos das cepas de *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10.

FONTE: Lino (2012).

6 CONCLUSÕES

6.1 Ensaios de mutagênese e seleção em placas com pressão seletiva

Foi observada uma sensibilidade maior do fungo *T. harzianum* IPT 821 à radiação em comparação a *T. reesei* QM9414. Para um valor próximo de 70% de letalidade foi necessário um tempo de exposição de 8 min. para *T. harzianum* IPT 821 e 15 min. para *T. reesei* QM9414.

Nos cultivos em placas contendo camada de seleção, *T. reesei* QM9414 apresentou crescimento mais rápido que *T. harzianum* IPT 821, o que resultou maior número de colônias irradiadas isoladas (12 para *T. reesei* QM9414 e 10 para *T. harzianum* IPT 821).

6.2 Cultivos em meio semi-sólido

Nenhum isolado da cepa *T. reesei* QM9414 se destacou em relação à parental no quesito atividade enzimática FP (U/gms).

Já para a cepa *T. harzianum* IPT 821, verificou-se produção de celulasas 50% superior à parental para o isolado IPT 821/10 (3,7 U/gms *versus* 2,6 U/gms). Este isolado foi usado até o final do estudo.

6.3 Atividades enzimáticas de xilanase e CMCase das cepas *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10

Verificou-se diferença na atividade de xilanase, tendo a cepa IPT 821/10 uma atividade cerca de 16% maior em comparação à parental (4,65 U/gms *versus* 4 U/gms).

Não foi verificada diferença entre as atividades de CMCase (endoglucanase) de ambas as cepas.

6.4 Hidrólise de Avicel com as enzimas das cepas *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10

Usando-se um título de 2,5 FPU/gms, o extrato da cepa parental resultou conversão de cerca de 4,8% do substrato a glicose, em 48h.

Já o extrato da cepa mutante resultou conversão de cerca de 8,3% nas mesmas 48h. Este valor é cerca de 70% superior à parental.

6.5 Conclusão Geral

A despeito do baixo valor final de produção de celulasas (U/gms), o resultado é prova conceitual de que a estratégia desenvolvida neste projeto pode ser eficiente para esta

finalidade, qual seja, obtenção de linhagens melhor produtoras de celulasas.

O presente trabalho ainda abre margem para um estudo mais profundo acerca da diferença observado nos ensaios de hidrólise com os extratos enzimáticos da cepa parental e mutada. Novas análises enzimáticas e de concentração proteica são necessários para que o motivo de tal diferença possa ser elucidado.

REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G. et al. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1467-1473 2007.
- AFONSO, L. C.; GOMES, E.; KILIKIAN, B.V. Potencial hidrolítico de celulases obtidas por fermentação em estado sólido em meio a bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja/ trigo. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 9., 2010, Rio de Janeiro. **Resumo...**, Rio de Janeiro: 2010. p. 116.
- ALBERTS B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. Nova Iorque: Garland Science, 2002.
- ANDERSSON, S. G .E.; KURLAND, C. G. Reductive evolution of resident genomes. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 263-268, 1998.
- ARJAN, J. A. et al. Diminishing returns from mutation supply rate in asexual populations. **Science**, v. 283, p. 404-406, 1999.
- ARO, N. et al. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276(26), p. 24309 – 24314, 2001.
- ARO, N. et al. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69(1), p. 56 – 65, 2003.
- BAILEY, J. Toward a science of metabolic engineering. **Science** v. 252, p. 1668-1677, 1991.
- BAILEY, J. E. et al. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 568-579, 2002.
- BAILEY, J. E TÄHTIHARJU, J. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, p. 156-162, 2003.
- BARCELLOS, F. G. **Caracterização genética e citológica da recombinação somática em *Trichoderma pseudokoningii***. 110 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) Escola Superior Agricultura Luiz de Queirós - Universidade de São Paulo, Piracicaba 2002.
- BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst**, v. 97, p. 142-145, 1972.
- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. **Journal of Industrial Microbiology and Technology**, v. 27, p. 87 – 93, 2001.

BERROCAL-TITO, G. M. et al. *Trichoderma artroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. **Eukariotic Cell**, v. 6(9), p. 1682 – 1692, 2007.

BESOAIN, X. A. et al. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 604–607, 2007.

