



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização do Perfil Enzimático de um Fungo Isolado do Cerrado Brasileiro

Bruno Benoliel Rocha

Orientadora: Prof^ª. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Brasília, fevereiro de 2012



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização do Perfil Enzimático de um Fungo Isolado do Cerrado Brasileiro

Bruno Benoliel Rocha

Orientadora: Prof^a. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, fevereiro de 2012

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular,
Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Eliane Ferreira Noronha – Examinadora (UnB)

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa – Examinador Externo (UFG)

Prof^ª. Dr. Nádia Skorupa Parachin - Examinadora (UnB)

Prof^ª. Dra. Tainá Raiol Alencar – Examinadora (UnB)

Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller – Suplente (UnB)

Índice

Índice de figuras	i
Índice de tabelas	iii
Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução	1
1.1. Biocombustíveis e a situação energética mundial	1
1.2. Fontes alternativas	6
1.3. Etanol a partir da biomassa lignocelulósica	8
1.4. Materiais lignocelulósicos	10
1.5. Microrganismos envolvidos na sacarificação	11
1.6. Mecanismos de ação das celulasas	12
1.7. Novas linhagens	14
1.8. Bioma Cerrado	16
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Metodologia	21
3.1. Coleta dos fungos	21

3.2. Obtenção de esporos	22
3.3. Linhagens utilizadas	22
3.4. Manutenção das linhagens	23
3.5. Teste de sensibilidade a higromicina	23
3.6. Seleção em placa de fungos celulolíticos	24
3.7. Classificação das linhagens isoladas	25
3.8. Extração de DNA total	25
3.9. Amplificação do DNA	25
3.10. Análise de ácidos nucléicos por eletroforese em gel de agarose	26
3.10.1. Soluções para eletroforese em gel de agarose	27
3.11. Purificação dos produtos de PCR	28
3.12. Sequenciamento	28
3.13. Análise das sequências	29
3.14. Avaliação da produção de celulases pelas linhagens de fungos	30
3.14.1. Fermentação submersa	30
3.14.1.1. Sem etapa de pré-inóculo	30
3.14.1.2. Com etapa de pré-inóculo	31
3.14.2. Preparo da celulignina semi-deslignificada	32
3.14.2.1. Pré-tratamento ácido	32
3.14.2.2. Pré-tratamento alcalino	33
3.15. Ensaio enzimáticos	33

3.15.1. Atividade de endoglicanases	33
3.15.2. Atividade de exoglicanases	35
3.15.3. Atividade de celulases totais	35
3.15.4. Atividade de xilanases	36
3.15.5. Atividade de β -glicosidases	37
3.15.6. Hidrólise do bagaço de cana de açúcar	38
3.16. Precipitação de proteínas com TCA e acetona	38
3.17. Ultrafiltração com Amicon 8400	39
3.18. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	39
3.19. Análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante	40
3.19.1. Condições de eletroforese em gel de poliacrilamida	40
3.19.2. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	41
3.19.3. Atividade enzimática em gel de poliacrilamida	42
3.19.4. Coloração com <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	43
3.19.4.1. Soluções para coloração com <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	43
3.19.5. Coloração com Prata	43
3.19.5.1. Soluções para coloração com Prata	44
4. Resultados	46
4.1. Coleta, isolamento e seleção dos fungos	46
4.2. Manutenção e armazenamento das linhagens	48
4.3. Identificação das linhagens isoladas	49

4.4. Avaliação da produção de celulases pelos isolados selecionados	56
4.5. Análises enzimáticas da linhagem L04	69
4.6. Avaliação do perfil de proteínas secretado por SDS-PAGE	78
4.7. Hidrólise do bagaço de cana de açúcar	80
4.8. Sensibilidade a higromicina	81
5. Discussão	83
6. Conclusões	92
7. Perspectivas	93
8. Referências Bibliográficas	95
9. Anexos	109

Índice de figuras

Figura 1.	Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase	13
Figura 2.	Cultivo de alguns isolados do cerrado em BDA	49
Figura 3.	Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA total extraído de alguns isolados	50
Figura 4.	Estrutura do cluster gênico que codifica o RNA ribossomal	50
Figura 5.	Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da amplificação da região ITS1 e 2 de alguns isolados	51
Figura 6.	Atividade de endoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC+SIG, utilizando CMC como substrato para a reação enzimática	57
Figura 7.	Atividade de exoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC+SIG, utilizando SIG como substrato para a reação enzimática	58
Figura 8.	Atividade de β -glicosidases dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC+SIG, utilizando ρ NPG como substrato para a reação enzimática	59
Figura 9.	Atividade de endoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC, utilizando CMC como substrato para a reação enzimática	62
Figura 10.	Atividade de endoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por BCA, utilizando CMC como substrato para a reação enzimática	63
Figura 11.	Atividade de exoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC, utilizando SIG como substrato para a reação enzimática	64
Figura 12.	Atividade de exoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por CSD, utilizando SIG como substrato para a reação enzimática	65
Figura 13.	Atividade de exoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por BCA, utilizando SIG como substrato para a reação enzimática	66
Figura 14.	Atividade de β -glicosidases dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC, utilizando como substrato para a reação	67

enzimática

Figura 15.	Atividade de β -glicosidases dos isolados em diferentes tempos de indução por CSD, utilizando ρ NPG como substrato para a reação enzimática	68
Figura 16.	Atividade de β -glicosidases dos isolados em diferentes tempos de indução por BCA, utilizando ρ NPG como substrato para a reação enzimática	68
Figura 17.	Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 induzidas por diferentes substratos	70
Figura 18.	Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 e <i>T. reesei</i> induzidas por BCA	72
Figura 19.	Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 e <i>T. reesei</i> (T.r.) induzidas por CMC	73
Figura 20.	Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 e <i>T. reesei</i> (T.r.) induzidas por SIG	74
Figura 21.	Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 e <i>T. reesei</i> (T.r.) induzidas por XIL	75
Figura 22.	SDS-PAGE e zimograma do sobrenadante da cultura do fungo L04 induzido por BCA	79
Figura 23.	Hidrólise de 10% de bagaço de cana (BCA) e de celulignina semi-deslignificada (CSD) utilizando o coquetel de enzimas produzido por <i>T. harzianum</i> L04.	81
Figura 24.	Teste de sensibilidade do fungo L04 à higromicina	82

Índice de tabelas

Tabela 1.	Composição do meio MYG	21
Tabela 2.	Composição do meio BDA	21
Tabela 3.	Composição do meio semi-sólido para fermentação	22
Tabela 4.	Composição do meio para pré-inóculo	25
Tabela 5.	Características dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados	26
Tabela 6.	Composição do meio para fermentação submersa	31
Tabela 7.	Relação crescimento/ halo de hidrólise dos fungos isolados utilizando <i>P. funiculosum</i> e <i>T. harzianum</i> IOC3844 como modelos de fungo celulolítico	47
Tabela 8.	Identificação das linhagens isoladas	56
Tabela 9.	Valores máximos observados da produtividade de celulasas, em crescimento indireto com indução por CMC+SIG, pelos isolados do cerrado e pelos fungos modelo <i>T. harzianum</i> IOC3844 e <i>P. funiculosum</i>	60
Tabela 10.	Valores máximos de produtividade volumétrica observados para a produção de celulasas por isolados do cerrado e pelos fungos <i>T. harzianum</i> IOC3844 e <i>P. funiculosum</i> em crescimento indireto com indução por CMC+SIG	61
Tabela 11.	Comparação dos valores máximos de produtividade volumétrica observados para a produção de celulasas pelas linhagens L04 e <i>Trichoderma reesei</i> Rut C30 induzidas por diferentes fontes de carbono	77

Abreviaturas

atm	- pressão manométrica
BCA	- bagaço de cana-de-açúcar
CBP	- bioprocesso consolidado
cm	- centímetro
CMC	- carboximetilcelulose
CSD	- celulignina semi-deslignificada
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DNS	- ácido dinitrosalicílico
dNTP	- deoxirribonucleotídeo
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	- brometo de etídeo
FP	- papel de filtro
g	- grama
g	- força gravitacional
h	- hora
ITS	- região espaçadora transcrita interna do rDNA
kDa	- kiloDaltons
L	- litro
M	- molar
mg	- miligrama
mL	- mililitro
mM	- milimolar
mm	- milímetro
MTBE	- Éter metil terc-butílico
ng	- nanograma
nm	- nanômetro
n°	- número
°C	- graus centígrados
P.f.	- <i>Penicillium funiculosum</i>
p/v	- peso por volume
PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida

pb	- pares de base
PCR	- Reação de Polimerização em Cadeia
pH	- potencial hidrogeniônico
PMSF	- phenylmethylsulfonyl fluoride
rDNA	- ácido desoxirribonucleico ribossomal
rpm	- rotações por minuto
SDS	- dodecilsulfato de sódio
SHF	- hidrólise e fermentação separadas
SIG	- celulose microcristalina
SSF	- hidrólise e fermentação simultâneas
T.h.	- <i>Trichoderma harzianum</i>
T _m	- temperatura de desnaturação
T.r.	- <i>Trichoderma reesei</i>
TAE	- Tampão Tris-acetato EDTA
TCA	- Ácido tricloroacético
TEB	- Tampão Tris-Borato EDTA
U	- unidade
V	- volts
v/v	- volume por volume
XIL	- xilana
μg	- micrograma
μL	- microlitro
μM	- micromolar
μmol	- micromol
ng	- nanograma
ρmoles	- picomoles
ρNP	- 4-nitrofenol
ρNPG	- 4-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo

Resumo

O Brasil é um grande produtor de resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana. Esse substrato poderia ser usado como matéria-prima para produção microbiana de celulases com a finalidade de desenvolver processos sustentáveis como a produção de etanol de segunda geração. Para isso, este trabalho teve como objetivo a triagem de cepas fúngicas isoladas do Cerrado brasileiro com atividades celulolíticas. Entre os 13 isolados analisados o *Trichoderma harzianum* (L04) foi identificado como um promissor candidato para a produção de celulase quando cultivado em bagaço de cana *in natura*. A linhagem L04 revelou um complexo celulolítico bem equilibrado, apresentando uma rápida cinética de produção de endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases, obtendo valores máximos de atividades de 4022 UL^{-1} (72 h), 1228 UL^{-1} (120 h) e 1968 UL^{-1} (48 h), respectivamente. Cerca de 60 % de rendimento de glicose foram obtidos a partir do bagaço de cana após 18 horas de hidrólise. Esta nova linhagem representa um candidato em potencial para a produção de celulases utilizando bagaço de cana como fonte de carbono.

Abstract

Brazil is a major producer of agro-industrial residues, such as sugarcane bagasse, which could be used as raw material for microbial production of cellulases as an important strategy for the development of sustainable processes of second generation ethanol production. For this purpose, this work aimed at screening for glycosyl hydrolase activities of fungal strains isolated from the Brazilian Cerrado. Among 13 isolates, a *Trichoderma harzianum* strain (L04) was identified as a promising candidate for cellulase production when cultured on in natura sugarcane bagasse. Strain L04 revealed a well-balanced cellulolytic complex, presenting fast kinetic production of endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases, achieving 4,022, U.L⁻¹ (72 h), 1,228 U.L⁻¹ (120 h) and 1,968 U.L⁻¹ (48 h) as the highest activities, respectively. About 60% glucose yields were obtained from sugarcane bagasse after 18 hours hydrolysis. This new strain represents a potential candidate for on-site enzyme production using sugarcane bagasse as carbon source.

Caracterização do Perfil Enzimático de um Fungo Isolado do Cerrado Brasileiro

1. Introdução

1.1. Biocombustíveis e a situação energética mundial

No atual momento da sociedade humana um dos maiores desafios enfrentados é o de atender as demandas mundiais de energia, principalmente com a necessidade da mudança da matriz energética. Os anos de negligência aos combustíveis renováveis trouxeram uma iminente crise energética, com a grande dependência da importação de petróleo pelos países desenvolvidos. Cerca de 80% do suprimento mundial de energia consiste no uso deste composto (Goldemberg, 2007). Somente os Estados Unidos, que possuem 5% da população mundial, importam um quarto do petróleo produzido no planeta, consumindo cerca de 20 milhões de barris diariamente (Gray *et al.*, 2006; Demain, 2009). A comercialização do petróleo é feita basicamente por um consórcio de países que constantemente encontra-se em situação de instabilidade devido a guerras e questões políticas delicadas. Como consequência a esses conflitos locais, frequentes oscilações no valor do petróleo afetam diretamente a economia mundial.

Enfrentar a crise energética e ambiental causada pelo alto consumo e custos elevados de combustíveis fósseis, tem estimulado a conscientização mundial para o desenvolvimento sustentável. Investir financeira e intelectualmente em energia renovável é a maneira mais eficiente para alcançá-lo. A Comissão Mundial de Meio Ambiente e Desenvolvimento (World Commission on Environment and Development – WCED) definiu em 1987 o termo “desenvolvimento sustentável” como “meio de se atingir as necessidades do presente sem comprometer a habilidade de gerações futuras

de alcançarem suas próprias necessidades”. O consumo desenfreado de fontes energéticas não-renováveis tem ferido gravemente este conceito e o objetivo por ele proposto.

Diante destas constatações, é cada vez mais evidente que a soberania de mais de 30 anos do petróleo na indústria de combustíveis aproxima-se do fim. Os esforços dos setores responsáveis não devem concentrar-se apenas na disponibilização de novas reservas de petróleo, pois crescente é a demanda por combustíveis assim como é crescente a conscientização da população mundial a respeito dos danos da queima de combustíveis fósseis. O consumo desgovernado desta fonte de energia tem produzido intensas mudanças climáticas, afetando a qualidade de vida em muitos países. No que concerne somente à emissão de gases estufa, espera-se que em 2030 seja produzido o dobro dos valores atuais (Demain, 2009). Temendo previsões alarmantes como essa, países como os Estados Unidos planejam uma redução de 20% no consumo de gasolina em menos de 10 anos (Ruth, 2008).

Com vistas à substituição dos combustíveis fósseis estratégias tecnológicas têm surgido, sugerindo alternativas e exigindo um grande comprometimento da comunidade científica. Nos dias de hoje as fontes renováveis de energia somente equivalem em volume a 2,5% dos 85 milhões de barris de petróleo consumidos por dia, e este número deve aumentar para 105 milhões até 2015 (Demain, 2009). Segundo Goldemberg (2007), cerca de 2% do suprimento de energia mundial se deve ao emprego de fontes abundantes e renováveis, como é o caso da biomassa vegetal, da qual derivam os biocombustíveis (Howarth e Bringezu 2008).

Os esforços têm se concentrado preferencialmente em biocombustíveis líquidos, uma vez que podem substituir os combustíveis atualmente utilizados sem necessidade

de grandes modificações nos motores de automóveis e nas redes de abastecimento. Dentre os biocombustíveis líquidos disponíveis atualmente, o bioetanol destaca-se, tendo sido gerados 55 bilhões de litros em 2007, sendo que o Brasil e os Estados Unidos foram por décadas responsáveis por 75% de sua produção. Nos últimos anos, o bioetanol respondeu por 99% dos biocombustíveis comercializados nos EUA (Farrell, 2006), e a perspectiva é de que até 2030 esta categoria de combustíveis substitua 30% dos combustíveis atualmente consumidos (Schubert, 2006). Até o presente momento, somente o biodiesel e o bioetanol têm sido produzidos em escala industrial, sempre com a produção de bioetanol em níveis superiores aos do biodiesel (Howarth e Bringezu 2008).

Apesar de apresentar somente 2/3 do conteúdo energético da gasolina, o etanol apresenta-se como uma alternativa interessante à indústria de combustíveis em função de sua alta octanagem, reduzida toxicidade ao ser humano e maior biodegradabilidade, podendo também substituir os atuais aditivos misturados à gasolina (Demain, 2009). Entretanto, a maior vantagem deste combustível é também seu maior apelo ecológico: o etanol é menos poluente tanto em relação à emissão de compostos tóxicos contendo chumbo e enxofre, como também na emissão de gases estufa como metano e dióxido de carbono (Goldemberg, 2007). Esse fato se deve ao sequestro de carbono executado durante a fotossíntese por organismos vegetais, gerando um saldo inferior de emissão de compostos de carbono durante sua queima (Frazzetto, 2003).

O Brasil difere de outros países por já possuir experiência na comercialização de álcool combustível. Durante o programa Pró-Álcool nos anos 70, o governo federal estipulou uma mistura de 25% de etanol na gasolina comercializada e encorajou fabricantes de automóveis a produzirem motores que consumissem etanol 100%. A

motivação e o contexto eram semelhantes aos de hoje: necessidade de diminuição da dependência do petróleo e conseqüente redução de sua importação. Em seguida foram percebidos os benefícios ecológicos de sua utilização: diminuição do uso de aditivos tóxicos à gasolina como o MTBE (metil-tércio-butil-éter) e diminuição da emissão de gases poluentes.

Naquele momento o etanol apresentava um custo superior em relação à gasolina por esse motivo foi subsidiado pelo governo, dando um impulso na produção do etanol que saltou de 0,9 para 3,0 bilhões de galões em 1999 e 4,2 bilhões em 2006 (Goldemberg, 2007). Embora desde os anos 90 os subsídios ao etanol tenham sido removidos e este tenha se tornado financeiramente competitivo em relação à gasolina, o Programa Pró-Álcool foi enfraquecido neste mesmo período pelo crescente consumo de cana-de-açúcar na indústria alimentícia.

Com essa nova demanda, o etanol brasileiro representa a melhor e mais avançada opção para a produção sustentável de biocombustíveis em larga escala no mundo. O País é o candidato natural a liderar a produção economicamente competitiva e a exportação mundial porque tem o menor custo de produção e o maior rendimento em litros por hectare. O país produz cerca de 22 bilhões de litros de etanol por ano a partir de oito milhões de hectares de cana-de-açúcar. A produção nacional de cana-de-açúcar moída pela indústria sucroalcooleira em 2010 chegou a 556,95 milhões de toneladas, representando um número recorde de 25,38 bilhões de litros de etanol produzidos a partir de 336,2 milhões de toneladas 53,8% do total de cana colhida na safra 2010/2011 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Até janeiro de 2012, de acordo com a União da Indústria da Cana-de-Açúcar (UNICA), 51,81% da safra 2011/2012 foi

utilizada para produção de etanol, totalizando 20,59 bilhões de litros; e 48,19% como destino a produção de açúcar.

Mais de 80% dos carros novos vendidos no Brasil são bicombustíveis (que permite o uso de álcool e gasolina). Além disso, o etanol brasileiro é mais barato (cerca de 50%) que o americano, feito a partir de milho. Nos Estados Unidos esse combustível já é largamente comercializado nos postos de abastecimento como etanol 85% e os fabricantes de automóveis investem em veículos que usam biocombustível. O governo deste país pretende implementar até 2030 políticas que possibilitem a substituição de 30% dos combustíveis usados hoje por etanol (Schubert, 2006) e até 2022 pretendem atingir o patamar de produção de 54 bilhões de litros de bioetanol a partir de milho (Howarth e Bringezu 2008).

Pela primeira vez em mais de três décadas de forte apoio governamental à produção doméstica e elevadas tarifas contra importações, o mercado dos Estados Unidos finalmente vai se abrir para o etanol brasileiro de cana-de-açúcar. O fim da tarifa e dos subsídios dos EUA ao etanol (US\$ 0,54 por galão importado) ocorre pouco depois do final da 17ª Reunião da ONU sobre o clima, a COP-17, realizada em Durban, na África do Sul. Naquela oportunidade, os países participantes se comprometeram a reduzir suas emissões e prorrogar o Protocolo de Kyoto até pelo menos 2017, representando uma grande oportunidade global para o etanol, particularmente o de cana-de-açúcar (<http://www.cop17-cmp7durban.com/>).

O etanol de cana produzido no Brasil já é reconhecido como o melhor biocombustível do mundo em termos de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa. Esse reconhecimento veio, inclusive, do governo americano, através da Agência de Proteção Ambiental do país (Environmental Protection Agency, ou EPA),

que designou o etanol de cana como “biocombustível avançado”, com até 90% de redução de emissões de CO₂ comparado com a gasolina (<http://www.unica.com.br/noticia/23543291920327850689/etanol-brasileiro-tera-livre-acesso-aos-eua-em-2012-depois-de-mais-de-30-anos-de-proteccionismo/>).

Para ambos os governos, a expansão da produção de biocombustíveis é necessária para se reduzir a dependência internacional em relação ao petróleo e promover a redução da emissão de gases de efeito estufa. Porém a representatividade dos biocombustíveis de modo geral no contexto de suprimento de energia ainda permanece aquém do desejado. Para atingir as metas propostas pelos países produtores de bioetanol, encontram-se disponíveis diversos tipos de biomassa vegetal, extremamente heterogêneas quanto à sua composição e quanto a questões relativas à sua degradação.

1.2. Fontes alternativas

Fontes de energia alternativas baseadas em sustentabilidade e processos ecologicamente corretos são importantes recursos para enfrentar o desafio da substituição gradual da energia fóssil disponível na Terra. A energia produzida pela bioconversão da biomassa como, por exemplo, o etanol, metano, hidrogênio, etc. vem sendo considerada integrante integral da realidade de vários países. O etanol tem atualmente o maior mercado devido à sua utilização como matéria-prima para química fina, aditivo para combustíveis ou combustível primário (Kerr e Service, 2005).

A produção de etanol a partir de açúcares ou amido, apesar de competitiva economicamente aos combustíveis fósseis, possui um impacto negativo tendo em vista a

sua produção a partir de cultivares utilizados na alimentação. O aumento da produção de etanol para suprir a crescente carência mundial começa a preocupar a medida que áreas voltadas à produção de alimentos sejam utilizadas para a produção de etanol. Por esse motivo, várias tentativas vêm sendo feitas no sentido de se produzir etanol utilizando cultivares não relacionados à alimentação, além de materiais lignocelulósicos descartados pela agroindústria (Farrell *et al.*, 2006).

Vários resíduos agrícolas ricos em lignocelulose, como palha de trigo, palha de arroz, sabugo de milho, caule e casca de girassol, bagaço de cana-de-açúcar, estão sendo explorados na produção de etanol. No entanto, a fermentação eficiente dos hidrolisados é limitada por uma série de compostos inibitórios gerados durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos como furfural e hidroximetilfurfural. Além de interferirem no processo de fermentação, a formação desses compostos ainda diminui a concentração de açúcar resultante da hidrólise da biomassa por serem formados pelo aquecimento desses açúcares em condições de pH ácido (Larsson *et al.*, 1999).

Assumindo que o etanol seja uma alternativa viável de curto prazo à substituição dos combustíveis fósseis, muitos países se comprometeram no desenvolvimento de processos para a produção desse composto a partir de biomassa de baixo custo, principalmente rejeitos da agro-indústria. Mas converter lignocelulose a combustível é mais difícil do que a partir de açúcares simples como no caso do Brasil que utiliza sacarose de cana de açúcar, ou de amido de milho pelos EUA. O amido é um polímero de glicose que é facilmente quebrado pela ação enzimática, em contraste à lignocelulose que necessita de um processo mais complexo (Service, 2007).