CAIRNS, J., OVERBAUGH, J, MILLER, S. The origin of mutants. **Nature**, v. 335, p. 352-357, 1988.

CAMPO, N. et al. Genome plasticity in *Lactococcus lactis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 123-132, 2002.

CARERE, C. R. et al. Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1342-1360, 2008.

ÇAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 569–578, 2005.

COX, E. C.; GIBSON, T. C. Selection for high mutation rates in chemostats. **Genetics**, v. 77, p. 169-184, 1974.

EDUARDO, M. P. **Desempenho e homogeneidade de cultivos em meio sólido de *Monascus* sp. em biorreator do tipo tambor com agitação interna**: efeitos do padrão de agitação. 2010. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Escola Politécnica - Universidade de São Paulo 2010.

EKER, A. P. M. et al. Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 968 – 980, 2009.

EMRI, T.; MOLNÁR, Z.; PÓCSI, I. The appearances of autolytic and apoptotic markers are concomitant but differently regulated in carbon-starving *Aspergillus nidulans* cultures. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 297-303, 2006.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 24(2), p. 89 – 98, 1998.

DECKER, S. R. et al. Automated filter paper assay for determination of cellulose activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 107, p. 689–702, 2003.

DEMIRBAS, A. H. Combustion of biomass. **Energy sources part a: recovery, utilization, and environmental effects**, v. 29 (6), p. 549-561, 2007.

DIPARDO, J. Outlook for biomass ethanol production and demand. **Energy information administration: The National energy modeling system: an overview**, v. 1, p. 1-14, 2000.

FERNANDES, T.; PINHEIRO, I. ; KILIKIAN, B. V. Produção de celulases *Trichoderma reesei* RUT C30 em cultivos semi-sólidos utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8, 2008, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro : Editora UFRJ, 2008. p. 111-111.

FIERRO, F.; MARTÍN, J. F. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 25, p. 1-17, 1999.

FOSTER, P. L. Adaptive Mutation: Has the unicorn landed? **Genetics**, v. 148, p. 1453-1459, 1998.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDIA, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2-12, 2009.

FRANCIS, J. C; HANSCH, P. E. Directed evolution of metabolic pathways in microbial populations I. Modification of the acid phosphatase pH optimum in *S. cerevisiae*. **Genetics**, v. 70, p. 59-73, 1972.

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

GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; PATRICK, K. T. S. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. **Annual Reviews of Genetics**, v. 34, p. 165–186, 2000.

GUIMARÃES L. M. **Influência do preparo do inóculo e do pH na produção do antibiótico retamicina por *Streptomyces olindensis* So20**. 2000. f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

GODDARD, M. R.; BRADFORD, M. A. The adaptive response of a natural microbial population to carbon- and nitrogen- limitation. **Ecology Letters**, v. 6, p. 594-598, 2003.

GOLAN, D. et al. **Principles of Pharmacology: The pathogenic basis of drug therapy**. 3.ed. Filadélfia: Lippincot Williams & Wilkins, 2011.

GRAF, A.; KOEHLER, T. **Oregon cellulose-ethanol study**. An evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellulose-based feedstocks. Oregon, EUA: Oregon Office of Energy, 2000.

GRESSEL, J.; HARTMANN, K. M. Morphogenesis in *Trichoderma*: action spectrum of photo-induced sporulation. **Planta**, v. 79, p. 271-274, 1968.

HALL, B. G. Adaptive mutagenesis: a process that generates almost exclusively beneficial mutations. **Genetica**, v. 102/103, p. 109-125, 1998.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK G.; FAALJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28(4), p. 384-410, 2005.

HARIMA, T.; HUMPRHEY, A. E. Estimation of *Trichoderma reesei* QM9414 biomass and growth rate by indirect means. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 822 – 825, 1980.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2(1), p. 43- 56, 2004.

HAUER, B. et al. The development of enzymes for the preparation of chemicals. **Chimia**, v. 53, p. 613-616, 1999.

ILMEN, M.; THRANE, C.; PENTTIÄ, M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. **Molecular and General Genetics**, v. 251, p. 451-460, 1996.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, p. 68–73, 2000.

JAIN, R.; RIVERA, M. C.; LAKE, J. A. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 3801-3806, 1999.