1.3. Etanol a partir da biomassa lignocelulósica

A tecnologia de produção de etanol a partir de biomassa vegetal está sendo desenvolvida rapidamente, já sendo uma realidade para algumas empresas privadas (Iogen, Mascama, Coskata, Range Fuels, ZeaChem e Qteros) com capacidade de produção em larga escala. No Brasil é previsto a inauguração de uma usina (Raizen's Costa Pinto – Piracicaba, SP) em 2014 que utilizará a tecnologia de produção de biocombustível celulósico da empresa Iogen (<http://www.iogen.ca/raizen-project/>). A produção de etanol a partir de lignocelulose requer diferentes processos, tais como pré-tratamento, hidrólise (sacarificação), fermentação e recuperação do etanol. Dentre esses processos, a hidrólise eficiente da lignocelulose é um dos passos fundamentais a ser desenvolvido.

A hidrólise da biomassa é essencial para a produção de açúcares fermentescíveis que posteriormente serão convertidos a etanol. Dois métodos são normalmente empregados dependendo das condições de tratamento, do tipo de biomassa e das propriedades dos agentes hidrolíticos. A hidrólise ácida possui dificuldades técnicas principalmente na recuperação dos açúcares, visto que gera resíduos tóxicos. A hidrólise enzimática é mais eficiente e não gera resíduos tóxicos, no entanto o custo para esse método ainda inviabiliza a comercialização do etanol a partir da lignocelulose (Mishima *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática da lignocelulose normalmente é realizada por um conjunto de celulasas, hemicelulasas e glicosidasas capazes de converter celulose e hemicelulose em monômeros de açúcar. A hidrólise pode ser realizada basicamente de três modos (Taherzadeh e Karimi, 2007; Weber *et al.*, 2010). Nos dois primeiros as

enzimas hidrolíticas são produzidas separadamente por um microrganismo específico, normalmente são utilizadas enzimas de fungos do gênero *Trichoderma*. A mistura de enzimas obtida é então utilizada em uma etapa de hidrólise do material lignocelulósico e posteriormente o microrganismo fermentador é inserido (hidrólise e fermentação separadas (SHF)); ou a hidrólise é realizada junto à fermentação (hidrólise e fermentação simultâneas (SSF)). A SHF permite que a hidrólise e a fermentação sejam realizadas em condições individuais adequadas, enquanto que a SSF uma condição de equilíbrio entre as duas reações tem que ser considerada. A vantagem da SSF é que o processo evita a inibição da reação de hidrólise pelo produto final à medida que esses produtos são consumidos pelo microrganismo fermentador. No terceiro modo de hidrólise as enzimas são co-produzidas junto ao etanol por um microrganismo único ou por uma co-cultura de microrganismos (bioprocesso consolidado (CBP)).

Os maiores desafios para a produção do etanol a partir da biomassa são: o desenvolvimento de novas tecnologias para aumentar a eficiência do processo de sacarificação da lignocelulose com a utilização de enzimas mais eficientes visando à redução dos custos dos preparados enzimáticos; o desenvolvimento de organismos fermentadores que sejam mais tolerantes a inibidores e que fermentem todos os açúcares presentes nos hidrolisados de biomassa além de produzirem altas concentrações de etanol; o desenvolvimento de processos integrados reduzindo o número de passos e a demanda de energia, eliminando o uso de água fresca e reduzindo a quantidade de resíduos gerados (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

1.4. Materiais lignocelulósicos

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas principalmente pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas (Szenygel, 2000). Essas biomassas são constituídas por três principais frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (Jeffries, 1990). Destas frações a celulose é o polímero natural mais abundante na biosfera e o principal constituinte destas biomassas. Corresponde de um terço a metade do tecido vegetal e é constantemente re-sintetizado pela fotossíntese, com uma biossíntese anual estimada em 10^{11} toneladas (Sun *et al.*, 2004).

A celulose é um homopolissacarídeo não ramificado composto de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, no entanto a unidade de repetição é a celobiose. Isto se deve às ligações do tipo β , pelas quais os monômeros de glicose são unidos, fazendo com que moléculas adjacentes encontrem-se arranjadas com uma rotação de 180° entre si (Stryer, 1996). Essa rotação uniforme resulta em uma grande quantidade de pontes de hidrogênio entre a mesma cadeia e com outras cadeias de celulose devido ao grande número de grupos hidroxila expostos. Essa ligação resulta em uma estrutura muito estável cristalina, reduzindo drasticamente a solubilidade em água e dificultando o acesso de enzimas celulolíticas (Gowen e Fong, 2010).

A bioconversão de celulose a açúcares fermentescíveis é uma área aonde vem sendo investidos enormes esforços como pré-requisito para uma subsequente produção de bioenergia (Kumar *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato da celulose ser o composto mais

abundante presente na lignocelulose e possuir apenas resíduos de glicose na sua composição, monossacarídeo que é completamente fermentado pelos microrganismos utilizados atualmente na produção do etanol.

1.5. Microrganismos envolvidos na sacarificação

Os fungos desempenham um papel vital como decompositores, simbiontes de plantas e animais e parasitas de plantas em diferentes ecossistemas, interagindo com seus hospedeiros e com fatores abióticos variáveis no meio ambiente. Alguns fungos são capazes de sobreviver apenas enquanto nutrientes estão disponíveis, não sendo capazes de degradar celulose ou lignina. Outros além de serem capazes de utilizar a lignocelulose como fonte de carbono para seu metabolismo, tem a capacidade de suportar diferentes condições de estresse como variação de temperatura, pH, umidade e osmolaridade (Manoharachary *et al.*, 2005). Essas características individuais fazem com que o estudo de diferentes microrganismos seja de fundamental importância para o desenvolvimento de diferentes bioprocessos.

A busca por potenciais fontes de enzimas celulolíticas é de grande interesse para a eficiente bioconversão de biomassa lignocelulósica. Embora vários microrganismos de origem bacteriana assim como fúngica vêm sendo analisados quanto às suas habilidades de degradarem substratos celulósicos a monômeros de glicose, relativamente poucos foram selecionados pelo seu potencial de produção de celulases (Das *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Pela significância das celulases fúngicas na decomposição de materiais lignocelulósicos, essas enzimas têm sido um importante objeto de estudo há vários anos, visto que muitas dessas enzimas são produzidas de forma extracelular em quantidades significativas (Sukumaran *et al.*, 2009).

Cada microrganismo celulolítico produz um combinado de enzimas celulolíticas capazes de realizar a sacarificação do substrato em que ele se encontra, levando em consideração as condições ambientais naquele determinado momento. A maioria dos organismos celulolíticos produzem múltiplas versões das mesmas enzimas em cada classe, sendo capaz de atacar a estrutura cristalina da celulose por múltiplos mecanismos. Vários estudos têm demonstrado que combinações dessas classes de enzimas resultam em um significativo sinergismo, aumentando a eficiência e velocidade da hidrólise da celulose (Zhang e Lynd, 2004). Utilizando-se dessas características, o estudo do potencial celulolítico de diferentes espécies de fungos em diferentes condições de cultivo vem sendo desenvolvido de forma a buscar coquetéis enzimáticos apropriados para cada processo de sacarificação.

1.6. Mecanismos de ação das celulases

As enzimas que hidrolisam a celulose (celulases) estão divididas em três principais grupos: endoglicanases (EG β -1,4-D-glicanohidrolases, EC 3.2.1.4), exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH, β -1,4-glicanocelobiohidrolase, EC 3.2.1.91) e β -glicosidases ou celobiasas (β -D-glicosideo glicohidrolases, EC 3.2.1.2.21). As endoglicanases catalisam clivagens aleatórias em ligações β -1,4 ao longo da cadeia de celulose, preferencialmente nas regiões menos cristalinas das microfibrilas, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e conseqüentemente novas extremidades. As exoglicanases removem resíduos de celobiose das extremidades reductoras ou não-reductoras geradas pela ação das endoglicanases e possuem uma alta especificidade para a celulose insolúvel, como a celulose microcristalina. As β -glicosidases clivam resíduos de celodextrinas ou celobiose gerados pela ação das endoglicanases e exoglicanases,

liberando monômeros de glicose (figura 1). As celulasas distinguem-se de outras hidrolases glicosídicas por sua habilidade de hidrolisar ligações β -1,4 entre resíduos glicosídicos (revisto por Lynd *et al.*, 2002).

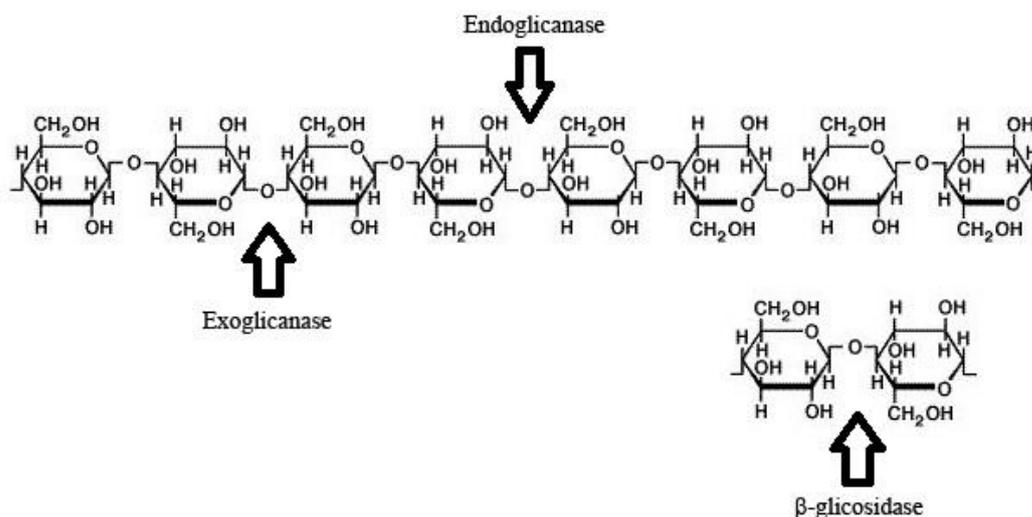


Figura 1. Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase.

Essas três classes de enzimas celulolíticas formam um complexo sistema celulolítico agindo de forma sinérgica, as endoglicanases gerando extremidades para a ação das celobiohidrolases que por sua vez geram resíduos de celobiose, substrato para as β -glicosidases (Zhou *et al.*, 2000). Além do sinergismo, ocorre ainda uma retroinibição como forma de regulação tanto da produção quanto da atividade dessas enzimas, onde o acúmulo do produto da ação das celulasas sobre a celulose gera a inibição dessas enzimas.

As endoglicanases e celobiohidrolases são inibidas por celobiose, tornando o papel das β -glicosidases muito importante no processo. As β -glicosidases ao hidrolisarem a celobiose reduzem seu efeito inibidor sobre as celulasas (Leite *et al.*,

2008). Um exemplo desse fato pode ser observado nos organismos empregados comercialmente para a produção de celulases, onde baixas quantidades de β -glicosidases, comparadas com as outras celulases, normalmente geram inibição da sacarificação pelo acúmulo de celobiose (Sukumaran *et al.*, 2009).

A maioria das β -glicosidases conhecidas sofre forte inibição por glicose (Woodward e Wiseman, 1982; Bothast e Saha, 1997; Guerguen *et al.*, 1995), com algumas exceções tais como uma β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* altamente tolerante a glicose (Riou *et al.*, 1998), e uma β -glicosidase de *Hemicola grisea* var. *thermoidea* que também demonstrou ser tolerante a altas concentrações de glicose (Benoliel *et al.*, 2010). Além da inibição da atividade enzimática das celulases, uma repressão catabólica está relacionada à glicose, onde esse açúcar inibe a expressão de vários genes relacionados ao complexo celulolítico (Ilmén *et al.*, 1997; Poças-Fonseca *et al.*, 2000).

1.7. Novas linhagens de fungos celulolíticos

Na busca por novos coquetéis enzimáticos capazes de hidrolisar de forma eficiente os resíduos celulósicos, algumas estratégias estão sendo utilizadas na tentativa de resolver os problemas encontrados: manipulação genética de linhagens conhecidas com a inserção de genes que codificam enzimas para complementar o complexo enzimático do fungo; manipulação das enzimas de um determinado fungo buscando aumentar atividade ou ajustar as condições de ação dessa enzima ao processo; superexpressão heteróloga de determinados genes em microrganismos secretores; co-

cultura de diferentes linhagens de fungos, cujos complexos celulolíticos sejam complementares; entre outras.

Os fungos filamentosos celulolíticos mais bem estudados e reconhecidos como a maior fonte comercial de celulases são do gênero *Trichoderma* (*T. viridae*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei*), considerados os mais produtivos e poderosos destruidores de celulose cristalina. A maioria das preparações comerciais de celulases produzidas por várias empresas são provenientes de mutantes derivados de linhagens selvagens de *T. reesei*, como a linhagem Rut C30 conhecida como uma das melhores e mais bem caracterizadas dentre as linhagens de *T. reesei* (Le Crom *et al.*, 2009; Peterson e Nevalainen, 2012).

Recentemente, outras linhagens de fungos têm sido descritas como alternativas para as enzimas do *T. reesei* na produção de biocombustíveis de segunda geração (Gusakov, 2011). Dentre essas linhagens alternativas podemos destacar o *Penicillium funiculosum* que comparado ao *T. reesei* Rut C30 liberou maiores concentrações de glicose após incubação com vários substratos celulósicos mostrando possuir um sistema celulolítico mais equilibrado do que o do *T. reesei* que apresenta uma deficiência de β -glicosidases (de Castro *et al.*, 2010a); e o *T. harzianum* IOC-3844 que quando cultivado em bagaço de cana pré-tratado produziu atividades endoglicanásicas e de celulase total superiores ao *T. reesei* e *P. funiculosum*, e consideráveis níveis de β -glicosidases um pouco inferiores aos produzidos pelo *P. funiculosum* (de Castro *et al.*, 2010b).

Mesmo com uma variedade de estratégias de manipulação de linhagens conhecidas, ainda é de fundamental importância a busca por novas linhagens na natureza. Vários trabalhos estão sendo publicados explorando o grande potencial encontrado em biomas pouco estudados (Guimarães *et al.*, 2006). Tendo em vista a

utilização dessa significativa biodiversidade de microrganismos no bioprocessamento de lignocelulose, tanto na hidrólise da biomassa quanto no metabolismo dos açúcares resultantes, uma série de trabalhos vem caracterizando melhor os microrganismos.

Projetos de sequenciamento do genoma e estudos de reconstrução metabólica estão tentando desvendar as capacidades metabólicas dos organismos para direcionar estudos de engenharia metabólica de determinadas linhagens (Gowen e Fong, 2010). No Brasil, os estudos relacionados à biodiversidade de microrganismos e seu potencial na produção de enzimas de interesse biotecnológico estão começando a ganhar espaço, com o isolamento a partir da natureza de novos microrganismos, caracterização do potencial biotecnológico e a sua classificação, além da busca por desvendar a biodiversidade de biomas como o Cerrado e identificar novos genes em projetos de metagenoma (de Castro *et al.*, 2011).

1.8. Bioma Cerrado

A Universidade de Brasília, localizada no centro do país, está inserida no bioma conhecido como Cerrado. Originalmente estendia-se por uma área de dois milhões de km², abrangendo dez estados do Brasil Central. Esse bioma é a segunda maior formação vegetal brasileira. Hoje, restam apenas 20% desse total. Típico de regiões tropicais, o cerrado apresenta duas estações bem marcadas: inverno seco e verão chuvoso (Ratter *et al.* 1997). Com solo de savana tropical, deficiente em nutrientes e rico em ferro e alumínio, abriga plantas de aparência seca, entre arbustos esparsos e gramíneas, com algumas regiões prevalecendo um tipo mais denso de vegetação de formação florestal.

A presença de três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Tocantins-Araguaia, São Francisco e Prata) na região favorece sua biodiversidade.

O Bioma Cerrado pode ser considerado uma savana muito rica em biodiversidade, sendo representado por variadas fitofisionomias. De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), os tipos de vegetação apresentam um gradiente de biomassa, o qual está intimamente relacionado com as características dos solos. A forma de menor biomassa é chamada campo limpo (fisionomia herbácea, com poucos arbustos e nenhuma árvore), e na sequência crescente, campo sujo (fisionomia herbáceo-arbustiva com arbustos e subarbustos espaçados entre si), campo cerrado (vegetação arbustivo-arbóreo e árvores esparsadas), cerrado *stricto sensu* (fisionomia característica do bioma savânico, com árvores baixas e retorcidas, arbustos, subarbustos e ervas) e cerradão (formação florestal com elementos xeromórficos e composição mista de espécies comuns ao cerrado *stricto sensu*, matas de galeria e florestas decíduais) (Spindola *et al.*, 2007).

A importância biológica do bioma cerrado tem sido foco de poucos estudos no que se refere a sua diversidade microbiológica. Nos últimos 20 anos, a pecuária extensiva, as monoculturas e a abertura de estradas destruíram boa parte do cerrado (Marris 2005). A produtividade dos sistemas agrícolas é, em parte, dependente de processos funcionais das comunidades microbianas do solo. (O'Donnell *et al.* 1994; Doran and Zeiss 2000). No entanto, existe pouca informação disponível sobre a contribuição da diversidade de fungos no funcionamento desse ecossistema.

Poucos estudos foram feitos em relação ao impacto da atividade antrópica nas comunidades de fungos, porém desses estudos foi possível destacar a diminuição dos níveis de biomassa e diversidade microbiana, além da alteração na estrutura da

comunidade devido a distúrbios causados por pesticidas e lodo de esgoto em culturas agrícolas (Engelen *et al.* 1998; Smit *et al.* 1999; Josen *et al.* 2001). Por outro lado, apesar das atividades antrópicas, os processos microbianos e o seu potencial papel na manutenção da qualidade do solo podem ser mantidos, provavelmente devido à redundância funcional dos microrganismos do solo (Ohtonen *et al.* 1997; Wertz *et al.* 2006, 2007).

Alguns estudos mostram que as consequências da expansão da atividade humana são de extrema importância para a manutenção da diversidade fúngica do Cerrado, chegando a uma diminuição significativa, em torno de cinquenta por cento, da diversidade desses microrganismos em áreas onde foram instaladas monoculturas de soja (Castro *et al.* 2008). Enquanto a flora e a fauna são sempre foco de estudos para a preservação, os microrganismos são negligenciados. Nesses estudos de preservação as comunidades microbianas devem ser levadas em consideração. Tendo em vista que apenas de cinco a dez por cento das espécies de fungos foram formalmente descritas, em um universo estimado de um milhão e meio de espécies presentes em ecossistemas naturais (Hawksworth 1991; Hawksworth and Rossman 1997).

Atualmente, a necessidade do estudo de novas linhagens de fungos presentes na natureza e sua classificação, além do apelo ecológico, traz consigo uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novas estratégias para utilização desses microrganismos em processos biotecnológicos. Neste trabalho o isolamento, identificação e caracterização do potencial celulolítico de fungos isolados de matéria orgânica em decomposição de diversas fitofisionomias do bioma Cerrado foram realizadas. Tendo em vista a utilização de um isolado na produção de enzimas capazes de sacarificar o bagaço de cana de açúcar excedente de processos de geração de energia

para a produção de açúcares fermentescíveis que possam ser utilizados na produção de etanol.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi selecionar e identificar uma linhagem de fungo filamentosos de uma coleção de fungos isolados do cerrado brasileiro. Assim como caracterizar e avaliar a produção enzimática secretada quanto ao potencial celulolítico.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar e identificar novas linhagens de fungos de amostras de solo do Cerrado Brasileiro.
- Seleção das linhagens com maior atividade celulolítica.
- Caracterização do perfil celulolítico secretado.
- Avaliação da produção de celulases utilizando bagaço de cana de açúcar como indutor.
- Avaliação da degradação do bagaço de cana de açúcar pelo complexo enzimático produzido.

3. Metodologia

3.1. Coleta dos fungos

Material vegetal em decomposição de diferentes regiões do Cerrado do DF e entorno foi coletado e inoculado em meio MYG líquido (tabela 1) com cloranfenicol, re-inoculado em meio semi-sólido para fermentação (tabela 2) suplementado com 1% de carboximetilcelulose (CMC) e incubado à temperatura ambiente.

Tabela 1. Composição do meio MYG

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	10,0
Extrato de malte	5,0
Extrato de Levedura	2,5

*Ajuste do pH para 6,8 e esterilizado a 1 atm por 15 minutos em autoclave.

Tabela 2. Composição do meio semi-sólido para fermentação

Componente	Concentração
Matéria-prima celulósica	10,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,6
KH ₂ PO ₄	4,0
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,8
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,6
Peptona	1,8
Extrato de Levedura	0,5
Ágar	20,0
FeSO ₄ . 7H ₂ O	10,0
MnSO ₄ . 4H ₂ O	3,2
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,8
CoCl ₂ . 6H ₂ O	40,0

(g.L⁻¹)

(mg.L⁻¹)

Os fungos que apresentaram crescimento foram transferidos para outra placa, contendo meio BDA (tabela 3), e incubados à temperatura ambiente e à 30°C até o surgimento de esporos. Os esporos foram então coletados e ressuspensos em água destilada estéril. A suspensão de esporos foi diluída de forma seriada e inoculada em novas placas com o mesmo meio de cultura até a obtenção de colônias isoladas.

Tabela 3. Composição do meio BDA

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	20,0
Peptona	5,0
Extrato de Batata	4,0
Ágar	20,0

*Esterilizado a 1 atm por 15 minutos em autoclave.

3.2. Obtenção de esporos

Após o crescimento no meio de manutenção por aproximadamente 10 dias, na temperatura adequada (28°C – 30°C), esporos dos fungos filamentosos foram ressuspensos em solução de Tween 80 (0,01 g.L⁻¹). Uma alíquota foi retirada e utilizada para a contagem dos esporos em câmara de Neubauer.

3.3. Linhagens utilizadas

As linhagens controle utilizadas neste trabalho estão listadas abaixo:

- *Trichoderma reesei* Rut C30: Linhagem manipulada geneticamente, proveniente da linhagem selvagem QM6a (Montenecout e Eveleigh, 1977).

- *Penicillium funiculosum* INCQS 40081 (originalmente depositada na American Type Culture Collection – ATCC – com a numeração 11797): Esta linhagem foi isolada de um tecido tratado com mercúrio, em Maryland, Estados Unidos.
- *Trichoderma harzianum* - IOC 3844 - Provenientes do banco de cultura do Instituto Osvaldo Cruz (IOC): Isolada de um solo (*grassland*).

3.4. Manutenção das linhagens

A manutenção das linhagens dos fungos filamentosos foi realizada por meio de repiques periódicos (em média a cada dois meses) em meio BDA.

As culturas foram inoculadas pontualmente no centro das placas com o auxílio de uma alça de platina. As linhagens foram, então, incubadas em estufa com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro a uma temperatura de 30°C. O tempo de incubação variou para cada linhagem, em média 10 dias, ou até que toda a superfície da placa fosse coberta pelo fungo esporulado.

3.5. Teste de sensibilidade a higromicina

Para a avaliação da sensibilidade ao antibiótico higromicina, foram inoculadas diferentes quantidades de esporos (10^7 , 10^8 , 10^9) no centro de placas de Petri contendo meio BDA suplementado com diferentes concentrações do antibiótico ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As culturas foram incubadas em estufa a uma temperatura de 30°C por aproximadamente 15 dias.

3.6. Seleção em placa de fungos celulolíticos

A seleção inicial das linhagens dos fungos filamentosos foi realizada quanto a capacidade de crescer em meio para fermentação contendo uma fonte de carbono celulósica, cuja composição é mostrada na tabela 2 (Szijártó *et al.*, 2004). Este meio foi esterilizado a 1 atm por 15 minutos em autoclave.