JOGLEKAR, A. V; KARANTH, N. G. Studies on Cellulase Production by a Mutant - *Penicillium funiculosum* UV-49. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1079-1084, 1984.

JØRGENSEN, H. et al. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 862–870, 2007.

KAPLAN, A. et al. The inorganic carbon-concentrating mechanism in cyanobacteria: induction and ecological significance. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 917–924, 1989.

KATAYAMA, A.; MATSUMURA, F. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan by *Trichoderma harzianum*. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 12, p. 1059 – 1065, 1993.

KARAFFA L. et al. D-galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. **Microbiology**, v. 152, p. 1507-1514, 2006.

KILIKIAN, B. V.; FACCIOTI, M. C. R; SCHIMIDELL, W. Analysis of the kinetic pattern of glucoamylase production regarding the *Aspergillus awamori* preservation time. **Brazilian Journal of Microbiology**, v: 23(2), p. 123–127, 1992.

KING, B. C. et al. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102(4), p. 1033–1044, 2009.

KOVÁCS, K. et al. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 48-55, 2008.

LE BOURGEOIS, P.; DAVERAN-MINGOT, M. L.; RITZENTHALER, P. Genome plasticity among related *Lactococcus* strains: identification of genetic events associated with macrorestriction polymorphisms. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2481-2491, 2000.

LEIGH, VAN V. A new evolutionary law. **Evolutionary Theory**, v. 1, p. 1–30, 1973.

LIMA, C. A. F. **Análise econômica do processo de produção de celulases**. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LIU, Y. G. et al. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96(11), p. 6535-6540, 1999.

LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-465, 1996.

LONG, H.; WANG, T. H.; ZHANG, Y. K. Isolation of *Trichoderma reesei* pyrG negative mutant by UV Mutagenesis and its application in transformation. **Chemical Researches of Chinese Universities**, v. 28(5), p. 565-569, 2008.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, Y. et al. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 360–369, 2010.

LUCHT, J. M.; BREMER, E. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 14(1), p. 3–20, 1994.

LUONG, J. H .T. Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 242-248, 1986.

MACEDO, I. C. **Sugarcane's Energy**: Twelve Studies on Brazilian Sugarcane Agribusiness and its Sustainability. São Paulo, Brasil: União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2005.

MACH, R. L.; ZEILINGER, S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 60, p. 515-522, 2003.

MADAN BABU, M.; ARAVIND, L. Adaptive evolution by optimizing expression levels in different environments. **Trends in Microbiology**, 2005.

MANDELS M. **Production and Applications of Cellulase**. Massachusetts, EUA: Laboratory Procedures Handbook, U.S. Army Materials Laboratories, 1974.

MELO I. S.; FAULL, J. L.; GRAEME-COOK, K. A. Relationship between in vitro cellulase production of UV-induced mutants of *Trichoderma harzianum* and their bean rhizosphere competence. **Mycological Research**, v. 101, p. 1389 – 1392, 1997.

MIETTINEN-OINONEN, A.; SUOMINEN, P. Production of *Trichoderma reesei* Endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3956-3964, 2002.

MILLER, J. H. Spontaneous mutators in bacteria: insight into pathways of mutagenesis and repair. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 625-643, 1996.

MÜLLER, H. J. The relation of recombination to mutational advance. **Mutation Research**, v. 106, p. 2-9, 1964.

NIELSEN, J. Metabolic engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 263-283, 2001.

OMELCHENKO, M. V. et al. Evolution of mosaic operons by horizontal gene transfer and gene displacement in situ. **Genome Biology**, v. 4, p. 55, 2003.

NOGUEIRA, H. L. A. et al. **Etanol de cana-de-açúcar** : energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, Brasil: BNDES e CGEE, 2008.

PAREKH, S.; VINCI, V. A.; STROBEL, R. J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54(3), p. 287–301, 2000.

PEDROTTA, V.; WITHOLT, B. Isolation and Characterization of the cis-trans- Unsaturated Fatty Acid Isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 3256-3261, 1999.

PETRI, R.; SCHMIDT-DANNERT, C. Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 298-304, 2004.

PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 51/52, p. 117 -124, 1995.