As linhagens foram cultivadas neste meio utilizando CMC ou celulose microcristalina (SIG) como única fonte de carbono. Os inóculos foram feitos no centro de placas de Petri. Estas foram incubadas por 4 dias a 28 °C e em seguida submetidas a choque térmico por 2 h a 50 °C para realçar a hidrólise da celulose e visualização do halo. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) em água. Após 30 minutos a solução foi descartada e as placas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004). Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com paquímetro. Cada experimento foi realizado em duplicata.

O corante vermelho congo tem a propriedade de se ligar a cadeias polissacarídicas. Ao se lavar os meios com as células crescidas, percebe-se um descoramento na região onde a celulose foi hidrolisada, ou seja, onde há a presença de celulasas. Esta é uma medida indireta e qualitativa para a avaliação do potencial celulolítico de microrganismos.

3.7. Classificação das linhagens isoladas

3.8. Extração de DNA total

Os DNA das linhagens de fungo isoladas foram extraídos, de micélios dos fungos cultivados em meio para pré-inóculo (tabela 4), de acordo com o protocolo estabelecido por Roeder e Broda (1987). Os DNA foram então quantificados em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

Tabela 4. Composição do meio para pré-inóculo

Componente	Concentração	
Glicose	10,00	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,80	
KH ₂ PO ₄	2,00	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,40	(g.L ⁻¹)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,30	
Peptona	0,90	
Extrato de Levedura	0,25	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5,00	
MnSO ₄ . 4H ₂ O	1,60	(mg.L ⁻¹)
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,40	
CoCl ₂ . 6H ₂ O	20,00	

3.9. Amplificação do DNA

Para as amplificações pela técnica de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), foram utilizados como molde 10 ng do DNA extraído das linhagens de fungos. Ao DNA molde adicionou-se tampão de reação para *Taq* I DNA polimerase conforme indicações do fabricante (Invitrogen), 0,3 µM dos iniciadores 3' e 5' (tabela 5), 0,4 mM

de cada dNTP e duas unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 30 μ L. As amplificações foram realizadas por 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto e extensão a 72° por um minuto e meio. Seguiu-se então uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As amostras foram então analisadas em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e com o auxílio de marcador de massa molecular para DNA apropriado.

Tabela 5. Características dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados (White *et al.* 1990).

Iniciador	Sequência	T _m
ITS 1	5' GCGGATCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	66,9 °C
ITS 4	5' GCGGATCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	61,3 °C
UNI R	5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'	54,2°C
UNI F	5' GGTCCGTGTTTCAAGACG 3'	53,6°C

3.10. Análise de ácidos nucléicos por eletroforese em gel de agarose

(Sambrook *et al.*, 2001)

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação da qualidade do DNA. A agarose foi preparada em concentrações adequadas (0,8% (p/v)) em tampão de corrida TEB 1X ou TAE 1X. Às amostras, foram adicionadas tampão de carregamento para concentração final de 1X antes da aplicação no gel. Como marcador molecular para DNA foi utilizado o 100 pb (Amersham pharmacia). A voltagem máxima utilizada durante a eletroforese foi de 5 V.cm⁻¹.

3.10.1. Soluções para eletroforese em Gel de Agarose

Tampão Tris-Borato EDTA (TEB) 10X

Tris base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA (0,5M; pH 8,0)	20 mL
H ₂ O q.s.p	1000 mL

pH ajustado para 8,4

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X

Tris-base	242,0 g
EDTA (0,5 M)	100,0 mL
Ácido acético	57,1 mL
H ₂ O q.s.p	1000,0 mL

pH ajustado para 8,5

Tampão de Amostra (5X)

TEB 10X (v/v)	25,00 %
Glicerol (v/v)	50,00 %
Azul de Bromofenol (p/v)	0,25 %
Xilenocianol (p/v)	0,25 %

3.11. Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos obtidos nas reações de PCR foram purificados empregando-se o *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN), seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.12. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics). Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA plasmidial, 5 pmoles dos iniciadores apropriados e o kit “DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing”(MJ Research, INC). Os DNAs utilizados no sequenciamento foram quantificados por espectrofotometria utilizando o GeneQuant (Biochrom) e analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (EtBr) 0,5 µg /mL. A qualidade das seqüências obtidas na reação de sequenciamento automático foi analisada utilizando-se as ferramentas de bioinformática: PHRED; Cross-match e CAP3, disponíveis na página: www.unb.br/ib/cel/biomol. Após a análise de qualidade, as seqüências que apresentaram qualidade igual ou superior a PHRED ≥ 20 e tamanho ≥ 100 nucleotídeos, foram analisadas pelo programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), contra a base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.13. Análise das sequências

Os contigs do rDNA dos fungos foram submetidas a uma busca no banco de dados, GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o programa BLASTn (Altschul *et al.* 1990). As sequências encontradas como similares foram então utilizadas nas análises filogenéticas como espécies relacionadas. O alinhamento das sequências obtidas no banco de dados com a sequência em questão foi realizado pelo algoritmo CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), e editado no programa BioEdit (Hall, 1999). Com o alinhamento das sequências foi possível realizar o estudo filogenético das linhagens usando o modelo Kimura 2-parâmetros pelo método de Máxima Parsimônia no programa MEGA v. 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). A análise de reamostragem por *Bootstrap* com 1000 repetições foi realizada para estimar a confiança da topologia das árvores. Como forma de comparação as mesmas análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa galaxie (Nilsson *et al.*, 2004) diretamente pelo site Unite (<http://unite.ut.ee/analysis.php>).

Com a classificação a partir da análise filogenética de alguns isolados serem do gênero *Trichoderma* foi possível utilizar o banco de dados da *International Subcommittee on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy* (www.isth.info), que possibilita a identificação das espécies de *Trichoderma* pelo método do código de barras (Druzhinina *et al.*, 2005).

3.14. Avaliação da produção de celulasas pelas linhagens de fungos

3.14.1. Fermentação submersa (adaptado de Szijártó *et al.*, 2004)

Na condução dos experimentos a produção de celulasas foi avaliada na presença de diferentes fontes de carbono, CMC, SIG, xilana (XIL), bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e celulignina semi-deslignificada (CSD), e dois diferentes métodos de inóculo (com ou sem etapa de pré-inóculo).

3.14.1.1. Sem etapa de pré-inóculo

Após a obtenção e contagem dos esporos, adicionou-se o volume da suspensão necessário a se inocular. Esporos na concentração de 1×10^6 foram inoculados em 50 mL de meio suplementado com a devida fonte de carbono (tabela 6). A fermentação foi conduzida em frascos cônicos de 300 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação orbital de 200 rpm. Diariamente, alíquotas de 3 mL foram retiradas, centrifugadas a 20.000 g por 5 minutos a 4°C. Ao sobrenadante das alíquotas foi adicionado PMSF, EDTA e azida sódica nas concentrações finais de 2 mM, 1 mM e 2 mg.L⁻¹, respectivamente com a finalidade de evitar degradação das proteínas e crescimento de microrganismos. As amostras foram estocadas a 4°C até a realização dos ensaios enzimáticos.

Tabela 6. Composição do meio para fermentação submersa

Componente	Concentração	
Matéria-prima celulósica	10,0	
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,6	
KH ₂ PO ₄	4,0	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,8	(g.L ⁻¹)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,6	
Peptona	1,8	
Extrato de Levedura	0,5	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	10,0	
MnSO ₄ . 4H ₂ O	3,2	(mg.L ⁻¹)
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,8	
CoCl ₂ . 6H ₂ O	40,0	

3.14.1.2. Com etapa de pré-inóculo

Após a obtenção e contagem dos esporos, adicionou-se o volume da suspensão necessário a se inocular 1×10^6 esporos para 50 mL de meio de pré-inóculo (tabela 4). A fermentação foi conduzida em frascos cônicos de 300 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação orbital de 200 rpm por 3 dias. Após esse tempo, o micélio foi filtrado a vácuo e 1 g (peso úmido) de cada linhagem foi transferido para um novo frasco cônico de 300 mL contendo 50 mL de meio de fermentação submersa (tabela 6) suplementado com os diferentes substratos celulósicos.

Diariamente, alíquotas de 3 mL foram retiradas, centrifugadas a 20.000 g por 5 minutos a 4°C. Ao sobrenadante das alíquotas foi adicionado PMSF, EDTA e azida sódica nas concentrações finais de 2 mM, 1 mM e 2 mg.L⁻¹, respectivamente. As amostras foram estocadas a 4°C até a realização de suas análises.

3.14.2. Preparo da celulignina semi-deslignificada (de Castro *et al.*, 2010a)

A celulignina utilizada neste trabalho foi obtida a partir de bagaço de cana-de-açúcar proveniente da usina Costa Pinto, em Piracicaba (SP), cedido gentilmente pela empresa Fermentec. Este bagaço foi submetido a dois tipos de pré-tratamento:

3.14.2.1. Pré-tratamento ácido

O objetivo desse pré-tratamento é a remoção da fração hemicelulósica e conseqüentemente, um aumento na acessibilidade da celulose a agentes microbianos, utilizados em futuras fermentações.

O bagaço de cana-de-açúcar, previamente lavado, seco e peneirado manualmente (apenas para excluir as fibras mais grosseiras) foi embebido em uma solução aquosa de ácido sulfúrico 3% (v/v) e mantido em repouso por 24h a temperatura ambiente. Após esse período o material embebido foi exposto a um tratamento térmico por 40 minutos, a 121°C (1 atm, pressão manométrica), sendo rapidamente resfriado após a redução da pressão no equipamento. O licor contendo os glicídeos provenientes da hidrólise foi removido por prensagem manual, obtendo-se assim o material parcialmente hidrolisado ainda úmido.

Para a remoção da xilose residual e de outros compostos ainda absorvidos no bagaço hidrolisado, este material foi lavado cinco vezes com água destilada, na proporção sólido:líquido de 1:4 (g/mL), sendo o licor de cada lavagem extraído por filtração com papel Whatman nº 5 em funil de Büchner. Após o esgotamento do teor

de xilose e neutralização do material, este foi seco em estufa a 90°C por cerca de 2 horas, sendo então nomeado celulignina. Este termo foi adotado, visto que o material não mais continha a fração hemicelulósica (de Castro *et al.*, 2005).

3.14.2.2. Pré-tratamento alcalino

O objetivo deste pré-tratamento é a parcial remoção da lignina, que acarreta em um aumento na exposição da fração celulósica contida na celulignina. Esta metodologia foi desenvolvida por Vásquez *et al.* (2005).

A celulignina obtida após o tratamento ácido foi adicionada a uma solução de NaOH 20% (p/v), com uma relação sólido:líquido de 1:20 (g/mL). Esta suspensão foi submetida a tratamento térmico a 121°C por 20 minutos a 1 atm (pressão manométrica).

Após esse tratamento, o material foi lavado abundantemente com água destilada, até a redução do pH para 7,0, filtrado em papel Whatman nº1, seco a 60°C e finalmente nomeado celulignina semi-deslignificada (CSD).

3.15. Ensaio enzimáticos

3.15.1. Atividade de endoglicanases (CMCase) (adaptado de Ghose, 1987)

A quantificação das atividades de endoglicanase foi realizada incubando-se um volume máximo de 50 µL do sobrenadante das culturas dos fungos, crescidos em meio de fermentação, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo CMC 1% (p/v) para um volume final de 100 µL, em uma temperatura de 50°C por 30 minutos.

Dependendo da análise realizada, o tempo de incubação e a temperatura foram alterados. Em seguida, foram adicionados 300 µL de reagente de DNS (Miller, 1959), de forma a parar a reação enzimática, e as reações foram incubadas por 5 minutos a 100°C. Por fim, as absorvâncias das soluções a 540 nm foram registradas. Cada análise foi realizada em triplicata.

Os valores de absorvância foram convertidos a valores de atividade enzimática pela equação calculada usando glicose como padrão. A curva padrão envolvida nessa metodologia foi construída incubando-se 100 µL de solução de glicose (diferentes concentrações) com 300 µL de reagente DNS e procedendo-se as etapas seguintes da mesma forma que para as amostras. A atividade de endoglicanase foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor . min⁻¹. L⁻¹ a partir de CMC.

A reação envolvida no desenvolvimento da coloração medida em espectrofotômetro acontece devido à capacidade de aldoses e cetoses com hidroxilas heterosídicas livres em reduzir uma solução alcalina de 3,5-dinitrosalicilato a 3-amino-5-nitro-salicilato, que é um composto de coloração alaranjada (Vasconcelos *et al.*, 2002).

Para a preparação do reagente DNS, dissolveu-se com aquecimento 10g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 200 mL de NaOH 2 M. Acrescentou-se 300 g de tartarato de sódio e potássio previamente dissolvidos com aquecimento em 500 mL de água. O volume foi ajustado para 1 litro.

3.15.2. Atividade de exoglicanases (Avicelase) (adaptado de Ghose, 1987)

A quantificação das atividades exoglicanásicas foi realizada incubando-se um volume máximo de 50 µL do sobrenadante das culturas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo celulose microcristalina (SIG) 1% (p/v) (sigmacell cellulose – Sigma-Aldrich) para um volume final de 100 µL, em uma temperatura de 50°C por 30 minutos. Dependendo da análise realizada, o tempo de incubação e a temperatura foram alterados. Em seguida, foram adicionados 300 µL de reagente de DNS, de forma a parar a reação enzimática, e as reações foram incubadas por 5 minutos a 100°C. Por fim, as absorvâncias das soluções a 540 nm foram registradas. Cada análise foi realizada em triplicata. Os valores de absorvância foram convertidos a valores de atividade enzimática pela equação calculada utilizando glicose como padrão. A atividade foi expressa como uma unidade (U) sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor . min⁻¹ a partir de celulose microcristalina (SIG).

3.15.3. Atividade de celulasas totais (FPase) (adaptado de Ghose, 1987)

A quantificação das atividades de celulasas totais foi realizada incubando-se um volume máximo de 50 µL do sobrenadante das culturas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo uma tira de papel de filtro Whatman nº1 de 2 x 6 mm com um volume final de 100 µL, em uma temperatura de 50°C por 30 minutos. Dependendo da análise realizada, o tempo de incubação e a temperatura foram alterados. Em seguida, foram adicionados 300 µL de reagente de DNS, de forma a parar a reação enzimática, e as reações foram incubadas por 5 minutos a 100°C. Por fim, as absorvâncias das soluções a 540 nm foram registradas. Cada análise foi realizada em triplicata. Os

valores de absorvância foram convertidos a valores de atividade enzimática pela equação calculada utilizando glicose como padrão. A atividade foi expressa como uma unidade (U) sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor $\cdot \text{min}^{-1}$ a partir de papel de filtro.

3.15.4. Atividade de xilanases (adaptado de Ghose, 1987)

A quantificação das atividades de xilanase foi realizada incubando-se um volume máximo de 50 μL do sobrenadante das culturas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo xilana *oat spelt* (XIL) 1% (p/v) para um volume final de 100 μL , em uma temperatura de 50°C por 30 minutos. Dependendo da análise realizada, o tempo de incubação e a temperatura foram alterados. Em seguida, foram adicionados 300 μL de reagente de DNS, de forma a parar a reação enzimática, e as reações foram incubadas por 5 minutos a 100°C. Por fim, as absorvâncias das soluções a 540 nm foram registradas. Cada análise foi realizada em triplicata. Os valores de absorvância foram convertidos a valores de atividade enzimática pela equação calculada utilizando xilose como padrão.

A curva padrão envolvida nessa metodologia foi construída incubando-se 100 μL de soluções de xilose, com concentrações variando de 0,125 a 0,75 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$, com 300 μL de reagente DNS e procedendo-se as etapas seguintes da mesma forma que para as amostras. A atividade foi expressa como uma unidade (U) sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor $\cdot \text{min}^{-1}$ a partir de XIL.

3.15.5. Atividade de β -glicosidases (ρ NPGase) (adaptado de Claeysens e Aerts, 1992)

A quantificação das atividades relacionadas às β -glicosidases foi realizada incubando-se um volume máximo de 50 μ L do sobrenadante das culturas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo ρ NPG (4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo) 100 mM com volume final de 100 μ L, em uma temperatura de 50°C por 10 minutos. Dependendo da análise realizada, o tempo de incubação e a temperatura foram alterados. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de carbonato de sódio 1M, de forma a parar a reação enzimática. As absorbâncias das soluções a 405 nm foram registradas. Cada análise foi realizada em triplicata.

Os valores de absorbância foram convertidos a valores de atividade enzimática pela equação calculada usando ρ -nitrofenol (ρ NP). A curva padrão envolvida nessa metodologia foi construída incubando-se 100 μ L de soluções de ρ NP, com concentrações variando de 1 a 90 μ mol/100 μ L, com 200 μ L de carbonato de sódio 1M e procedendo-se as etapas seguintes da mesma forma que para as amostras. Cada atividade foi expressa como uma unidade (U) sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ρ NP . min⁻¹ a partir de ρ NPG.

Esta quantificação baseia-se na formação de ρ NP, um composto de coloração amarelada liberado após a hidrólise de ρ NPG pela ação catalítica das β -glicosidases presentes nas amostras. Esta reação libera concomitantemente ρ NP e glicose em proporções equimolares.

3.15.6. Hidrólise do bagaço de cana de açúcar

Bagaço de cana de açúcar *in natura* (BCA) foi utilizado como substrato nos ensaios de hidrólise, assim como a celulignina semi-deslignificada (CSD). As reações de hidrólise enzimática foram realizadas com o sobrenadante das culturas cultivadas em BCA por 72 horas. A proporção enzima/biomassa neste ensaio foi equivalente a 5,0 FPU por grama de substrato. Ao sobrenadante foram adicionados 10% de BCA ou CSD, 50 mM de tampão citrato de sódio pH 5,0, sendo incubadas por 18 horas a 50°C, com a retirada regular de amostras. A concentração de glicose foi determinada utilizando o kit baseado no ensaio de glicose oxidase (Katal) e a quantidade de açúcar redutor total de acordo com o método descrito por Miller (1959). O rendimento da hidrólise foi determinado utilizando a equação descrita por Maeda *et al.* (2011) a partir do conteúdo de carboidratos de BCA e CSD previamente determinada por Castro *et al.* (2010a).

3.16. Precipitação de proteínas com TCA e acetona

Um mililitro do sobrenadante das fermentações foi precipitado com 250 µL de TCA 100%. (concentração final 20%). Após ser incubado no *freezer* (-20°C) por 1 hora, a solução foi centrifugada a 8000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado com 1 mL de acetona gelada e novamente centrifugado a 8000 g por 30 minutos. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos e ressuspensão em 20 µL de tampão de amostra 5X. No caso de amostras com o pH ácido (amostra com coloração amarela) acrescentou-se 2 µL

de tampão de corrida (eletroforese) pH 8,8. As amostras foram estocadas a -20 °C até a análise em gel SDS-PAGE.

Tampão de amostra 5X

Tris-Cl pH 6,8	60,0 mM
Glicerol (p/v)	20,0 %
SDS (p/v)	4,0 %
β-mercaptoetanol	14,4 mM
Azul de bromofenol (p/v)	0,1 %

3.17. Ultrafiltração com Amicon 8400

O filtrado da cultura do fungo L04 induzido por BCA foi submetido a ultrafiltração utilizando o Amicon 8400 da Millipore. A membrana utilizada para a concentração foi a Amicon ultra (membrana de polietersulfona) com corte de 10.000 Daltons. Após a redução do volume do sobrenadante este foi diafiltrado com duas vezes o volume inicial de água milliQ para que houvesse a remoção de resíduos de sais e açúcares presentes.

3.18. Quantificação de proteínas pelo método Bradford (Bradford, 1976)

A dosagem das proteínas presentes no sobrenadante das culturas foi realizada pelo método de Bradford. As quantificações foram realizadas utilizando-se 10 µL de cada amostra das culturas adicionadas a 200 µL de reagente de Bradford devidamente

diluído de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Protein Assay, Bio-Rad USA). A mistura foi mantida protegida da luz por cinco minutos e lida em espectrofotômetro a 595 nm. Para conversão dos valores de absorbância para valores de massa foi construída uma curva padrão do reagente Bradford empregando albumina sérica bovina como padrão nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µg em 10 µL.

3.19. Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

3.19.1. Condições de eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida segundo descrito por Silva-Pereira (2003). Amostras do sobrenadante contendo a enzima foram concentradas por ultrafiltração ou precipitação e ressuspensas em tampão de amostra desnaturante de proteína para um volume final de 20 µL. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel concentrador de 4% e separador de 12% contendo 0,15% (p/v) de CMC ou XIL. A eletroforese foi realizada por 8 horas em voltagem de 80 a 250 V. Como marcador de massa molecular para proteínas foi utilizado o “*Broad Range Protein Molecular Weight Markers*” (Promega). Os géis preparados como descrito nesse item foram submetidos a uma avaliação da atividade enzimática (celulases e xilanases) pela técnica de zimograma. Sempre que realizado esse ensaio, simultaneamente outro gel idêntico seguindo os mesmo parâmetros foi feito para que as proteínas fossem visualizadas após sua coloração com *comassie blue* ou prata, visando a sobreposição com os halos de hidrólise presentes no zimograma.

3.19.2. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Tampão de corrida para eletroforese Tris-Glicina 5X pH 8,3

Trizma-base	125,0 mM
Glicina	960,0 mM
SDS (p/v)	0,5 %

Solução de Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)

Acrilamida (p/v)	39%
Bis-acrilamida (p/v)	1%

A solução foi filtrada em papel de filtro e abrigada da luz a 4°C.

Gel concentrador 5% SDS-PAGE

Acrilamida/bis-acrilamida 39:1 (v/v)	5,00 %
Tris-HCl pH 6,8 (p/v)	1,52 %
SDS (p/v)	0,10 %
Persulfato de amônia (p/v)	0,05 %
TEMED (p/v)	0,10 %

Gel separador 10% SDS-PAGE

Acrilamida/bis-acrilamida (v/v)	10,00 %
Tris-HCl pH 8,8 (p/v)	4,54 %
SDS (p/v)	0,10 %
Persulfato de amônia (p/v)	0,05 %
TEMED (v/v)	0,05 %

3.19.3. Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma)

Após o processo de eletroforese o gel de SDS-PAGE 12% contendo 0,15% de CMC (*Low viscosity sodium Salt SIGMA*) ou XIL (*xylan from birch wood SIGMA*), foi tratado para revelar a atividade enzimática, adaptado de Sun *et al.* (2008). O gel foi retirado do sistema de eletroforese e lavado duas vezes em solução de isopropanol 25% em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 durante 20 minutos, para remover o SDS. Para a renaturação da enzima o gel foi lavado com água destilada, e posteriormente incubado em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 + 5 mM de β -mercaptoethanol (pequenas quantidades auxiliam no dobramento de proteínas complexas) a 4°C durante a noite.

Decorrido este tempo foi descartado a solução e o gel lavado em água destilada por duas vezes durante 2 minutos cada. O gel foi transferido para uma nova solução de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e deixado a temperatura ambiente por mais 2 horas e incubado por mais 3 horas a 50°C em banho pré-aquecido. A atividade enzimática foi detectada corando-se o gel com solução de vermelho do congo 0,5% (p/v) durante 30 minutos, seguido de descoramento com cloreto de sódio 1 M. Após a detecção da região de degradação do substrato no gel foram adicionados 200 μ L de HCl 0,2 M à solução de NaCl para fixação da cor, permitindo um maior contraste para a visualização da atividade enzimática em gel.