PINHEIRO, I. R. Produção de celulasas e xilanases por fermentação semi-sólida utilizando diferentes microrganismos e diferentes composições de meio de cultivo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17. 2009, Natal. **Resumos...**, 2009.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais**. Rio de Janeiro: CGEE, 2006.

PUHAN, S. et al. Oil (*Madhuca indica* Seed Oil) Methyl Ester as Biodiesel-Preparation and Emission Characteristics. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 87-93, 2005.

RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biokhimiya**, v. 67, p. 1026-1050, 2000.

RAMOS, C., MØLBAK, L.; MOLIN, S. Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 801-809, 2000.

RECZEY, K. et al. Cellulase production by *T. reesei*. **Bioresource Technology** v. 57, 25-30, 1996.

REESE, E. T. History of cellulase program at the U.S. army Natick Development Center. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 6, p. 9–20, 1976.

ROBERTSON, D. E. et al. The discovery of new biocatalysts from microbial diversity. **Society for Industrial Microbiology News**, v. 46, p. 3-8, 1996.

RODRIGUES, R. **Cultivo de *Monascus* sp. em arroz**: quantificação de metabólitos secundários por cromatografia líquida e estimativa de crescimento celular baseado no balanço gasoso. 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Escola Politécnica - Universidade de São Paulo 2003.

ROWLANDS, R. T. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. **Enzyme Microbial Technology**, v. 6, p. 3-10, 1984.

RUDOLF, A. et al. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme Microbial Technology**, v. 37, p. 195–204, 2005.

RYAN, F. J. Bacterial mutation in a stationary phase and the question of cell turnover. **Journal of General Microbial**, v. 21, p. 530, 1959.

RYAN, F.; OKADA, T.; NAGATA, T. Spontaneous mutation in spheroplasts of *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 30, p. 193-199, 1968.

SAAVEDRA, T. R. et al. Novel light-regulated genes in *Trichoderma atrovirens*: a dissection by cDNA microarrays. **Microbiology**, v. 152, p. 3305-3317, 2006.

SAEMAN, J. F. Kinetics of wood saccharification: hydrolysis of cellulose and decomposition of sugar in dilute acid at high temperatures. **Industry Engineering Chemistry**, v. 37(1), p. 43-52, 1945.

SALOHEIMO, M. et al. Characterization of secretory genes ypt1/yptA and nsf1/nsfA from two filamentous fungi: induction of secretory pathway genes of *Trichoderma reesei* under secretion stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70(1), p. 459-467, 2004.

SAMETZ-BARON, L. et al. Photoreactivation of UV-inactivated spores of *Trichoderma harzianum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65(5), p. 849 – 854, 1997.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. **Mycological Research**, v. 100(8), p. 923–935, 1996.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99(13), p. 5270-5295, 2008.

SAUER U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 73, p. 129-169, 2001.

SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. **Renewable e Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 167-178, 2009.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, SP: Editora Edgard Blücher, 2001.

- SCHULEIN, M. Cellulases of *Trichoderma reesei*. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 234-242, 1988.
- SHEEHAN, J. et al. Life cycle inventories of biodiesel and petroleum diesel. Madison: **BioEnergy'98: Expanding Bioenergy Partnerships Proceedings**, v. 2, p. 1230-1239, 1998.
- SNIEGOWSKI, P. D.; GERRISH, P. J.; LENSKI, R. E. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. **Nature**, v. 387, p. 703-705, 1997.
- SOUZA, T. F. C. **Seleção de microrganismos produtores de celulases e xilanases em cultivos semi-sólidos**. 2009. 28 f. Monografia (Graduação em Engenharia Química). Escola Politécnica - Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.
- SPREY, B. Cellular and extra cellular localization of endocellulase in *Trichoderma reesei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55(3), p. 283-294, 1988.
- STERNBERG, D. A method for increasing cellulase production by *Trichoderma viride*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 18, p. 1751-1760, 1976.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases - Production, application and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 832-844, 2005.
- SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feedstock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.
- SUN, Y.; CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.
- TADDEI, F. et al. Role of mutators in adaptive evolution. **Nature**, v. 387, p. 700-702, 1997.
- TOBIN M. B.; GUSTAFSSON C., HUISMAN G. W. Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10 (4), p. 421-427, 2000.
- TOYAMA H., YAMAGISHI N., TOYAMA N. Rapid selection system of strains with higher AVICEL degrading ability in a cellulolytic fungus, *Trichoderma*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 257-263, 2002.
- VAHERI, M. P.; VAHERI, M. E. O.; KAUPINEN, V. S. Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 73-80, 1979.
- VELICER, G. J. Pleiotropic effects of adaptation to a single carbon source for growth on alternative substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 264-269, 1999.
- VINCI, V. A.; BYNG, G. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington, EUA: American Society for Microbiology, 1999. 830p.

WALKER, J. E.; MIROUX, B. Selection of *Escherichia coli* host that are optimized for the overexpression of proteins. **Manual of industrial Microbiology and Biotechnology**, Washington: American Society for Microbiology, 1999, p. 575-584.

WANG, T. et al. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. **Biomolecular Engineering**, v. 22, p. 89-94, 2005.

WEAVER, D. et al. Genome plasticity in Streptomyces: identification of 1 Mb TIRs in the *S. coelicolor* A3(2) chromosome. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 1535-1550, 2004.

WEBER, S. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies of photolyase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1707, p. 1 – 23, 2005.

WEIKERT, C.; SAUER, U.; BAILEY, J. E. Use of a glycerol-limited, long-term chemostat for isolation of *Escherichia coli* mutants with improved physiological properties. **Microbiology**, v. 143, p. 1567-1574, 1997.

WÜRLEITNER, E. et al. Transcriptional Regulation of xyn2 in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryot Cell**, v. 2(1), p. 150–158, 2003.

ZEILINGER, S. et al. The *Hypocrea jecorina* HAP2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG-box) within the cbh2 (cellobiohydrolase II-gene) activating element. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 266, p. 56–63 2001.

ZELDER, O.; HAUER, B. Environmentally directed mutations and their impact on industrial biotransformation and fermentation processes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 248-251, 2000.

ZHANG, Y.; MICHAEL, E. H.; JONATHAN, R. M. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHOU, J. et al. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6826-6833, 2008.

IOWA STATE UNIVERSITY. **Ag Decision Maker Newsletter January 2009**. Available from: <<http://www.extension.iastate.edu/agdm/>> Acesso em 13 jan. 2012.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR. **Safra 2010**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>> Acesso em 10 dez. 2011.

MARKET RESEARCH. **Industrial enzyme market 2010-2014**. Available from: <<http://www.marketresearch.com>> Acesso em 17 jul. 2011.

WIKIPEDIA THE FREE ENCYCLOPEDIA. **UV Radiation**. Available from: <<http://www.wikipedia.com>> Acesso em 13 jul. 2011.

Apêndices

Apêndice A – Análise ANOVA pelo programa Minitab® das atividades enzimáticas (FP) das cepas *T. reesei* QM9414 parentais e isoladas

One-way ANOVA: C2 versus C1

Source	DF	SS	MS	F	P
C1	11	2,4769	0,2252	3,50	0,021
Error	12	0,7719	0,0643		
Total	23	3,2487			

S = 0,2536 R-Sq = 76,24% R-Sq(adj) = 54,46%

Pooled StDev = 0,2536

**Apêndice B - Análise ANOVA pelo programa Minitab® das atividades enzimáticas (FP) das
cepas *T. harzianum* IPT 821 parentais e isoladas**

One-way ANOVA: FP versus Cepas

Source	DF	SS	MS	F	P
Cepas	9	1,035	0,115	0,89	0,565
Error	10	1,294	0,129		
Total	19	2,329			

S = 0,3597 R-Sq = 44,44% R-Sq(adj) = 0,00%

Pooled StDev = 0,3597

Apêndice C – Teste t Student pelo programa Minitab® comparando as atividades enzimáticas (FP) das cepas T. harzianum IPT 821/1 e IPT 821/10

Two-Sample T-Test and CI: C1; C2

Two-sample T for C1 vs C2

	N	Mean	StDev	SE Mean
C1	14	2,468	0,282	0,075
C2	14	3,602	0,732	0,20

Difference = mu (C1) - mu (C2)

Estimate for difference: -1,134

95% CI for difference: (-1,578; -0,689)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -5,41 P-Value = 0,000 DF = 16