3.19.4. Coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

Os géis preparados nas condições descritas anteriormente foram submetidos a coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250* para visualização do perfil protéico presente nas amostras. Após corrida eletroforética o gel foi submerso em solução corante por 4 horas, sob agitação. Decorrido este tempo o mesmo foi descorado utilizando a solução descorante pelo tempo necessário para a visualização das bandas de proteína.

3.19.4.1. Soluções para coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

Solução corante para SDS-PAGE

Metanol (v/v)	40,00 %
Ácido acético (v/v)	10,00 %
<i>Azul brilhante de Coomassie R-250</i> (p/v)	0,25 %

Solução descorante para SDS-PAGE

Metanol (v/v)	40%
Ácido acético glacial (v/v)	10%

3.19.5. Coloração com Prata

A avaliação do perfil protéico secretado pelos fungos também foi realizado pela metodologia de coloração com nitrato de prata por sua maior sensibilidade. Este

protocolo, modificado de Blum e colaboradores (1987), consiste na incubação do gel durante a noite, sob lenta agitação, à temperatura ambiente em solução fixadora (fixação I), sendo no dia seguinte transferido para solução fixadora II, permanecendo por 20 minutos. Após duas lavagens com água MilliQ por cinco minutos cada, o gel foi incubado em solução de sensibilização por 20 minutos, e novamente lavado nas mesmas condições citadas acima. Para tratamento com nitrato de prata o gel foi incubado na solução de impregnação por 20 minutos, sendo ao final novamente lavado nas mesmas condições já descritas. Para visualização da coloração, o gel foi tratado com a solução reveladora até que as bandas atingissem a intensidade desejada (5 a 10 minutos). Ao final, o gel foi incubado na solução de fixação I para parada da revelação. Após duas lavagens com água MilliQ por 20 minutos cada, o gel foi escaneado e armazenado em solução de ácido acético 1% (v/v).

3.19.5.1. Soluções para coloração com Prata

Solução fixadora I para SDS-PAGE

Metanol (v/v) 30%

Ácido acético glacial (v/v) 10%

Solução fixadora II para SDS-PAGE

Etanol (v/v) 50%

Solução sensibilizadora para SDS-PAGE

Tiosulfato de sódio (p/v) 0,02%

Solução de impregnação com prata para SDS-PAGE

AgNO₃ (p/v) 0,200%

Formaldeído (v/v) 0,075%

Solução reveladora para SDS-PAGE

Na₂CO₃ (p/v) 6,00%

Formaldeído (v/v) 0,05%

4. Resultados

4.1. Coleta, isolamento e seleção dos fungos

Os fungos estudados nesse trabalho foram coletados em diferentes regiões de cerrado do Distrito Federal e seu entorno, áreas onde a vegetação estava relativamente preservada independente da fitofisionomia encontrada. Áreas de mata mais úmidas apresentaram maior quantidade de material vegetal em decomposição, enquanto que as áreas de cerrado *strictu sensu* apresentavam aspecto mais seco com pouco material vegetal depositado sobre o solo. Amostras dessa serrapilheira foram coletadas nas diferentes áreas no mês de março, período em que o cerrado ainda encontra-se úmido devido à ação de chuvas.

Das amostras coletadas, após a passagem por meio MYG líquido com cloranfenicol e posterior inóculo em meio semi-sólido contendo CMC como única fonte de carbono, foi observado o crescimento de aproximadamente 30 diferentes morfotipos de fungos filamentosos com capacidade de utilizar a celulose como fonte de carbono nomeados pela letra L seguida de um número, L01 a L30.

Após o isolamento por diluição seriada das linhagens pré-selecionadas, visando à avaliação do potencial celulolítico, foi observado o crescimento e o diâmetro de descoramento do corante vermelho congo em placas contendo substratos celulósicos, (CMC ou SIG) como única fonte de carbono. A medida dos halos de descoramento representa uma informação diretamente relacionada à região de atuação das enzimas celulolíticas sobre o substrato, visível no caso do CMC e SIG após coloração com vermelho congo onde o corante permanece ligado apenas às regiões onde há ligações β -

1,4 glicosídicas. Esta medida do potencial celulolítico foi utilizada com caráter eliminatório, tendo em vista a seleção das linhagens que foram capazes de crescer em ambos os substratos e a formação dos maiores halos de hidrólise. Neste ensaio treze fungos apresentaram crescimento em ambos os substratos e seus halos de hidrólise em CMC foram medidos e relacionados ao tamanho das colônias (tabela 7).

Dos treze isolados, os fungos L04, L05 e L10 foram selecionados para seguir com as análises enzimáticas por se destacarem em relação às outras no crescimento mais acelerado das colônias. L08 e L11 apesar de apresentarem crescimento um pouco mais lento também foram selecionados por sua capacidade de hidrólise, marcado por maiores áreas ao redor das colônias em todas as réplicas analisadas dos experimentos em placas contendo CMC (tabela 7) ou SIG (dados não mostrados), relacionadas às atividades de endoglicanases e exoglicanases respectivamente.

Tabela 7. Relação crescimento/ halo de hidrólise dos fungos isolados utilizando *P. funiculosum* e *T. harzianum* IOC3844 como modelos de fungo celulolítico.

Linhagem	Relação colônia/halo
L01	0,93
L02	0,94
L03	0,98
L04	1,00*
L05	1,00*
L06	0,96
L07	0,98
L08	0,72
L10	1,00*
L11	0,63
L12	0,98
L14	0,88
L16	0,87
<i>T. harzianum</i>	1,00*
<i>P. funiculosum</i>	0,73

*Colônias que atingiram rapidamente o tamanho da placa não podendo ser detectado o halo de hidrólise. Marcadas em cinza as linhagens selecionadas.

As linhagens que não constam na tabela 7 apresentaram um crescimento muito lento em relação aos outros, além da não observação da formação de um halo de hidrólise significativo. Os fungos *T. harzianum* IOC3844 e *P. funiculosum* foram utilizados como parâmetro de comparação com os isolados do cerrado. Os fungos L04, L05 e L10 apresentaram um crescimento acelerado nessas condições de cultivo cobrindo toda a placa em dois a três dias após o inóculo. Esse fato dificulta o contato do reagente vermelho congo com o meio de cultura, mas indica a utilização do substrato celulósico como uma boa fonte de carbono para o crescimento desses fungos. As linhagens L08 e L11 apresentaram crescimento mais lento nessas condições de cultivo, no entanto foram observados os maiores halos de hidrólise, inclusive quando comparados aos fungos modelo *T. harzianum* IOC3844 e *P. funiculosum* conhecidos como bons produtores de celulases.

4.2. Manutenção e armazenamento das linhagens

Após a obtenção de colônias homogêneas das linhagens isoladas do cerrado, essas foram mantidas mediante cultivo em placas com batata dextrose ágar (BDA) com repiques periódicos (figura 2). Também foi estabelecida a conservação dos esporos desses fungos a 4°C em sílica estéril e em água destilada estéril. É interessante ressaltar que os esporos continuaram viáveis após o armazenamento em água destilada por pelo menos dois anos e em sílica por pelo menos três anos.

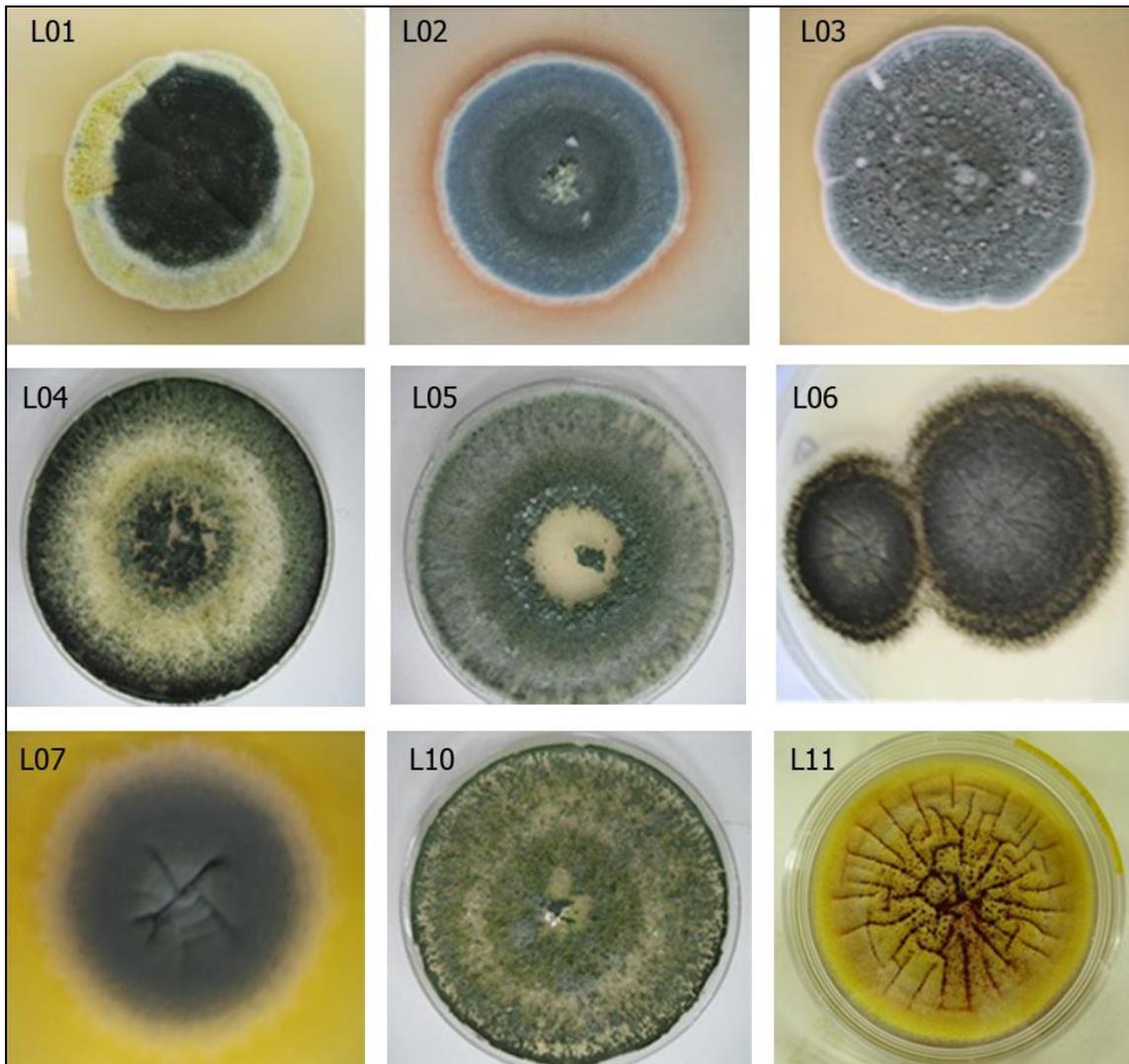


Figura 2. Cultivo de alguns isolados do cerrado em BDA. As respectivas nomenclaturas estão indicadas.

4.3. Identificação das linhagens isoladas

Com o intuito de obter um maior conhecimento sobre as linhagens isoladas de maior interesse, a identificação molecular desses fungos foi realizada. Para tanto, o DNA total das linhagens foi extraído a partir do micélio cultivados em meio MYG e analisado quanto à sua integridade em gel de agarose (figura 3).

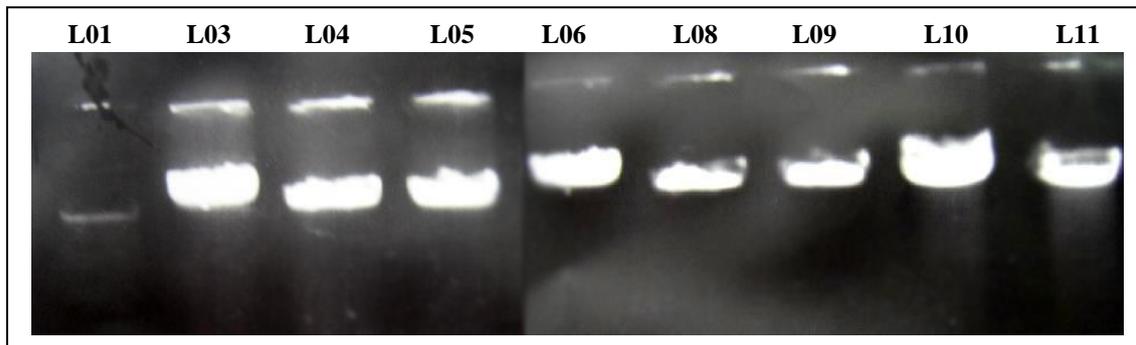


Figura 3. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA total extraído de alguns isolados. As respectivas linhagens estão indicadas acima de cada linha.

Utilizando o DNA total como molde, foi realizada uma reação de PCR para a amplificação das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal das linhagens isoladas utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4. Outra região do rDNA também amplificada compreendia parte do rDNA 28S dos fungos utilizando os iniciadores UNIR e UNIF, visando uma melhor classificação das linhagens numa tentativa de identificação das espécies (figura 4). Com a análise dos produtos de amplificação por meio de sequenciamento do DNA e posterior análise das sequências obtidas foi possível fazer uma classificação das linhagens isoladas.

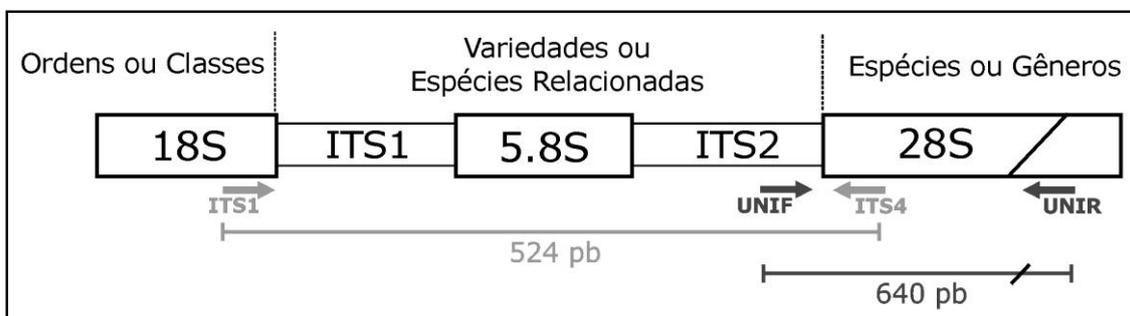


Figura 4. Estrutura do cluster gênico que codifica o RNA ribossomal, evidenciando os genes correspondentes as subunidades 18S, 5,8S e 28S, além das regiões espaçadoras internas ITS1 e ITS2. Acima estão os níveis taxonômicos que cada região define, abaixo a localização da região do rDNA amplificada com os iniciadores ITS1 e ITS4 (ITS) e da região da subunidade maior amplificada com os iniciadores UNIF e UNIR.

Para as reações utilizando a região ITS (espaçadores I, II e o gene do rRNA 5.8S) do DNA ribossomal com os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 produziu fragmentos de aproximadamente 600 pares de base com variações para cada linhagem como mostrado na figura 5, mas estando dentro do tamanho esperado de 525 a 734 nucleotídeos.

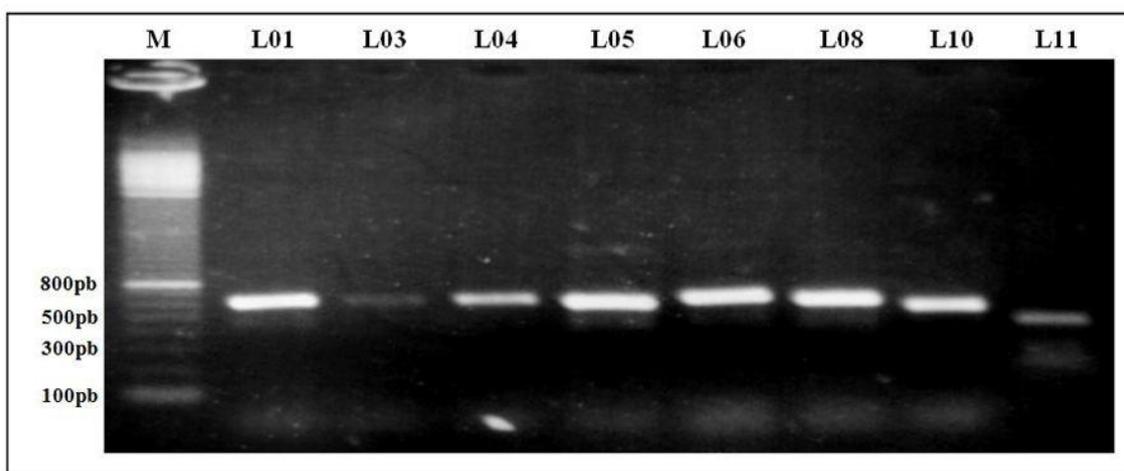


Figura 5. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da amplificação da região ITS1 e 2 de alguns isolados. As linhagens estão indicadas acima de cada linha. (M) Marcador de massa molecular 100 pb (Amersham pharmacia).

Os produtos de amplificação foram purificados e sequenciados utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 nas reações de sequenciamento. As sequências resultantes foram então analisadas quanto à qualidade da sequência e submetidas à formação de *contigs*, visto que cada reação cobriu toda a extensão do fragmento analisado.

Na tentativa de aprimorar a identificação desses fungos a outra região sequenciada do rDNA 28S amplificada com os iniciadores UNIF e UNIR, também foi submetida a análises filogenéticas pelos mesmos métodos utilizados para as sequências ITS. Os resultados dessas análises confirmaram os gêneros obtidos nas análises das

sequências ITS, mas para a maioria dos fungos apenas essas regiões não foram suficientes para a determinação das espécies.

A sequência ITS da linhagem L01 quando submetida a análises pelo BLASTn apresentou identidade de 99% com sequências de *Penicillium bilaiae* e de 93 a 95% com outros fungos do gênero *Penicillium* tais como *P. adametzii* e *P. angulare*. A sequência obtida pela amplificação da região rDNA 28S apresentou resultado semelhante quando submetida ao BLASTn, com identidade de 100% com uma linhagem de *P. bilaiae* e 98-99% com sequências 28S de *P. angulare*, *P. adametzii* e *P. brocae*. As análises filogenéticas realizadas para essas sequências indicam o *Penicillium bilaiae* como sendo o mais próximo da linhagem L01.

A análise das sequências ITS e da região rDNA 28S da linhagem L03 no programa BLASTn apresentou predominantemente sequências de linhagens de *Penicillium citrinum* com identidade de 99% para a região ITS e 100% para o rDNA 28S. Algumas sequências de outros fungos do gênero *Penicillium* também foram consideradas, mas apresentaram menor identidade com as da linhagem L03. Pode-se destacar o *P. griseofulvum* com 99% de identidade para a sequência ITS, *P. maleagrinum* e *P. stekii* com 98% de identidade para a sequência rDNA 28S. Esses resultados associados aos obtidos nas análises filogenéticas realizadas nessas sequências sugerem que o *Penicillium citrinum* é mais próximo de L03.

Análises no programa BLASTn mostraram que as sequências obtida para a linhagem L04 apresentaram identidade de 99% com sequências ITS e rDNA 28S de várias linhagens de *Hypocrea lixii*. Por meio do método do código de barras (TrichOKEY 2) a linhagem L04 foi identificada como *Hypocrea lixii*, (seção *Pachybasium* - clado *Harzianum*) que é a fase sexual do fungo *Trichoderma harzianum*.

A identificação foi realizada com alto grau de confiança por ter sido desenvolvida com base em 285 sequências confirmadas que mostraram 33 alelos de ITS 1 e 2. Cinco âncoras específicas do gênero foram encontradas nas posições 69, 91, 252, 410 e 509 da sequência, confirmando assim o gênero; e três regiões específicas de determinação da espécie também foram detectadas: região 1 (9 nucleotídeos), região 2 (155 nucleotídeos) e a região 3 (138 nucleotídeos).

Para a linhagem L05 as análises da sequência ITS no programa BLASTn mostraram uma identidade de 99% com sequências ITS de *Trichoderma koningii*/*Hypocrea koningii*, *Trichoderma koningiopsis* e *Trichoderma ovalisporum*, todos pertencentes à seção *Trichoderma* – clado *Viride*. Pelo programa TrichOKEY 2, o isolado L05 foi identificado como *Trichoderma koningii*, a identificação foi realizada com alto grau de confiança por ter sido desenvolvida com base em 20 sequências confirmadas que apresentam os alelos de ITS. Cinco âncoras específicas do gênero foram encontradas nas posições 40, 61, 207, 365, e 466 da sequência, confirmando assim o gênero, e três regiões específicas de determinação da espécie também foram detectadas: região 1 (8 nucleotídeos), região 2 (140 nucleotídeos) e a região 3 (150 nucleotídeos).

As sequências ITS e rDNA 28S da linhagem L06 apresentaram alinhamento significativo com diversas linhagem de *Aspergillus niger*, sendo observada identidade máxima de 100% para a maioria das sequências ITS e de 99% com sequências rDNA 28S. Poucas sequências de outros fungos apareceram na análise do BLASTn, tais como *A. tubingensis*, *A. awamori* e *A. foetidus* que apresentaram certa identidade principalmente com a sequência da região rDNA 28S. As análises filogenéticas confirmam a proximidade da linhagem L06 com o *A. niger*.

A sequência ITS da linhagem L07 submetida à análise no BLASTn apresentou identidade máxima de 89 a 90% com linhagens de *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma gamsii* e *Trichoderma ovalisporum* pertencentes à seção *Trichoderma* e ao clado *Viride*. Apesar da linhagem L07 ter sido classificada como *Trichoderma*, apresentou apenas uma âncora específica do gênero que foi encontrada na posição 464 pelo programa TrichOKEY 2, não sendo possível a identificação pelo método do código de barras.

A sequência da linhagem L08 ao ser submetida às análises moleculares para sua identificação apresentou alinhamentos significativos (e-value = 0.0) com fungos do gênero *Pestalotiopsis*. A sequência ITS mostrou identidade com sequências ITS principalmente de linhagens do fungo *P. microspora*, apareceram ainda na análise poucas sequências de *P. clavispota* com identidade máxima de 99% entre as sequências. A região rDNA 28S ao ser submetida ao BLASTn alinhou com sequências rDNA 28S derivadas de diversas espécies do gênero *Pestalotiopsis*, todas com identidade máxima abaixo de 92%. É interessante ressaltar que não foram constatadas sequências de *P. microspora* nos resultados do BLASTn para esta sequência.

A sequência ITS da linhagem L09 apresentou alinhamento com muitas sequências de fungos não cultivados, Ascomycota, sem identificação. Algumas sequências do gênero *Curvularia* também foram alinhadas com 99% de identidade máxima, em sua maioria eram identificadas como *Curvularia sp.* Poucas sequências estavam identificadas, *C. affinis* e *C. geniculata* com 99% de identidade máxima, e *C. inaequalis* com 94%.

O isolado L10 foi classificado como *Trichoderma*, apresentando 99% de identidade com sequências ITS de várias linhagens de *Trichoderma atroviride* (seção

Trichoderma – clado Viride). Utilizando o banco de dados da *International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy* pelo programa TrichOKEY 2 não foi possível a identificação da espécie pelo método do código de barras, pelo fato de sua sequência apresentar apenas uma das âncoras específicas do gênero encontrada na posição 91, sugerindo que a sequência pode estar incompleta.