Apêndice D – Teste t Student pelo programa Minitab® comparando as atividades enzimáticas (CMCase) das cepas T. harzianum IPT 821/1 e IPT 821/10

Apêndice E– Teste t Student pelo programa Minitab® comparando as atividades enzimáticas (xilanase) das cepas T. harzianum IPT 821/1 e IPT 821/10

Apêndice F – Cromatogramas e análises das hidrólises de Avicel pelo coquetel enzimático das cepas *T. harzianum* IPT 821/1 e IPT 821/10

*repetições da cepa *T. harzianum* IPT 821/1 para os tempos 0, 3, 6, 24 e 48h: 1A0; 1A3; 1A6; 1A24; 1A48; 1B0; 1B3; 1B6; 1B24; 1B48.

repetições da cepa *T. harzianum* IPT 821/1 para os tempos 0, 3, 6, 24 e 48h: 10A0; 10A3; 10A6; 10A24; 10A48; 10B0; 10B3; 10B6; 10B24; 10B48.

controles para os tempos 0, 3, 6, 24 e 48h: C0; C3; C6; C24; C48.

Condições do experiment

Calibration Curve

LinearID# : 1
 Name : Glucose
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x) = 500141 \cdot x - 605.572$
 Rr1=0.9999976 Rr2=0.9999952
 MeanRF:498701 RFSD:1294.19 RFRSD:0.259512
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A

#	Conc. (Ratio)	MeanArea	Area
1	0.200	99384.6	99385
2	0.400	199111.1	199111
3	0.600	299970.2	299970
4	0.800	399695.1	399695
5	1.000	499233.3	499233

<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Glucose

Title	Conc.	Units	Ret. Time	Area	Height	Date Acquire
amostra 1A0.lcd	0.000	g/L	0.000	0	0	12/19/2011
amostra 1A6.lcd	0.182	g/L	9.153	90214	3931	12/19/2011
amostra 1A3.lcd	0.121	g/L	9.148	59972	2644	12/19/2011
amostra 1A24.lcd	0.373	g/L	9.157	186042	7888	12/19/2011
amostra 1A48.lcd	0.535	g/L	9.158	266763	11164	12/20/2011
amostra 1B0.lcd	0.000	g/L	0.000	0	0	12/19/2011
amostra 1B3.lcd	0.102	g/L	9.148	50475	2195	12/19/2011
amostra 1B6.lcd	0.199	g/L	9.153	99068	4309	12/19/2011
amostra 1B24.lcd	0.335	g/L	9.157	166854	7059	12/19/2011
amostra 1B48.lcd	0.541	g/L	9.160	270089	11312	12/20/2011
amostra 10A0.lcd	0.063	g/L	9.130	30752	1301	12/19/2011
amostra 10A3.lcd	0.188	g/L	9.147	93438	3842	12/19/2011
amostra 10A6.lcd	0.176	g/L	9.153	87475	3748	12/19/2011
amostra 10A24.lcd	0.560	g/L	9.158	279283	12001	12/19/2011
amostra 10A48.lcd	0.964	g/L	9.149	481595	24426	12/19/2011
amostra 10B0.lcd	0.033	g/L	9.130	15989	863	12/19/2011
amostra 10B3.lcd	0.144	g/L	9.151	71491	3088	12/19/2011
amostra 10B6.lcd	0.199	g/L	9.152	98960	4238	12/19/2011
amostra 10B24.lcd	0.589	g/L	9.158	293872	12568	12/19/2011
amostra 10B48.lcd	0.970	g/L	9.161	484740	20328	12/20/2011
amostra C0.lcd	0.000	g/L	0.000	0	0	12/19/2011
amostra C3.lcd	0.000	g/L	0.000	0	0	12/19/2011
amostra C6.lcd	0.000	g/L	0.000	0	0	12/19/2011
amostra C24.lcd	0.000	g/L	0.000	0	0	12/19/2011
amostra C48.lcd	0.000	g/L	0.000	0	0	12/20/2011
Average	0.349		9.151	173726	7606	
%RSD	82.443		0.097	82.730	86.731	
Maximum	0.970		9.161	484740	24426	

Title	Conc.	Units	Ret. Time	Area	Height	Date Acquire
Minimum	0.033		9.130	15989	863	
Standard Deviation	0.287		0.009	143723	6597	