Nas sequências obtidas da linhagem L11 submetidas ao BLASTn foi observado identidade com sequências de várias linhagens de *Penicillium*, dentre os fungos que apresentaram maior quantidade de sequências alinhadas se destacaram o *P. pinophilum* e o *P. verruculosum* com 99 a 100% de identidade máxima. As análises filogenéticas para as sequências de L11 mostram maior proximidade com as de *P. verruculosum* para ITS, e não consegue distinguir *P. verruculosum* de *P. pinophilum* pelas sequências da região rDNA 28S.

A análise da sequência ITS da linhagem L12 mostrou alinhamentos significativos com fungos do gênero *Emericella*, em sua maioria com sequências de *Emericella nidulans*. As análises filogenéticas agruparam L12 junto com *E. nidulans* e algumas sequências de *E. rugulosa*.

Os resultados do BLASTn para a sequência ITS da linhagem L14 mostraram alinhamento com várias sequências de fungos endófitos não identificados e fungos de solo não cultivados. A maioria das poucas sequências identificadas presentes nos resultados da busca pertencia ao gênero *Coniochaeta* ou ao seu anamorfo *Lecythophora*, apresentando identidade máxima de 90 a 92% a sequência ITS da linhagem L14.

Os resultados da sequência ITS da linhagem L16 no BLASTn apresentou alinhamento com sequências ITS de diferentes gêneros de fungos (*Geomyces*,

Botryosphaeria, *Diplodia*, *Melanops*, *Phaeobotryon*, *Barriopsis*, *Valsaria* e *Pseudorobillarda*) onde a identidade máxima não ultrapassou 86%.

Com a análise filogenética das sequências foi possível identificar pelo menos o gênero da maioria dos fungos isolados (tabela 8), principalmente pela análise das sequências ITS.

Tabela 8. Identificação das linhagens isoladas.

Linhagem	Gênero	Espécie
L01	<i>Penicillium</i>	<i>sp.</i>
L03	<i>Penicillium</i>	<i>sp.</i>
L04	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>
L05	<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>
L06	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
L07	<i>Trichoderma</i>	<i>sp.</i>
L08	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>sp.</i>
L09	<i>Curvularia</i>	<i>sp.</i>
L10	<i>Trichoderma</i>	<i>sp.</i>
L11	<i>Penicillium</i>	<i>sp.</i>
L12	<i>Emericella</i>	<i>sp.</i>

Marcadas em cinza as linhagens selecionadas para dar continuidade ao trabalho.

4.4. Avaliação da produção de celulases pelos isolados selecionados

Os fungos identificados como L04, L05 e L10 foram selecionadas para seguir com as análises enzimáticas por se destacarem em relação às outras no crescimento mais acelerado das colônias. L08 e L11 apesar de apresentarem crescimento um pouco mais lento também foram selecionados por sua capacidade de hidrólise marcada por maiores áreas ao redor das colônias em todas as réplicas analisadas dos experimentos em placas contendo CMC.

Esses fungos foram inoculados após etapa de pré-inóculo em um meio suplementado com CMC 0,5% (p/v) e SIG 0,5% (p/v) como fontes de carbono. O desenvolvimento das culturas em fermentação submersa foi acompanhado com a retirada de amostras a cada 24 horas para análises quanto às atividades de endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases.

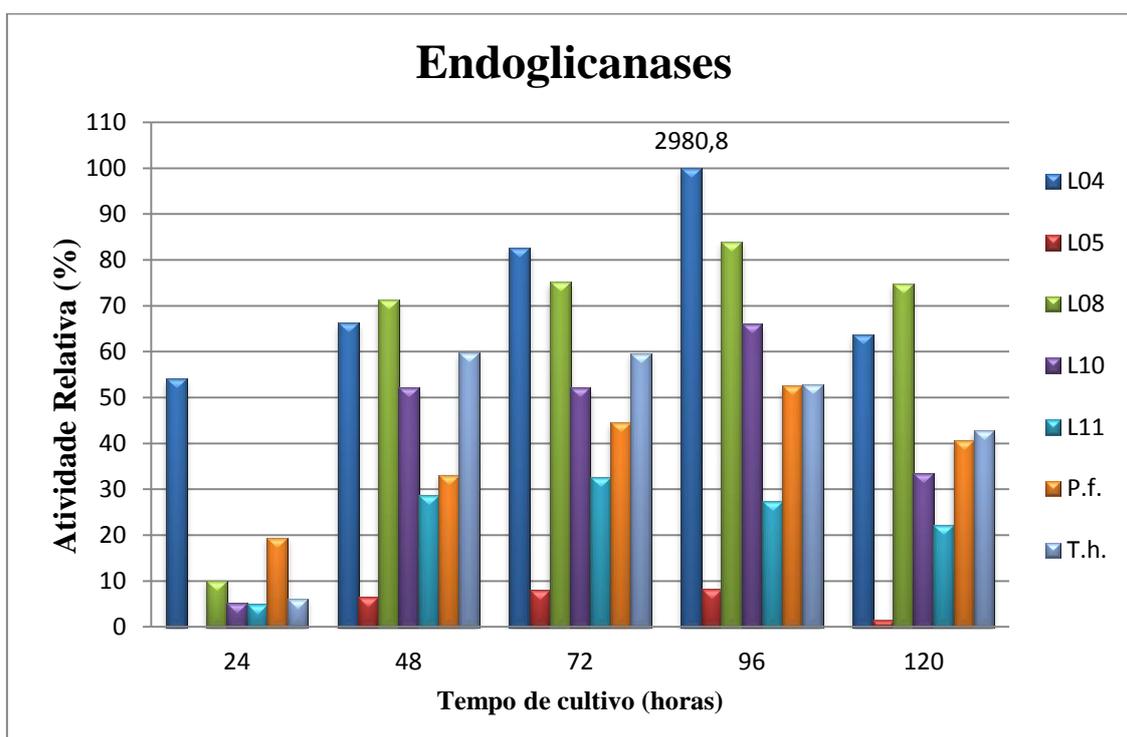


Figura 6. Avaliação da produção de endoglicanases em diferentes tempos de indução em meio contendo CMC+SIG. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. P.f.: *Penicillium funiculosum*; T.h.: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

No ensaio, para detecção das atividades endoglicanásicas ao longo do tempo de crescimento dos fungos, os sobrenadantes das culturas foram submetidos ao ensaio de CMCcase. As linhagens L04 e L08 apresentaram atividades superiores às dos fungos usados como modelo, chegando a quase o dobro da produção de celulasas observada pelos fungos *T. harzianum* IOC 3844 e *P. funiculosum* em 96 horas de cultivo. É

importante observar que a linhagem L04 necessitou de um menor tempo de adaptação ao meio de cultura e iniciou a produção das endoglicanases antes dos outros fungos estudados nestas condições (figura 6), demonstrando o potencial deste fungo na produção dessas enzimas.

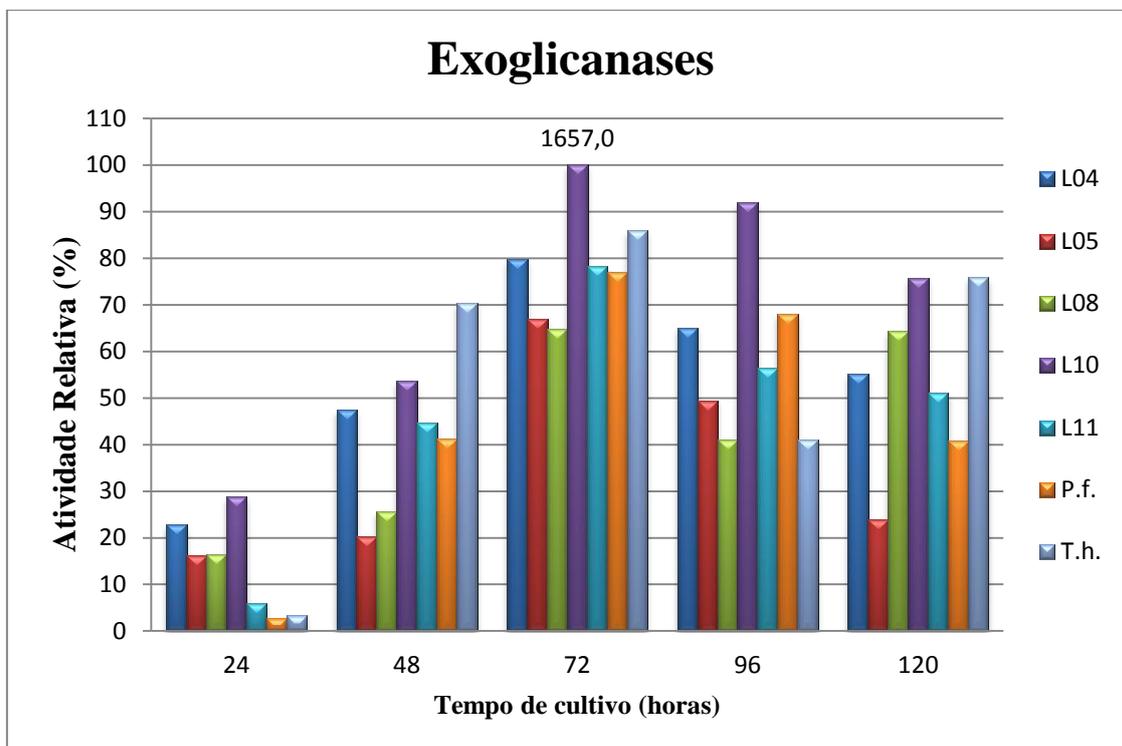


Figura 7. Avaliação da produção de exoglicanases em diferentes tempos de indução em meio contendo CMC+SIG. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. P.f.: *Penicillium funiculosum*; T.h.: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

Para a avaliação das atividades exoglicacanáicas presentes nos sobrenadantes das culturas dos isolados do cerrado, o ensaio de Avicelase foi realizado utilizando SIG como substrato para a reação enzimática. Os resultados desse experimento mostraram um padrão semelhante na produção dessas enzimas ao longo do tempo de cultivo por todos os fungos analisados. As maiores atividades foram detectadas em 72 horas de cultivo, onde L10 apresentou o maior valor de atividade (1657,0 U.mL⁻¹) como pode ser observado na figura 7.

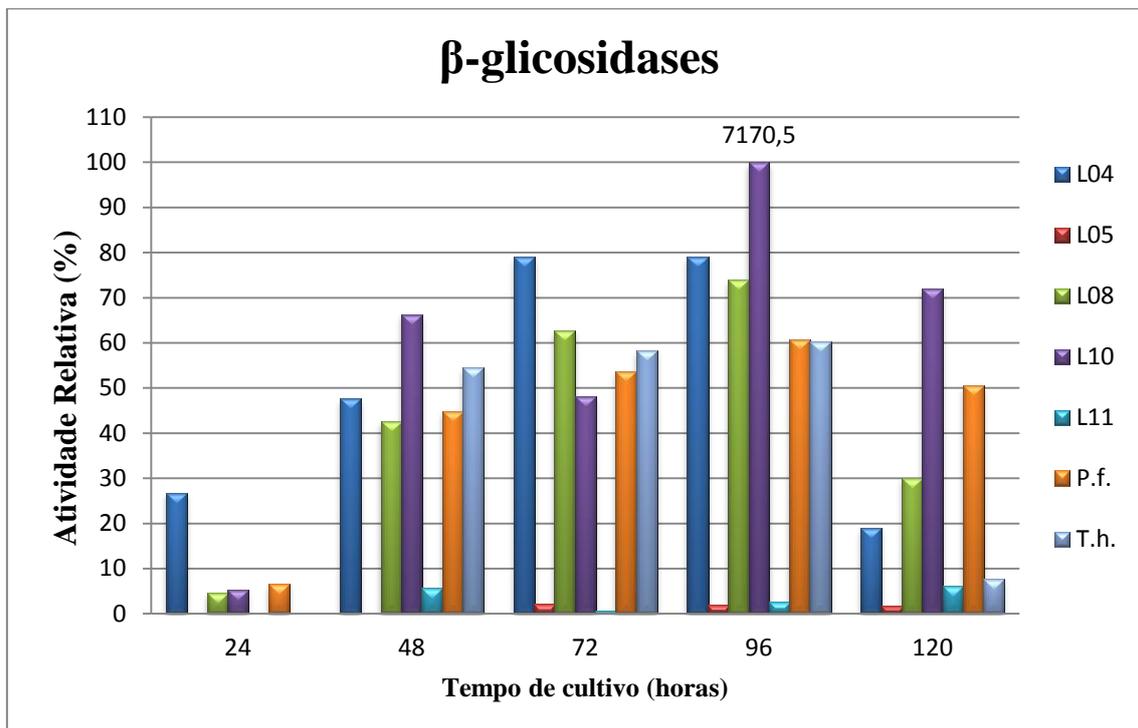


Figura 8. Avaliação da produção de β-glicosidases em diferentes tempos de indução em meio contendo CMC+SIG. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. P.f.: *Penicillium funiculosum*; T.h.: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

As atividades de β-glicosidases presentes nos sobrenadante das culturas foram dosadas pelo ensaio de pNPGase com a utilização de pNPG como substrato para a reação enzimática. O resultado desse experimento está apresentado na figura 8, onde as linhagens L04, L8 e L10 produziram níveis significativos de atividades de β-glicosidases quando comparados aos fungos modelo.

Para facilitar a comparação, as maiores atividades encontradas nos ensaios enzimáticos realizados estão descritas na tabela 9, indicados os tempos de cultivo onde essa atividade foi verificada.

Tabela 9. Valores máximos de atividade enzimática produzida pelos fungos em crescimento indireto com indução por CMC+SIG.

Linhagem	Endoglicanase	Exoglicanase	β-glicosidases
L04	2980,8 (96)	1319,6 (72)	5665,8 (72)
L05	247,8 (96)	1109,1 (72)	136,0 (96)
L08	2501,6 (96)	1074,8 (72)	5297,1 (96)
L10	1969,0 (96)	1657,0 (72)	7170,5 (96)
L11	972,9 (72)	1297,4 (72)	434,8 (120)
<i>P. funiculosum</i>	1569,3 (96)	1276,0 (72)	4352,2 (96)
<i>T.harzianum</i> IOC3844	1783,1 (48)	1425,0 (72)	4324,1 (96)

Atividade enzimática (U. L⁻¹). Os valores em parênteses correspondem ao tempo de cultivo (h) quando os resultados máximos foram observados.

Nesses ensaios com indução indireta todos os isolados do cerrado, com exceção de L05, apresentaram níveis significativos de produção de celulases, com destaque para as linhagens L04, L08 e L10 que possuem um interessante potencial celulolítico, tendo em vista o equilíbrio na produção de endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases que esses fungos apresentaram. Outro fator observado que volta as vistas para a linhagem L04 foi o tempo de adaptação às novas condições de cultura quando o micélio foi inoculado no meio de fermentação submersa com CMC+SIG como fonte de carbono. Essa linhagem começou a produção de enzimas do complexo celulolítico antes dos outros fungos como pode ser observado na tabela 10. A produtividade volumétrica observada para L04 em 24h já atingia altos níveis para CMCase e pNPGase.

Tabela 10. Valores máximos de produtividade volumétrica observados para a produção de celulases por isolados do cerrado e pelos fungos *T. harzianum* IOC3844 e *P. funiculosum* em crescimento indireto com indução por CMC+SIG.

Linhagem	CMCase	Avicelase	ρNPGase
L04	67,2 (24)	18,3 (72)	79,8 (24)
L05	4,1 (48)	15,4 (72)	2,1 (72)
L08	44,3 (48)	14,9 (72)	63,4 (48)
L10	32,4 (48)	23,0 (72)	99,1 (48)
L11	17,8 (48)	18,0 (72)	8,4 (48)
<i>P. funiculosum</i>	24,1 (24)	17,7 (72)	67,1 (48)
<i>T.harzianum</i> IOC3844	37,1 (48)	24,3 (48)	81,4 (48)

Produtividade volumétrica (U. L⁻¹ . h⁻¹). Os valores em parênteses correspondem ao tempo de fermentação (h) quando os resultados máximos foram observados.

Com o intuito de analisar o comportamento do perfil enzimático secretado pelas linhagens selecionadas em diferentes fontes de carbono, estas foram cultivadas de maneira direta em meio para fermentação submersa suplementado tanto com fontes de carbono quimicamente definidas (CMC, SIG ou XIL), quanto em materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana *in natura* (BCA) e na forma de celulignina semi-deslignificada (CSD). Para cada uma das culturas nesses substratos foram analisadas as atividades de endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidases e xilanases.

A partir desta etapa, a linhagem L05 foi eliminada dos experimentos devido às baixas atividades celulolíticas apresentadas nos experimentos anteriores. Nas figuras 9 e 10 estão apresentados os resultados dos ensaios enzimáticos, para as atividades de endoglicanases, realizados nas diferentes condições de cultivo. Neste experimento foi observada uma variação significativa na produção de endoglicanases das diferentes culturas testadas. As atividades detectadas em L08, L10 e L11 não passaram de 20% da atividade máxima observada no experimento (3039,0 U.L⁻¹) atingida pelo *T. harzianum*

em 120 horas de cultivo. A linhagem que se destacou nessa etapa foi a L04 apresentando atividade semelhante às encontradas para *T. harzianum* e *P. funiculosum* quando induzida por CMC. Vale à pena ressaltar que L04 atinge valores mais altos de atividade a partir de 72 horas de cultivo se mantendo até 120 horas, enquanto que o *T. harzianum* só aumenta sua atividade em 96 horas de cultivo e o *P. funiculosum*, apesar de ter se destacado ao iniciar a atividade a partir de 48 horas, se manteve em um nível mais baixo ao longo do crescimento da cultura (figura 9).

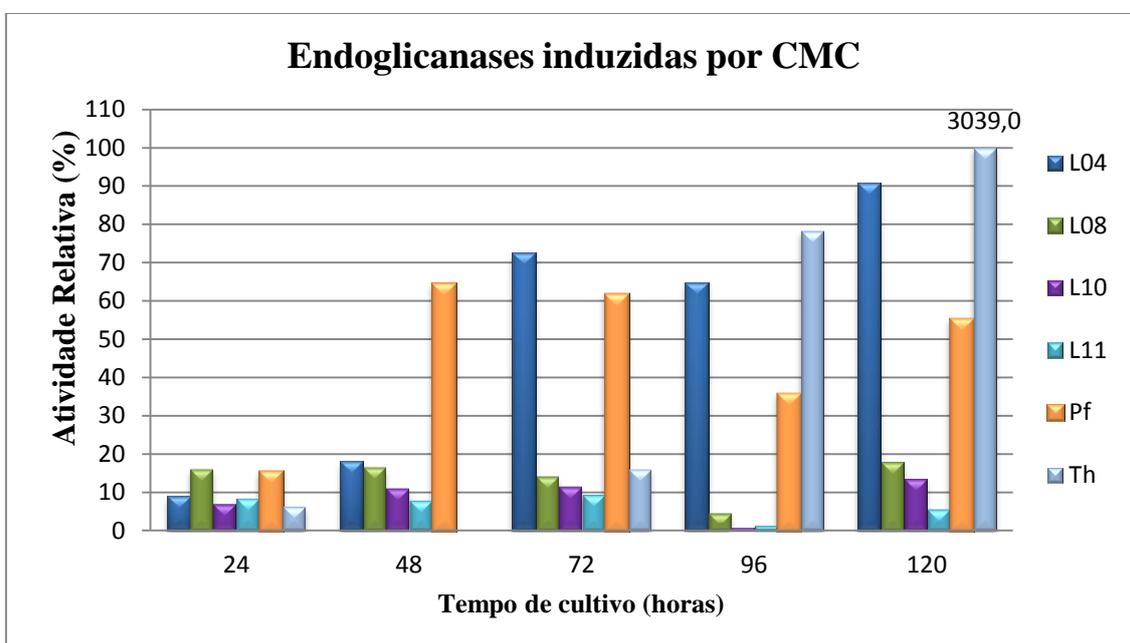


Figura 9. Atividade de endoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC, utilizando CMC como substrato para a reação enzimática. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. Pf: *Penicillium funiculosum*; Th: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

As atividades endoglicanásicas analisadas nos sobrenadantes das culturas crescidas em bagaço tratado (CSD) apresentaram um perfil semelhante em todos os fungos, sendo detectada apenas uma atividade basal durante todo o período de cultivo. Essa baixa atividade pode ser devido ao fato do bagaço tratado ainda possuir resíduos, gerados na hidrólise da hemicelulose e da lignina, que interferiram de forma a inibir a

atividade (ou a indução da produção destas enzimas) das endoglicanases secretadas por esses fungos (Berlin *et al*, 2006).

O resultado mais interessante na análise das endoglicanases foi observado no sobrenadante das culturas crescidas em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BCA). Neste substrato complexo todos os isolados tiveram baixa atividade endoglicanásica com exceção do isolado L04, que apresentou os maiores valores de atividades a partir de 48 horas do início do cultivo, se mantendo por todo o período analisado (figura 10). Os fungos modelo atingiram atividades menores que 70% do valor máximo de L04 apenas em 120 horas de cultivo.

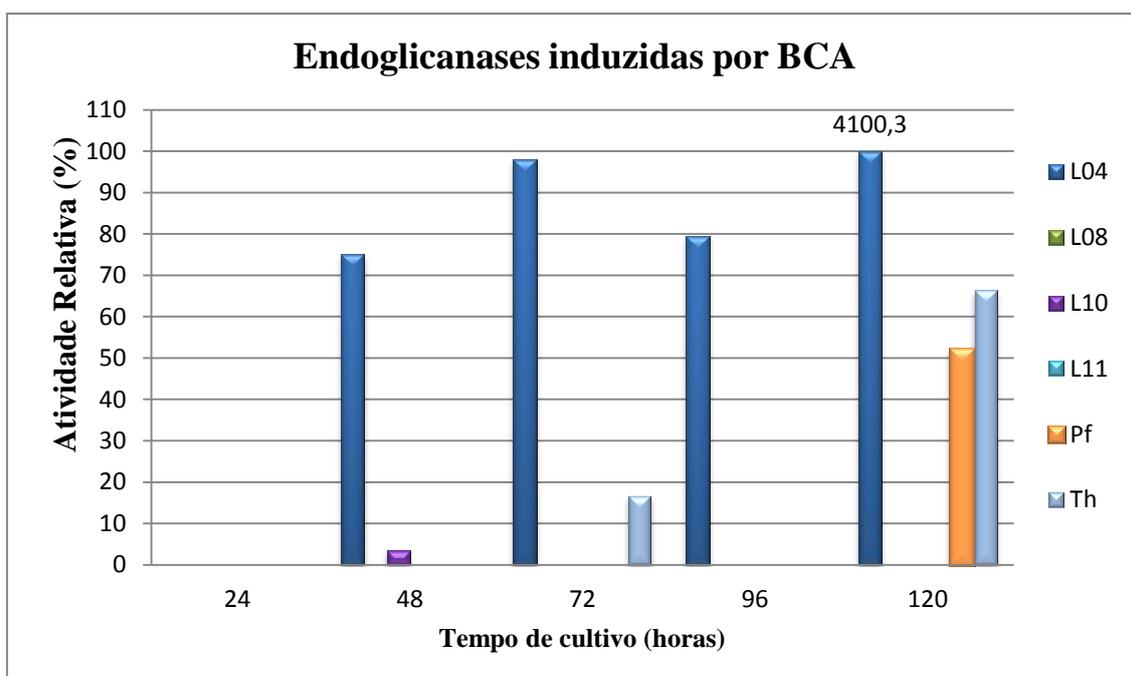


Figura 10. Atividade de endoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por BCA, utilizando CMC como substrato para a reação enzimática. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. Pf: *Penicillium funiculosum*; Th: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

As análises enzimáticas para endoglicanases reforçaram o potencial da linhagem L4 como produtor de enzimas celulolíticas, principalmente por ter apresentado atividades em um substrato complexo de baixo custo e abundante no Brasil (bagaço de cana de açúcar *in natura*). Além de apresentar produção de celulasas já no início da

cultura, diferentemente dos outros fungos analisados, o que sugere uma maior capacidade de adaptação ao substrato e condições de cultivo.

Nas figuras 11, 12 e 13 estão apresentados os resultados dos ensaios enzimáticos para as atividades de exoglicanases realizados com a variação da fonte de carbono celulósica. Como pode ser observado na figura 11, os níveis de atividades exoglicanásicas detectadas nos sobrenadantes dos fungos induzidos por CMC apresentaram um padrão semelhante durante todo o período de cultivo. Os fungos modelo se mostraram mais eficientes na produção das exoglicanases, enquanto que os isolados do cerrado obtiveram resultados de no máximo 80% da atividade máxima detectada para o *T. harzianum*.

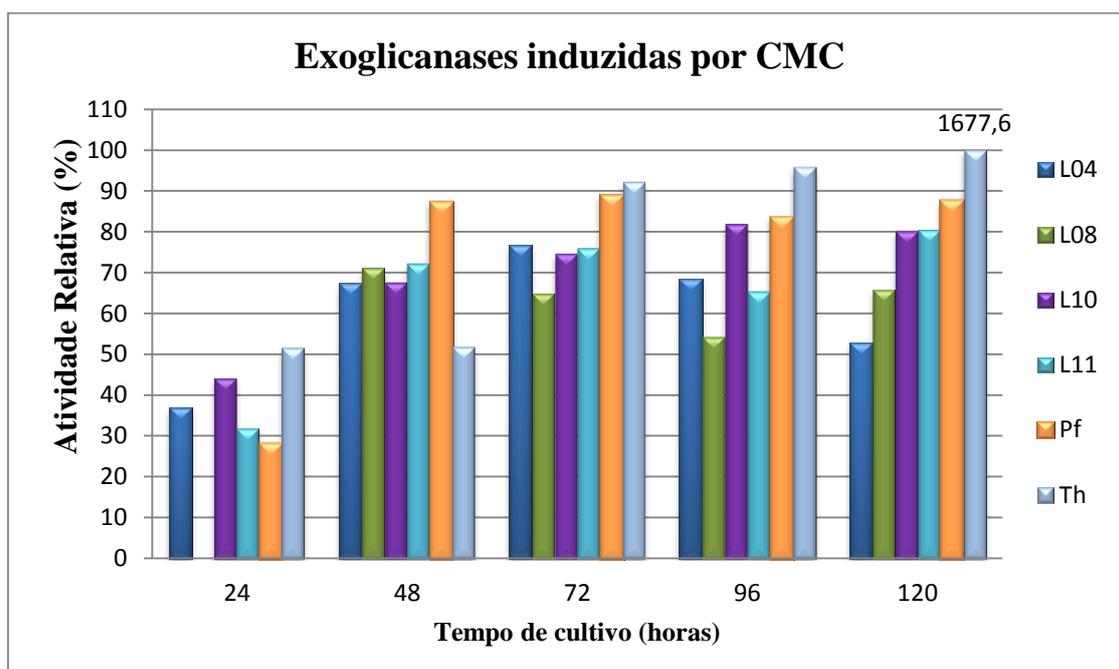


Figura 11. Atividade de exoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC, utilizando SIG como substrato para a reação enzimática. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. Pf: *Penicillium funiculosum*; Th: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

Com CSD utilizado como fonte de carbono os fungos analisados apresentaram de maneira geral valores menores de atividade de exoglicanases do que quando outros

substratos foram utilizados. As linhagens L04 e L10 apresentaram um pico de atividade em 96 e 72 horas respectivamente, com valores que se aproximam um pouco mais dos observados quando induzidos por BCA e CMC (figura 12).

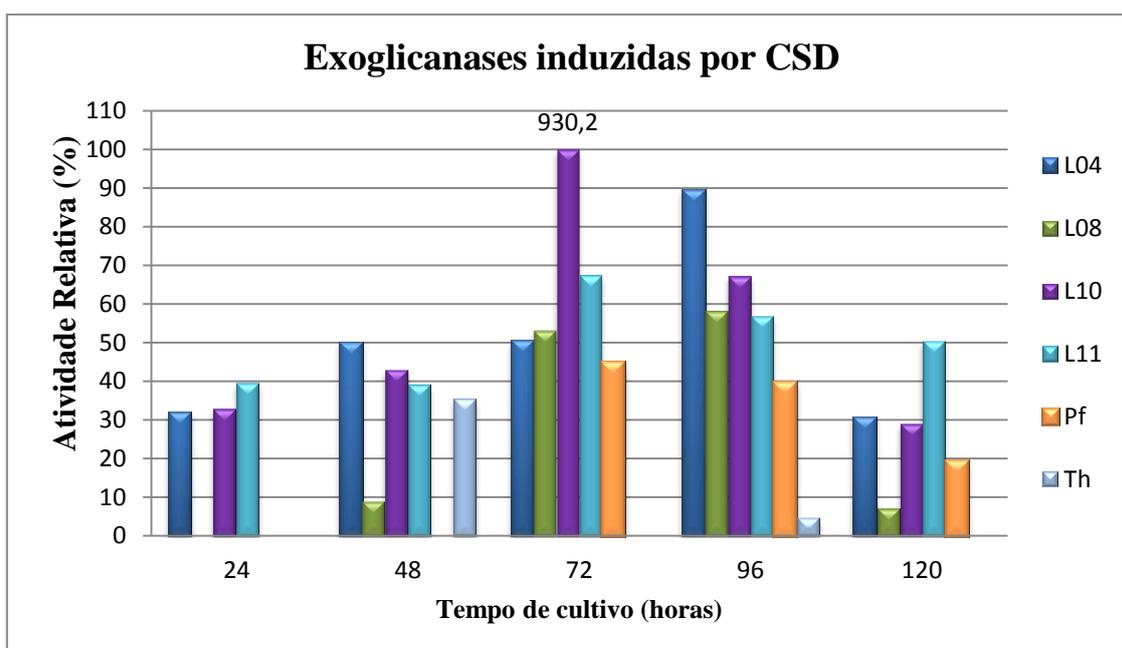


Figura 12. Atividade de exoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por CSD, utilizando SIG como substrato para a reação enzimática. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. Pf: *Penicillium funiculosum*; Th: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

Quando os fungos foram induzidos por BCA, a linhagem L10 apresentou uma atividade que se manteve mais ou menos constante de 24 a 96 horas de cultivo com valores de aproximadamente 70% do máximo obtido pelo *T. harzianum* e por L04, que apenas apresentaram essas atividades mais altas a partir de 96 horas de cultivo (figura 13).

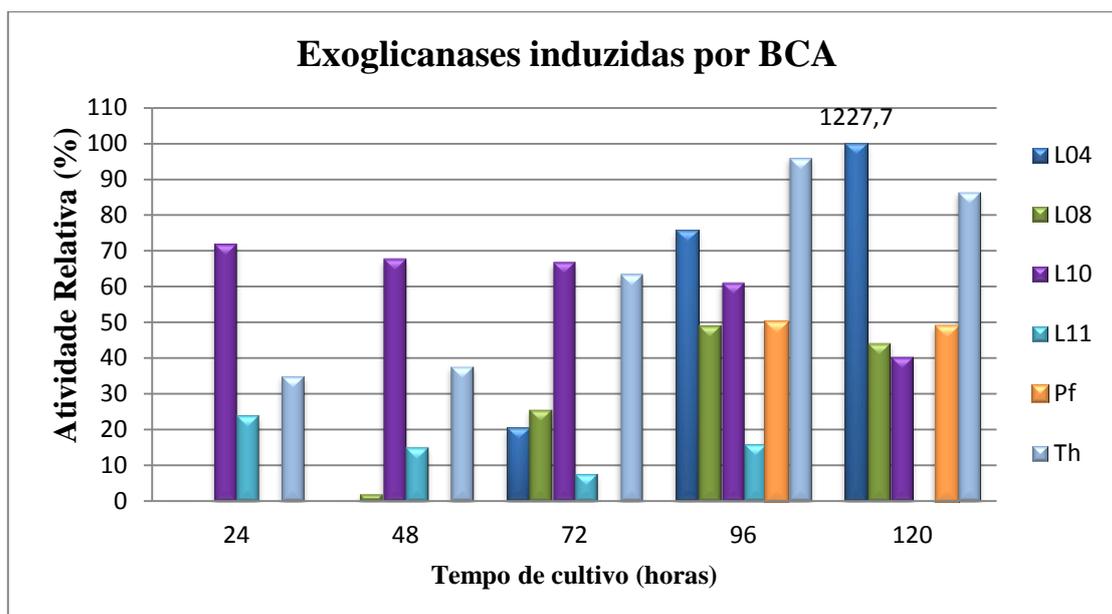


Figura 13. Atividade de exoglicanases dos isolados em diferentes tempos de indução por BCA, utilizando SIG como substrato para a reação enzimática. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. Pf: *Penicillium funiculosum*; Th: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

Nas figuras 14, 15, e 16 estão apresentados os resultados dos ensaios enzimáticos, para as atividades de β -glicosidases, realizados nos sobrenadantes das culturas induzidas por CMC, CSD e BCA.

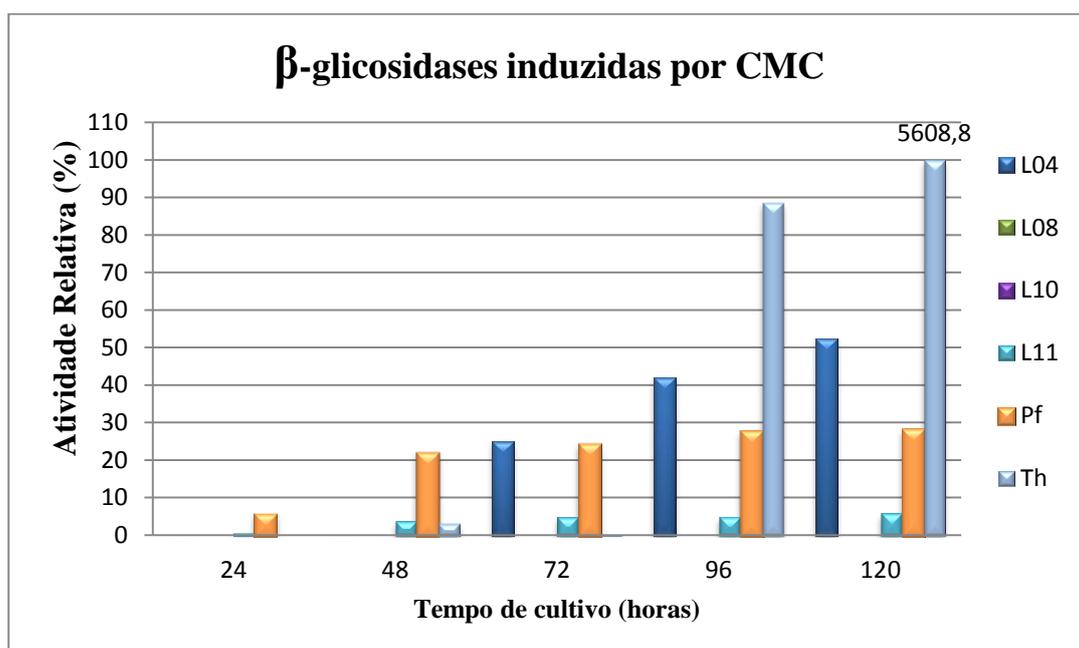


Figura 14. Atividade de β -glicosidasas dos isolados em diferentes tempos de indução por CMC, utilizando como substrato para a reação enzimática. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em $U.L^{-1}$. Pf: *Penicillium funiculosum*; Th: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

O *T. harzianum* (T.h.) apresentou uma maior atividade de β -glicosidasas quando induzido por CMC principalmente nos tempos finais da indução chegando a 5608,8 $U.L^{-1}$ em 120 horas de cultivo. O *P. funiculosum* (P.f.) apresentou atividade de β -glicosidasas em todos os tempos amostrados, porém os valores máximos detectados ficaram em torno de 30% do valor máximo obtido pelo *T. harzianum*. Dos isolados do cerrado, o único que apresentou atividade de β -glicosidase significativa foi o L04 que chegou a um valor máximo, em 120 horas de cultivo, de 2938,4 $U.L^{-1}$.

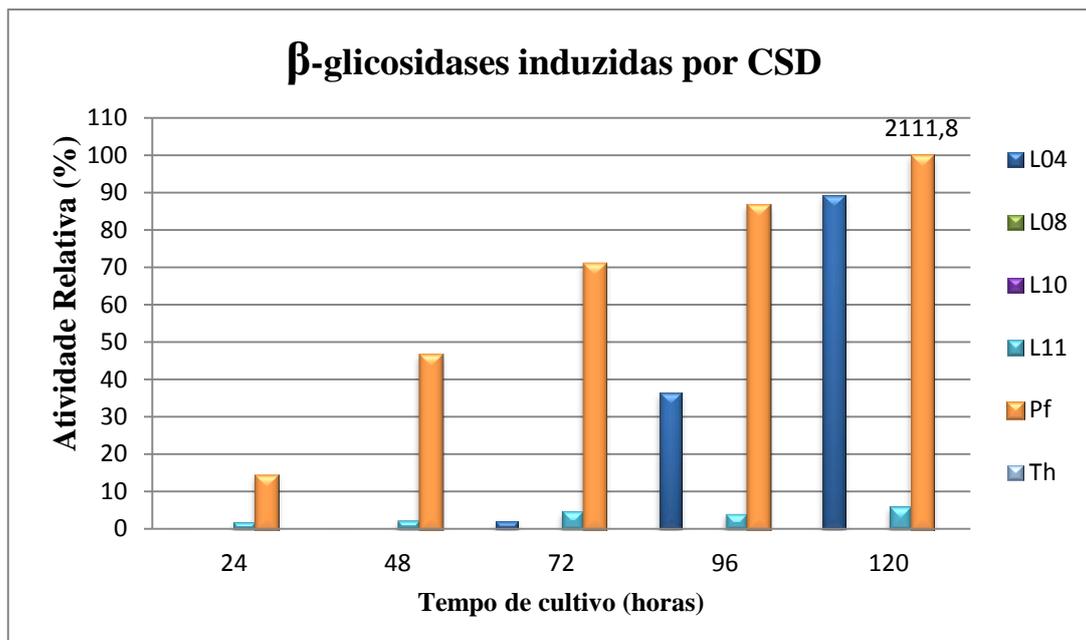


Figura 15. Atividade de β-glicosidases dos isolados em diferentes tempos de indução por CSD, utilizando pNPG como substrato para a reação enzimática. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. Pf: *Penicillium funiculosum*; Th: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

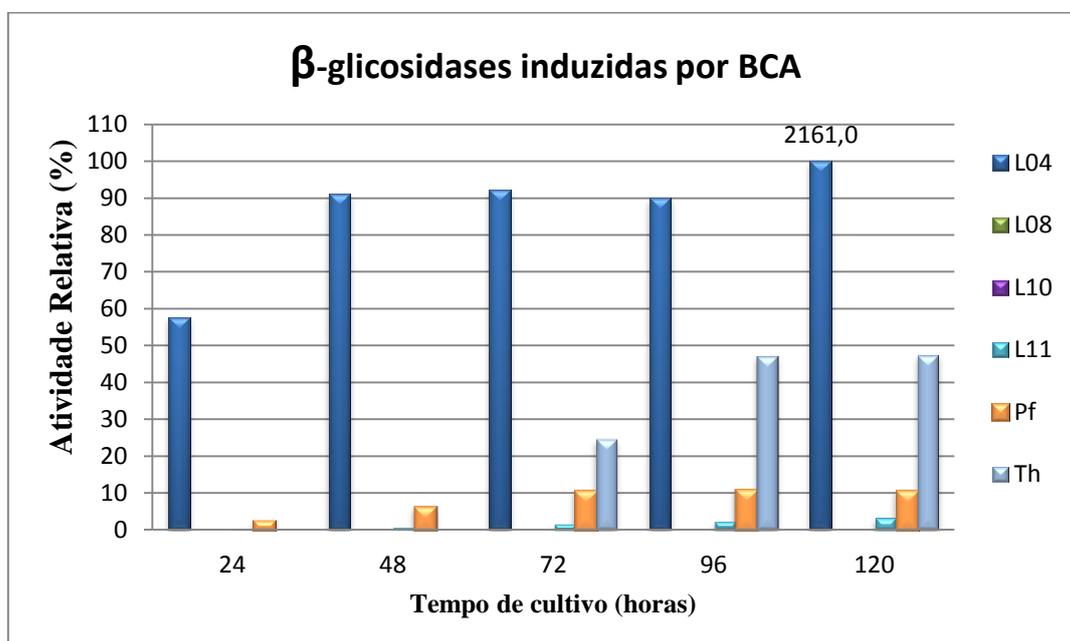


Figura 16. Atividade de β-glicosidases dos isolados em diferentes tempos de indução por BCA, utilizando pNPG como substrato para a reação enzimática. A maior atividade detectada neste experimento está indicada acima do ponto a que se refere em U.L⁻¹. Pf: *Penicillium funiculosum*; Th: *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvio padrão menor que 5%.

Quando induzido por CSD apenas *P. funiculosum* e L04 apresentaram atividade de β -glicosidase no sobrenadante das culturas, onde o L04 obteve atividade máxima de até 90% da detectada para o *P. funiculosum* em 120 horas de cultivo (figura 15). A indução por BCA destacou a atividade de β -glicosidase de L04 que obteve níveis duas vezes maiores que a máxima atividade apresentada pelo *T. harzianum*, mantidos ao longo do desenvolvimento da cultura como pode ser observado na figura 16.

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade celulolítica total das enzimas secretadas pelos fungos induzidas por diferentes fontes de carbono, apontam a linhagem L04 como o isolado mais promissor para a produção de enzimas celulolíticas, principalmente quando o fungo é cultivado em BCA.

Baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios enzimáticos realizados, a linhagem L04 destacou-se dos outros isolados do cerrado por suas características de crescimento mais rápido com conseqüente secreção de enzimas do complexo celulolítico desde momentos iniciais do desenvolvimento da cultura até momentos mais tardios. Além disso, o fungo L04 se mostrou resistente a possíveis inibidores da produção de enzimas celulolíticas quando cultivado em substrato natural como o bagaço de cana de açúcar ou no bagaço de cana de açúcar tratado. Por esses motivos a linhagem L04 foi selecionada para continuação dos estudos.

4.5. Análises enzimáticas da linhagem L04

Para uma melhor análise das enzimas secretadas pelo fungo L04, diferentes fontes de carbono foram utilizadas como indutores do complexo celulolítico deste fungo. Meios de cultura bem definidos com substrato celulósico (CMC ou SIG), um

substrato hemicelulósico (XIL) e um substrato complexo (BCA) foram preparados para esta finalidade. As culturas foram obtidas a partir de inóculo de uma mesma quantidade de esporos da linhagem L04 e mantidas sob condições de agitação e temperatura controladas por 120 horas. A cada 24 horas de cultivo uma alíquota de cada cultura foi retirada e dosadas as atividades de CMcase, FPase, Avicelase, ρ NPGase e Xilanase (figura 17).

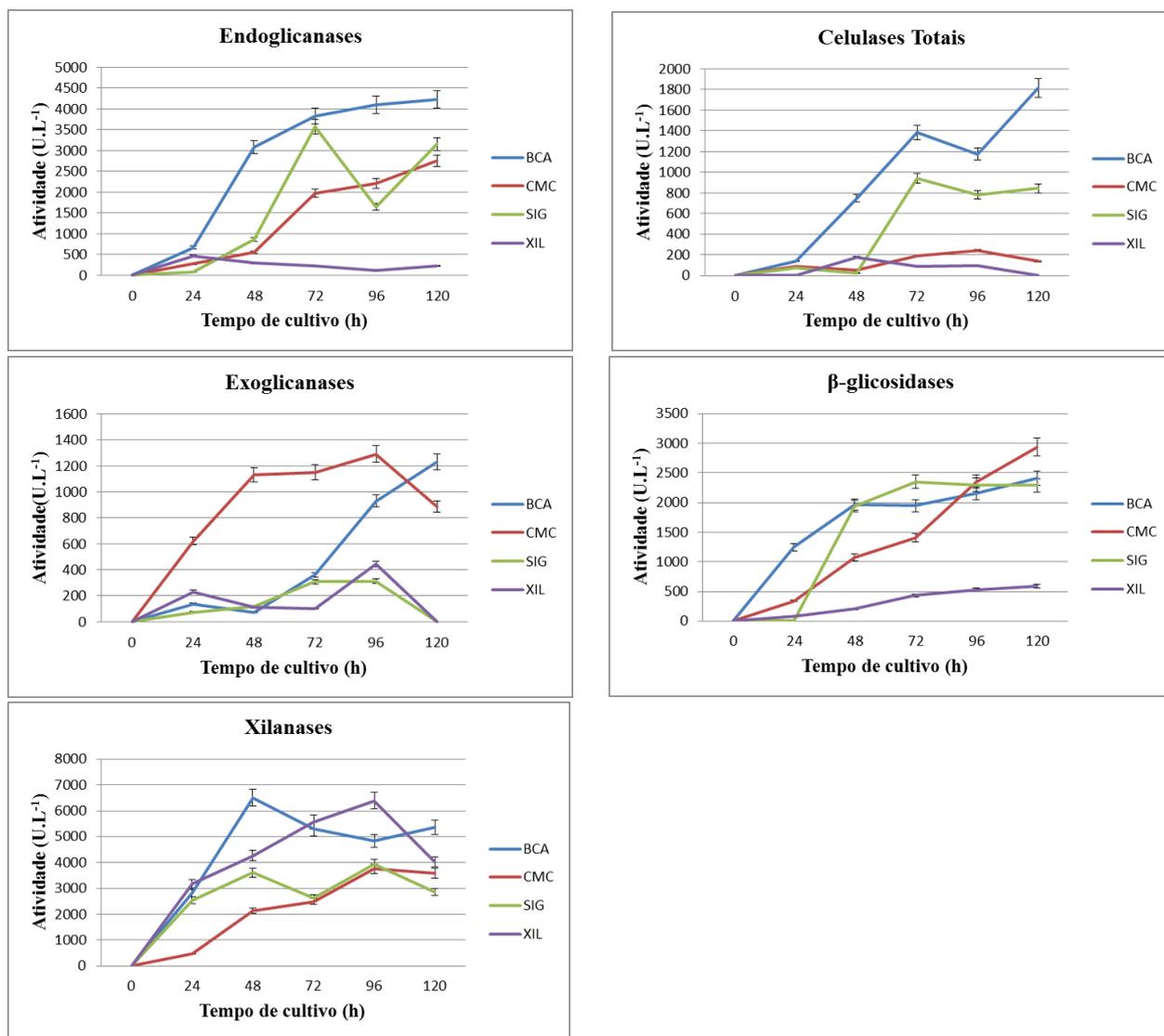


Figura 17. Avaliação das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 em meio contendo diferentes fontes de carbono. BCA: bagaço de cana de açúcar, CMC: carboximetilcelulose, SIG: celulose microcristalina, XIL: xilana *oat spelt*.

As atividades determinadas para essas condições de cultivo mostraram a capacidade da linhagem L04 de secretar essas enzimas envolvidas na sacarificação da holocelulose sob indução dos diferentes substratos. CMC foi a fonte de carbono, dentre as fontes celulósicas testadas, com a menor capacidade de indução das enzimas celulolíticas. Como esperado, XIL não foi um bom indutor de celulasas chegando a valores baixos de atividade celulolíticas quando comparado aos outros substratos testados.

BCA e SIG se mostraram mais eficientes na indução das celulasas chegando aos maiores valores de atividade detectados em todos os ensaios realizados para celulasas com esses substratos como indutores. Todos os substratos, mesmo CMC e SIG desprovidos de hemicelulose em sua composição, foram capazes de induzir a atividade de xilanasas neste fungo, promovendo a sacarificação da xilana nos ensaios enzimáticos.

Com a finalidade de comparar as atividades enzimáticas detectadas nas culturas da linhagem L04 com as produzidas por fungos utilizados para a produção comercial de celulasas, foi realizado o inóculo da linhagem de *T. reesei* Rut C30 sob as mesmas condições de cultivo da L04. Os ensaios enzimáticos foram realizados nas mesmas condições para os dois fungos, e estão apresentados nas figuras 18 a 21.

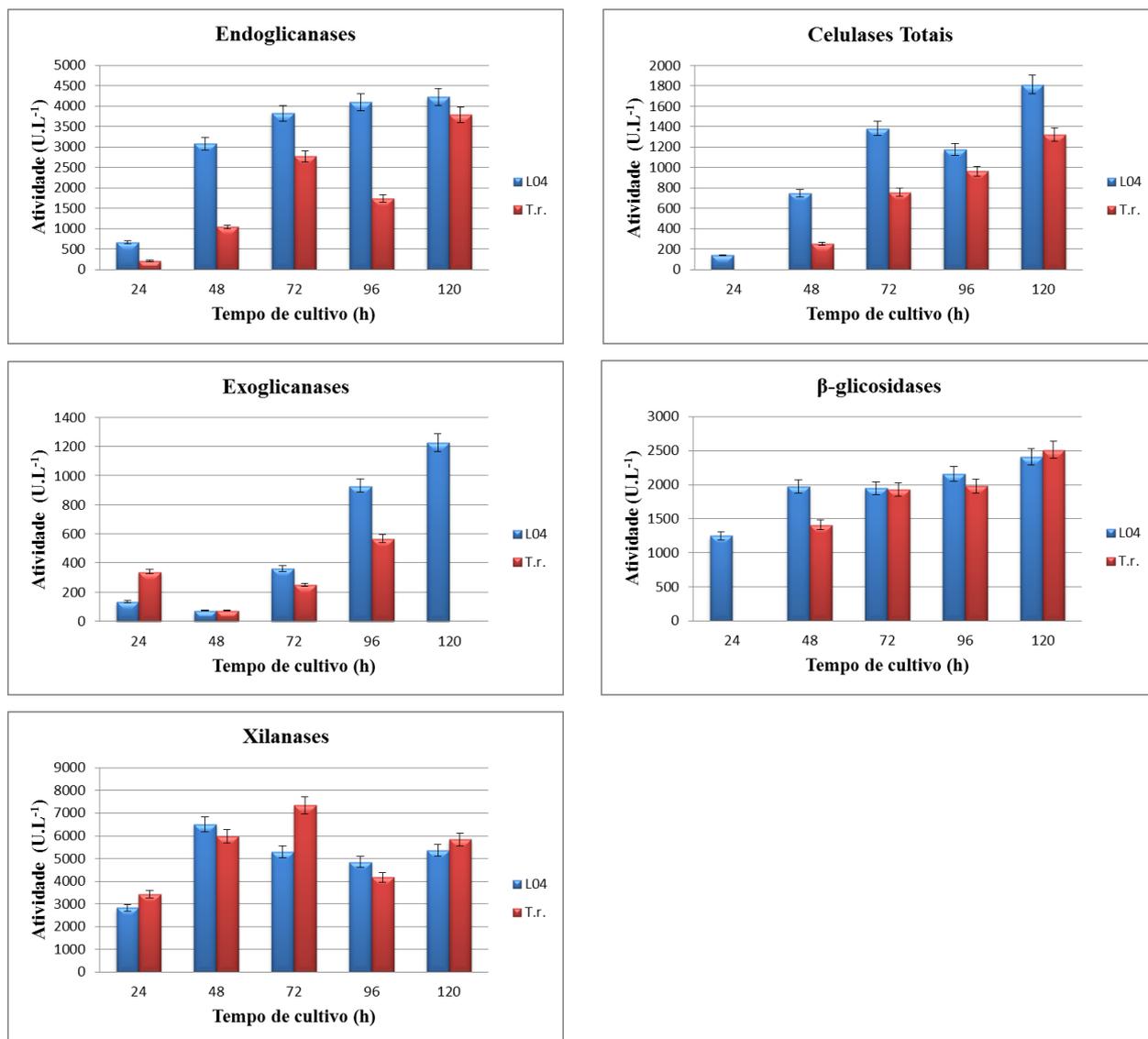


Figura 18. Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 e *T. reesei* (T.r.) induzidas por BCA.

Os fungos L04 e *T. reesei* demonstraram um padrão bem semelhante para as atividades analisadas no sobrenadante das culturas crescidas em BCA, com L04 atingindo maiores níveis desde os primeiros momentos da cultura e o *T. reesei* atingindo níveis semelhantes de atividade em tempos mais tardios (figura 18).

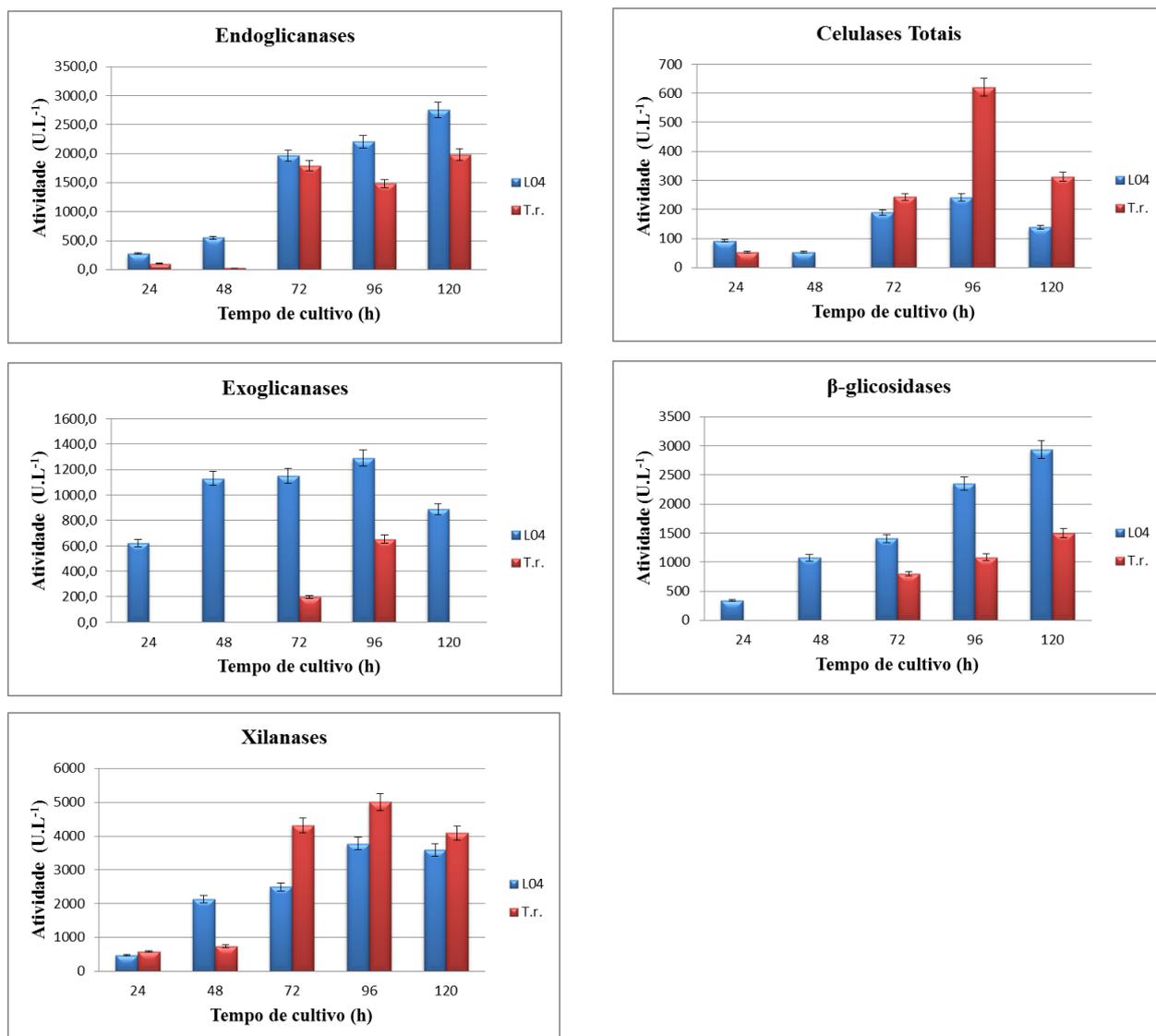


Figura 19. Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 e *T. reesei* (T.r.) induzidas por CMC.

Quando cultivado em CMC como única fonte de carbono o fungo L04 demonstrou uma capacidade de indução por esse substrato comparável ao *T. reesei*, principalmente em relação às atividades de endoglicanases e xilanases. Para as atividades de exoglicanases e β -glicosidases o L04 apresentou valores de atividades duas vezes ou mais acima das detectadas para o *T. reesei* (figura 19).

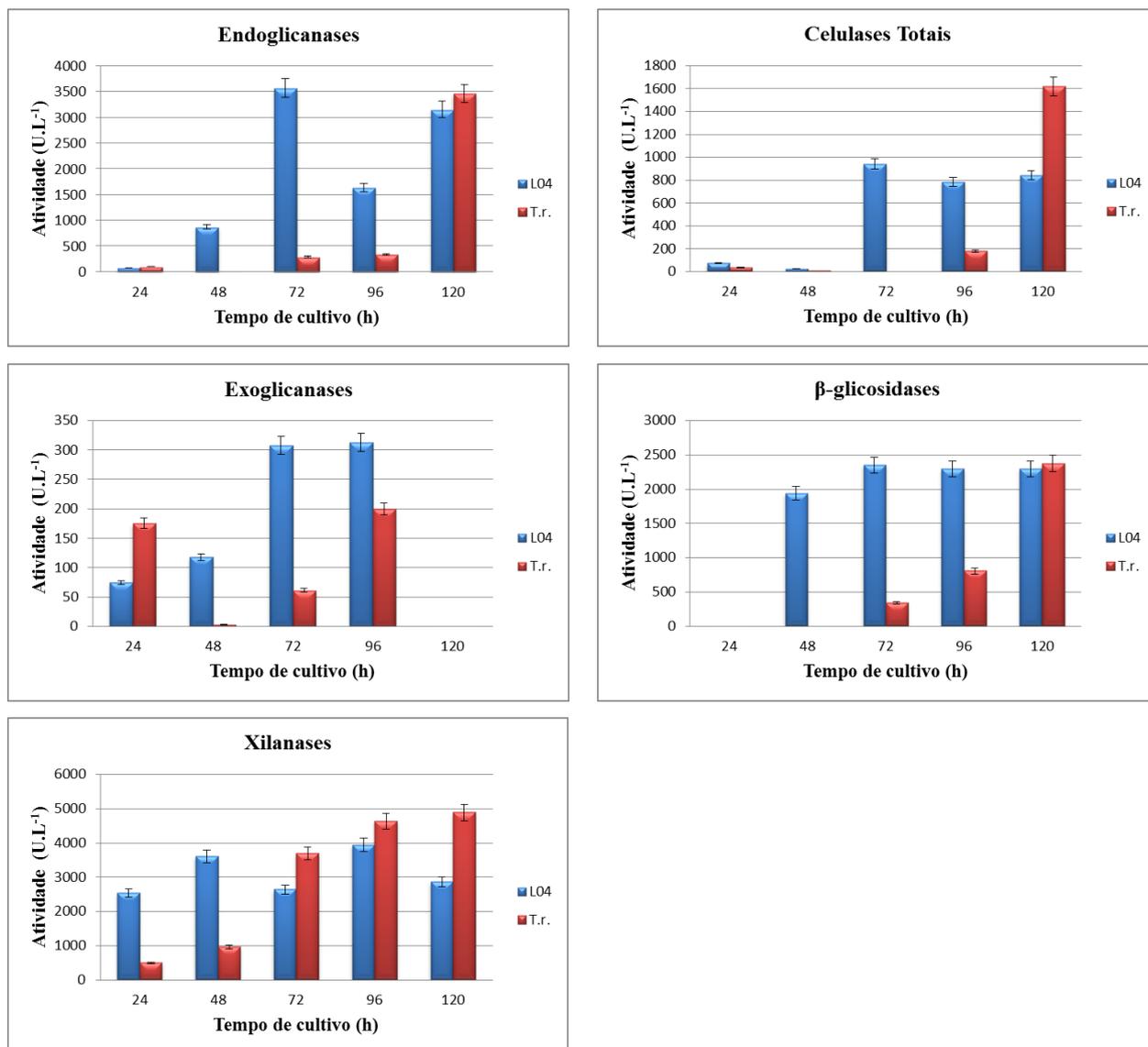


Figura 20. Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 e *T. reesei* (T.r.) induzidas por SIG.

Nos sobrenadantes das culturas dos fungos L04 e *T. reesei* cultivados em SIG, foi observado uma diferença significativa no padrão das curvas de atividade entre os dois fungos. As atividades determinadas para L04 apresentaram níveis mais altos desde o início do cultivo, níveis alcançados pelo *T. reesei* apenas após alguns dias de cultivo. É interessante ressaltar que não foi detectada atividade de exoglicanase no tempo de 120 horas (figura 20).

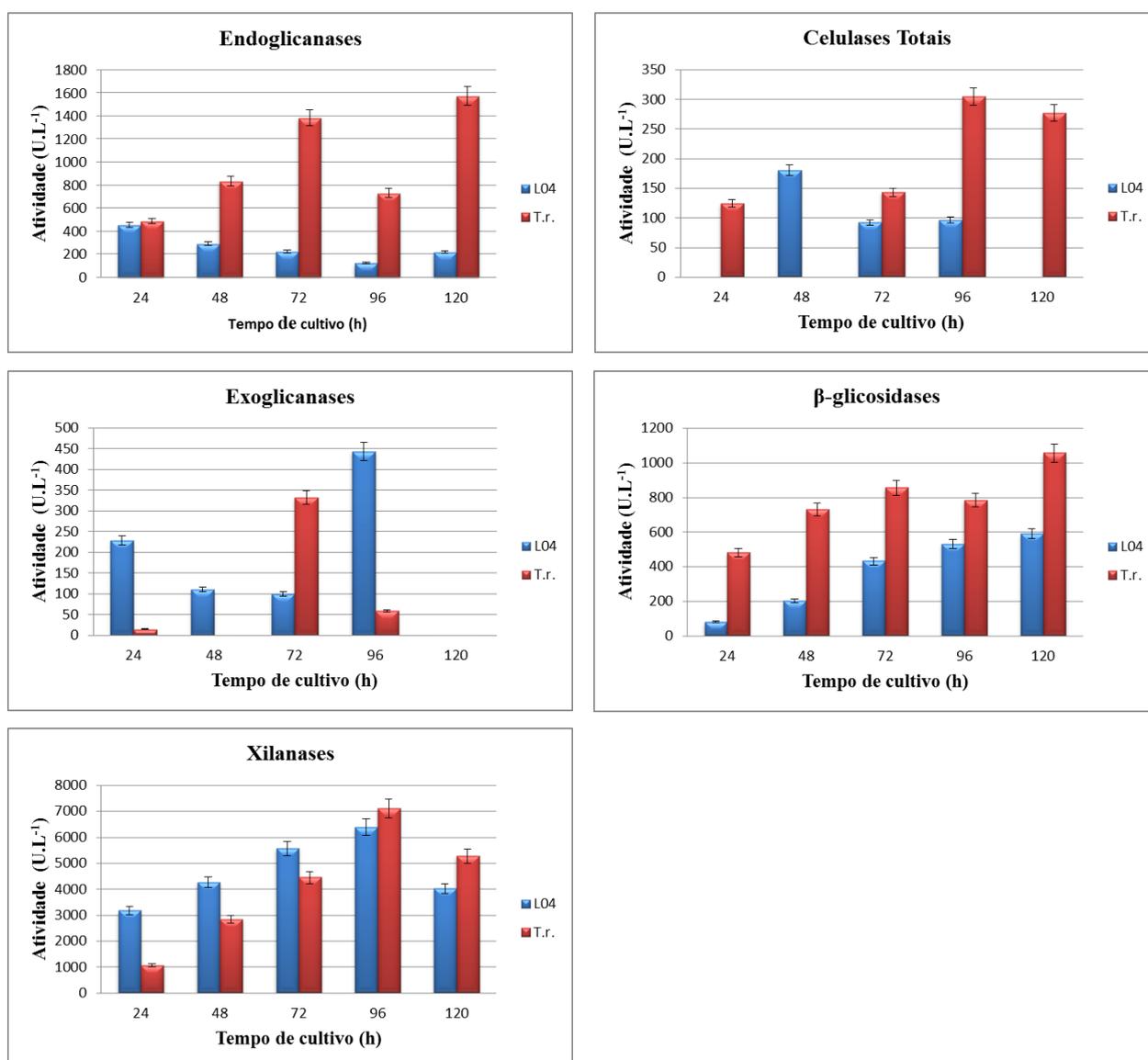


Figura 21. Análise comparativa das atividades enzimáticas detectadas no sobrenadante das culturas de L04 e *T. reesei* (T.r.) induzidas por XIL.

Como esperado, as atividades celulolíticas analisadas nos sobrenadantes das culturas dos fungos L04 e *T. reesei* induzidos por XIL (figura 21) não demonstraram valores significativos quando comparados com os obtidos nas culturas induzidas por BCA e CMC (figuras 18 e 19), com exceção da atividade de exoglicanase que apresentou picos com valores muito próximos aos valores obtidos quando induzidos por SIG (figura 20). A atividade de xilanase de ambos os fungos apresentou valores

próximos a 7000 U.L⁻¹, seguindo um padrão muito semelhante da curva de atividade ao longo do cultivo.

Para resumir os resultados apresentados nos ensaios enzimáticos dos fungos L04 e *T. reesei* a tabela 11 foi construída de forma que a visualização dos maiores valores de produtividade volumétrica determinados fossem mais facilmente comparados, levando em consideração o tempo de cultivo do determinado ponto.

Tabela 11. Comparação dos valores máximos de produtividade volumétrica observados para a produção de celulases pelas linhagens L04 e *Trichoderma reesei* Rut C30 induzidas por diferentes fontes de carbono.

Substrato	Linhagem	CMCase	Avicelase	FPase	ρNPGase	Xilanase
BCA	L04	64,2 (48)	10,2 (120)	19,2 (72)	52,0 (24)	135,7 (48)
	T.r.	38,6 (72)	14,2 (24)	11,0 (120)	29,3 (48)	143,0 (24)
CMC	L04	27,3 (72)	25,9 (24)	3,8 (24)	24,5 (120)	44,5 (72)
	T.r.	22,9 (72)	6,8 (96)	6,5 (96)	12,5 (120)	59,9 (72)
SIG	L04	49,6 (72)	4,3 (72)	13,1 (72)	40,4 (48)	105,8 (24)
	T.r.	28,8 (120)	7,3 (24)	13,5 (120)	19,8 (120)	51,4 (72)
XIL	L04	19,0 (24)	9,5 (24)	3,8 (48)	6,0 (72)	132,5 (24)
	T.r.	20,3 (24)	4,6 (72)	5,2 (24)	20,0 (24)	74,1 (96)

Produtividade volumétrica (U. L⁻¹.h⁻¹). Os valores em parênteses correspondem ao tempo de fermentação (h) quando os resultados máximos foram observados.

Os resultados apresentados na tabela 11 mostram que, com algumas exceções, o fungo L04 possui uma produtividade volumétrica superior ao *T. reesei* nas condições analisadas, principalmente quando a fonte de carbono utilizada para a fermentação foi BCA e SIG. Esses resultados indicam uma maior produtividade enzimática relacionada a celulasas em momentos mais precoces durante o cultivo da linhagem L04 quando comparada ao *T. reesei*.

4.6. Avaliação do perfil de proteínas secretado por SDS-PAGE

O sobrenadante da cultura da linhagem L04 induzida por BCA, após uma etapa de ultrafiltração para concentrar e remover resíduos de açúcar e sais da amostra, foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) para uma avaliação do perfil de proteínas secretado. Em paralelo outro gel idêntico foi submetido ao ensaio de zimograma, para detecção em gel das atividades celulolíticas (utilizando CMC na malha do gel como substrato para as enzimas) ou xilanolíticas (utilizando xilana na malha do gel como substrato para a reação enzimática).

A eletroforese foi desenvolvida e os géis receberam os tratamentos descritos na metodologia para: coloração com *comassie blue* para visualização das proteínas presentes no gel, ou tratamento para renaturação das proteínas no gel e ensaio enzimático com coloração utilizando vermelho congo para visualização dos halos de hidrólise formados (figura 22).

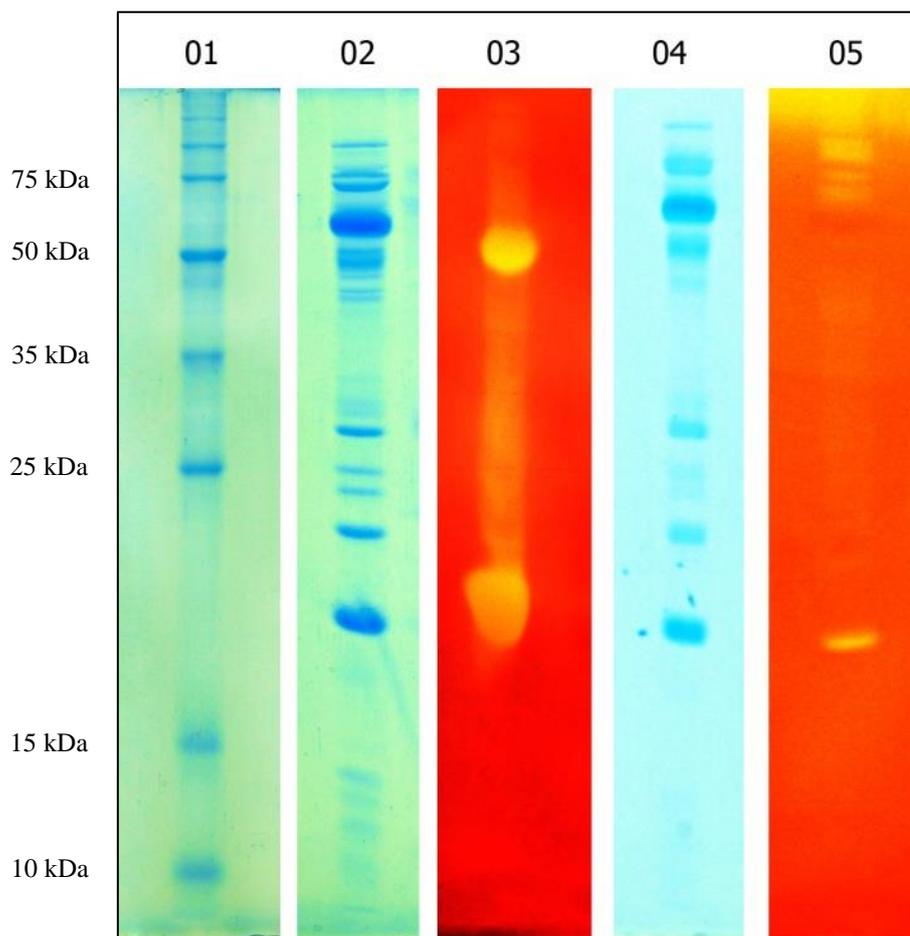


Figura 22. SDS-PAGE e zimograma do sobrenadante da cultura do fungo L04 quando cultivado em meio contendo BCA. **01-** Marcador de massa molecular (Broad Range Protein Molecular Weight, Promega). **02-** SDS-PAGE do sobrenadante L04 em gel com CMC. **03-** Zimograma em CMC do sobrenadante L04. **04-** SDS-PAGE do sobrenadante L04 em gel com XIL. **05-** Zimograma em XIL do sobrenadante L04.

O zimograma apresentado na figura 22 (linha 3) comprova a presença de pelo menos duas atividades de celulase distintas. Um halo de hidrólise bem visível com uma massa molecular aproximada de 50 kDa situada em um local onde pode ser observado um acúmulo de proteínas no gel corado com *comassie blue*, e outra atividade com massa molecular aproximada de 20 kDa apresentando um halo de hidrólise mais forte que o primeiro em um local onde pode ser observado apenas uma banda proteica destacada no gel corado com *comassie blue*.

Na coluna 5 da figura 22, no zimograma desenvolvido com xilana como substrato para a reação enzimática, pode ser observada uma discreta atividade de xilanase com a formação de um fino halo de hidrólise com massa molecular aproximada de 20 kDa. Esse resultado confirma pelo menos uma atividade xilanolítica nessa indução por BCA. Outras bandas mais fracas podem ser observadas acima de 75 kDa, não descartando a possibilidade de serem atividades xilanolíticas, porém a forma e quantidade que essas aparecem nessa região pode indicar que sejam artefatos da técnica utilizada.

4.7. Hidrólise do bagaço de cana de açúcar

CSD e BCA foram submetidos à sacarificação pelo coquetel enzimático produzido por L04 cultivado em meio contendo BCA. A figura 23 apresenta o perfil temporal da concentração de açúcares redutores e de glicose liberados pelo extrato enzimático. Após 18 horas de sacarificação, o extrato de L04 foi capaz de liberar 4,32 g.L⁻¹ de açúcares redutores totais a partir de BCA e 8,16 g.L⁻¹ a partir de CSD. O conteúdo de glicose também foi medido, apresentando valores de 2,28 g.L⁻¹ a partir de BCA e 4,48 g.L⁻¹ a partir de CSD após 18 horas de hidrólise do substrato. A quantidade de glicose liberada de CSD foi maior do que a de BCA, no entanto, em termos de rendimento após 18 horas de hidrólise, calculada a partir do conteúdo de celulose de BCA e CSD, os valores não foram muito diferentes. O rendimento da hidrólise ao utilizar BCA e CSD como substrato foi de 60,32% e 59,35% respectivamente.

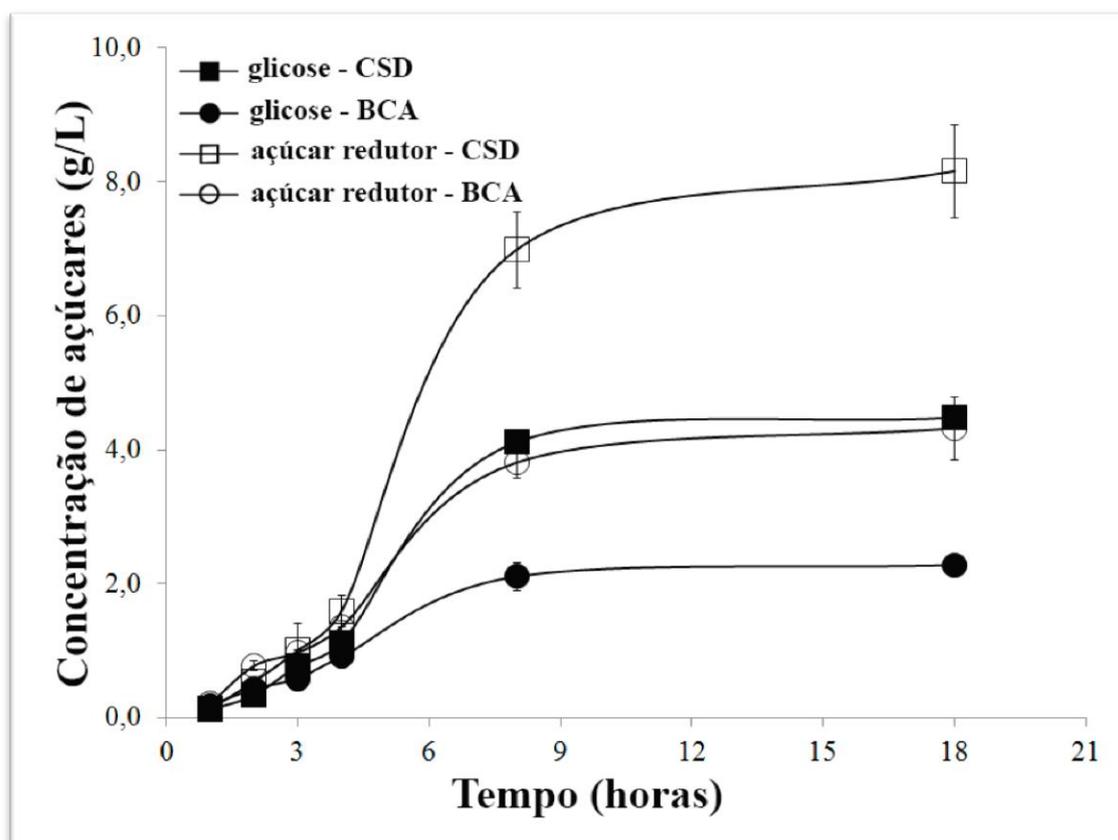


Figura 23. Hidrólise de 10% de bagaço de cana (BCA) e de celulignina semi-deslignificada (CSD) utilizando o coquetel de enzimas produzido por *T. harzianum* L04. As concentrações de açúcares redutores totais e de glicose durante a hidrólise estão indicadas.

4.8. Sensibilidade a higromicina

Com a possibilidade da utilização da linhagem L04 em processos biotecnológicos, um teste de sensibilidade a higromicina foi realizado. Os resultados desse teste estão apresentados na figura 24, onde podemos observar que a partir de $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do antibiótico o crescimento do fungo é completamente inibido.

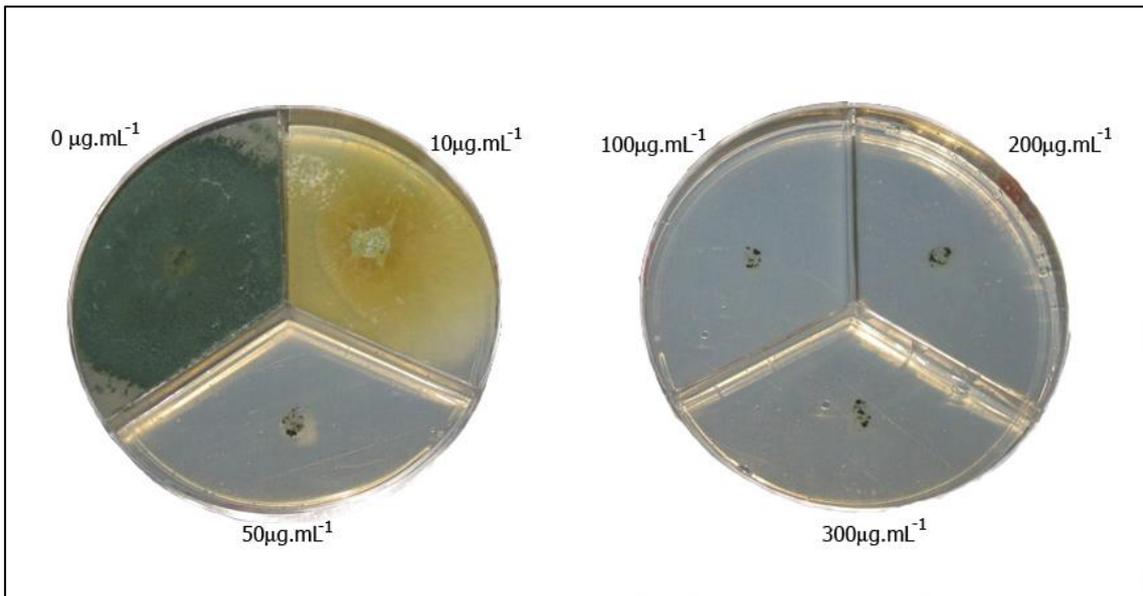


Figura 24. Teste de sensibilidade do fungo L04 à higromicina. As concentrações do antibiótico utilizadas estão indicadas em cada terço da placa de *petri* onde foram inoculados os esporos.

5. Discussão

A classificação ou identificação dos fungos ainda hoje é feita através da observação de características morfológicas observadas ao microscópio. Esse tipo de classificação é comumente usada pelo fato de ser simples, possuir baixo custo e fácil condução (Jeewon e Hyde, 2007), mas possui muitas limitações. Para superar essas limitações, outros métodos para a identificação de fungos foram descritos e aplicados como a RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), RFLP's (*restriction fragment length polymorphisms*) ou ARDRA (RFLP's usando o rDNA), e através de PCR utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos baseados em SSR (*species-specific repeat*). No entanto, essas técnicas muitas vezes falham por diferenciarem indivíduos ou isolados de uma mesma espécie (Schmidt e Moreth, 2002).

A classificação pelo sequenciamento da região ITS (espaçadores I, II e o gene do rRNA 5.8S) do DNA ribossomal (figura 4) se tornou então um método apropriado para a classificação por possuir uma sequência de 525 a 734 nucleotídeos onde a observação das variações se tornam evidentes (Schmidt e Moreth, 2002), além de poder ser sequenciado em uma única etapa.

O uso das sequências ITS para a identificação de uma espécie ainda possui algumas limitações, visto que a análise das sequências naturalmente envolve uma busca em bancos de dados (NCBI BLAST) e a identificação é feita com base no *best hit* ou no grau de similaridade da sequência (e.g., >98). Esse tipo de aproximação é suscetível a erros (Druzhinina *et al.*, 2005): o depósito das sequências no GenBank não possui controle de qualidade e podem ser depositadas sem uma correta identificação da

espécie; algumas sequências são depositadas com o nome originalmente obtido e mesmo com a posterior identificação as sequências não têm seus nomes corrigidos; uma alta correspondência (ou não) com uma dada sequência não pode confirmar e nem refutar a identidade da espécie, é necessário um melhor conhecimento da variabilidade intra-específica da sequência, levando em consideração a existência de polimorfismos (e.g., 1%) e a presença de posições onde os nucleotídeos são invariáveis.

Alguns grupos de pesquisadores com o intuito de investigar a classificação de gêneros de interesse, buscaram confirmar a identificação dos fungos através de análises morfológicas, de dados em culturas e pela filogenia de diferentes genes (calmodulina, EF-1 α , actina), assim como da região ITS do rDNA (Chaverri *et al.*, 2003). A partir desses dados puderam construir bancos de sequências confiáveis para a identificação de espécies. Nessas sequências confiáveis puderam também ser analisadas as posições de cada nucleotídeo de forma comparativa e desenvolver um sistema de identificação de espécies com base em pequenas sequências chamadas de âncoras onde se encontram os nucleotídeos que menos variam dentro de cada espécie, mas variam de espécie para espécie (código de barras). Alguns desses bancos encontram-se disponíveis na internet como, por exemplo, o *website* para identificação de *Trichodemias* pelo sistema de código de barras (<http://www.isth.info>) da subcomissão internacional em taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (Druzhinina *et al.*, 2005).

O método de identificação das linhagens isoladas nesse trabalho foi capaz de classificar os gêneros desses fungos, mas não foi eficiente para a classificação exata das espécies. Mesmo com a utilização de uma segunda região (rDNA 28S) para corroborar as análises filogenéticas da região ITS, não foi possível distinguir as sequências dos isolados das de outros fungos encontradas no banco de dados, havendo mais de uma

possibilidade provável para essa classificação. A presença de sequências no banco de dados sem classificação, denominadas como fungos de solo não cultivados, e/ou a presença de sequências não identificadas corretamente podem dificultar essa classificação molecular dos fungos. Por esse motivo, para a determinação mais correta dessas espécies seria necessária à utilização de várias regiões de genes diferentes para que a análise filogenética seja mais eficiente.

Dentre os isolados analisados os gêneros mais representativos foram *Trichoderma* (L04, L05, L07 e L10), *Penicillium* (L01, L03 e L11) e *Aspergillus* (L06 e L12). Esses gêneros são bem descritos na literatura como bons produtores de enzimas celulolíticas, destacando algumas espécies como o *Trichoderma reesei* (Singhania *et al.*, 2007), de onde a maioria das celulases comerciais são retiradas; o *Penicillium equinulatum* (Camassola e Dillon, 2007), que possui grande potencial celulolítico principalmente na degradação de resíduos agrícolas; e o *Aspergillus niger* (de Castro, 2006), descrito como forte secretor de enzimas celulolíticas, principalmente β -glicosidases.

Outros gêneros também foram encontrados como no caso do L08 e L09 classificados como *Pestalotiopsis* e *Curvularia* respectivamente. A maioria do gênero *Curvularia* é conhecida como saprófita em diferentes substratos vegetais e no solo, podendo ainda ser isolada a partir do solo e do ar, muitas espécies são fitopatogênicas, sobretudo em gramíneas e em regiões de clima tropical e subtropical (Sivanesan, 1987). Em alguns trabalhos com esse gênero a atividade celulolítica foi estudada mostrando que algumas espécies do gênero podem ser consideradas boas produtoras dessas enzimas (Okunowo *et al.*, 2010). Fungos do gênero *Pestalotiopsis* estão amplamente distribuídos, ocorrendo em solos, ramos, sementes, frutos e folhas podendo ser parasitas

endofíticos ou saprófitos (Jeewon *et al.*, 2004). Existem trabalhos descrevendo algumas espécies deste gênero como produtoras de celulasas (Rao *et al.*, 1983; Eveleigh *et al.*, 2009).

A observação das características fenotípicas e a classificação dos fungos isolados são de fundamental importância para o conhecimento prévio de possíveis potenciais biotecnológicos por meio de buscas bibliográficas sobre a utilização desses gêneros em outros trabalhos.

Algumas características interessantes puderam ser observadas durante o manejo das linhagens isoladas. A presença de pigmentos de forte coloração se destacou para algumas linhagens, inclusive com secreções abundantes, vermelha (L02 e L11), púrpura (L12) ou amarela (L01) dependendo da composição do meio de cultivo. Se mostrando interessante a investigação mais aprofundada sobre a natureza desses pigmentos para uma aplicação na indústria de cosméticos, por exemplo, visto que teriam um apelo ecológico como pigmentos naturais de origem em um ecossistema brasileiro (Cerrado).

A inibição do crescimento de outros fungos e bactérias também foi observada em algumas linhagens, quando na presença desses (dados não mostrados). Estudos nesse campo são importantes para a verificação de novos antimicrobianos ou ainda na utilização dessas linhagens como controle biológico de fitopatógenos. Trabalhos como esse abrem um leque de possibilidades para trabalhos futuros nas diversas áreas de estudo, demonstrando o grande potencial biotecnológico existente ainda por ser explorado nos biomas brasileiros.

Com o foco deste trabalho voltado para a produção de enzimas celulolíticas pelos isolados do Cerrado, as análises quantitativas das atividades celulolíticas secretadas das cinco linhagens pré-selecionadas revelaram um interessante potencial,

visto que alguns desses fungos tiveram atividades hidrolíticas superiores, nas condições de cultivo analisadas, às do *T. harzianum* IOC 3844 descrito na literatura como sendo um bom produtor de endoglucanases e do *P. funiculosum* que possui um forte complexo celulolítico capaz de hidrolisar compostos celulósicos naturais (de Castro, 2006).

Dentre os fungos pré-selecionados com potencial celulolítico, o isolado L04 apresentou características relevantes para a produção das celulases. Foi classificado como *Trichoderma*, sendo muito próximo ao *T. harzianum*, segundo as análises de filogenia das sequências ITS e rDNA 28S. A partir do banco de dados da *International Subcommittee on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*, foi possível a identificação da espécie pelo método do código de barras confirmando a linhagem como *Hypocrea lixii*, que é a fase sexual do fungo *Trichoderma harzianum*.

O *Trichoderma harzianum* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) é um fungo filamentosos, assexual, isolado comumente de solos tropicais, material vegetal, ecossistemas rizosféricos e material orgânico em decomposição, numa proporção de 10^1 - 10^3 esporos por grama de solo (Samuels, 2006). Na natureza, as formas assexuadas do fungo persistem como populações clonais e heterocarióticas, porém, o fungo tem sido inequivocamente relacionado à fase teleomorfa. Geralmente cultivos derivados de ascósporos do fungo sexual *Hypocrea lixii*, resultaram em espécies de *T. harzianum*, segundo análises morfológicas e moleculares feitas por Chaverri e colaboradores (2003) que concluiu que se tratava da mesma espécie. Os isolados de *Trichoderma harzianum* são ubíquos devido a sua natureza saprofítica e são encontrados em solos e matéria orgânica coletadas em todas as latitudes. As condições ótimas para o crescimento e esporulação, variam entre os isolados, mas a maioria são mesófilas, crescem num pH de

6,0 e os esporos permanecem viáveis por um período de 45 dias (Samuels, 2006; Papavizas, 1985).

O *T. harzianum* cresce rapidamente sobre diferentes substratos, utilizando monossacarídeos, dissacarídeos, e polissacarídeos complexos, assim como purinas, pirimidinas, aminoácidos, aldeídos, e ácidos orgânicos como fonte de carbono e energia e produzindo um amplo espectro de metabólitos que incluem antibióticos, antifúngicos, pigmentos, vitaminas, ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas (Grondona *et al.* 1997), ilustrando o grande potencial biotecnológico presente neste fungo.

A linhagem de *T. harzianum* L04 ao ser induzida por substratos lignocelulósicos apresentou atividades celulolíticas de endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases em níveis semelhantes ou maiores ao do *T. reesei* Rut C30 nas mesmas condições de cultivo. O *T. reesei* Rut C30 é uma linhagem industrial utilizada na produção comercial de celulasas com inúmeras publicações relacionadas a sua capacidade de secreção de celulasas induzidas por vários substratos, naturais ou não. Isso se deve ao fato de ser uma linhagem manipulada geneticamente para a hiper-expressão dessas enzimas (Montenecout e Eveleigh, 1977). Sendo assim, ser comparado a este fungo indica que a linhagem L04 pode ser considerada uma boa produtora de celulasas.

O perfil eletroforético de L04 utilizando o bagaço de cana de açúcar *in natura* (BCA) como substrato é similar ao observado por Silva *et al.* (2012) usando a linhagem T4 de *T. harzianum* em meio contendo bagaço de cana. Esses autores mostraram por diferentes técnicas eletroforéticas que o *T. harzianum* foi capaz de secretar complexos multi-enzimáticos com atividades celulolíticas e xilanolíticas que apresentam alta massa molecular assim como as detectadas no *T. harzianum* L04 (figura 2, linha 5). Ambos

zimogramas, usando CMC e XIL como substrato, apresentaram um sinal por volta de 20 kDa (figura 2, linhas 3 e 5). O sinal mais fraco no zimograma com xilana indica a presença de uma atividade xilanolítica com massa molecular de aproximadamente 20 kDa que é compatível com outros estudos dessa espécie de fungo que descrevem atividades xilanolíticas por volta dessa massa molecular com ausência de atividade celulolítica (Rezende *et al.* 2002; Lee *et al.* 2009; do Vale *et al.* 2012). A atividade do fungo L04, de massa molecular de 20 kDa, presente no zimograma contendo CMC pode ser correspondente à endoglicanase (EGIII) de *T. harzianum* IOC3844 caracterizada por Generoso *et al.* (2012) descrita com baixa massa molecular, não apresentando o domínio de ligação à celulose (CBD) e capaz de degradar celulose amorfa como CMC.

Observando o desenvolvimento das culturas, o fungo L04 apresentou um crescimento mais rápido que as outras linhagens, com secreção das enzimas celulolíticas desde os primeiros momentos da cultura em níveis só alcançados pelo *T. reesei* após alguns dias de cultivo. Essa característica, do ponto de vista biotecnológico, é bastante interessante tendo em vista que quanto menor o tempo de cultivo para a produção das enzimas menores serão os custos dessa produção. A redução de custos no processo de produção das enzimas é ainda hoje um dos pontos cruciais para que seja viabilizada a comercialização de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos.

A capacidade de utilização do bagaço de cana de açúcar *in natura* como substrato para a produção de enzimas é outro fato interessante, tendo em vista o baixo custo deste substrato subutilizado atualmente nas indústrias. Com a utilização do bagaço excedente da geração de energia elétrica pela sua queima, atendendo a demanda de energia da usina, há a possibilidade de aumentar a produção de etanol a partir desse

resíduo com a utilização de enzimas produzidas na própria usina para a sacarificação do bagaço de cana a açúcares fermentescíveis.

O tratamento do bagaço para uma possível indução de celulasas elevaria os custos da produção, sendo necessária uma maior quantidade de passos para a remoção de resíduos de sacarose e outros inibidores, tanto do crescimento do microrganismo quanto da expressão dos genes de celulasas, fatalmente gerados no processamento do bagaço. Sendo assim torna-se interessante a utilização de um fungo que possa ser cultivado em um substrato mais bruto com a indução eficiente de suas enzimas por esse mesmo substrato.

A indução de enzimas pelo próprio substrato a ser utilizado na sacarificação pode favorecer o processo pelo fato do fungo secretar enzimas que tenham efetiva ação sobre aquele substrato. Evitando assim que as enzimas utilizadas sejam muito suscetíveis à inibição causada por produtos da decomposição do substrato, fato comumente relatado durante a hidrólise do bagaço de cana de açúcar. Isso pode ser observado na figura: 16 onde a atividade de β -glicosidase foi quase que completamente inibida na maioria dos fungos analisados, com exceção do *T. harzianum* IOC 3844 utilizado como controle e da linhagem de *T. harzianum* estudada nesse trabalho (L04); na figura 15 onde até mesmo o *T. harzianum* IOC 3844 teve sua atividade inibida e o *P. funiculosum* juntamente com o L04 foram os únicos a apresentarem atividade; e na figura 10 onde o L04 foi praticamente o único a produzir enoglicanases utilizando BCA como fonte de carbono. Mesmo quando comparado a outra linhagem de *T. harzianum* já conhecida, o fungo L04 apresentou a vantagem de secretar as enzimas celulolíticas em tempos bem iniciais do cultivo. Os mesmos níveis de atividades foram alcançados pelo

T. harzianum controle apenas em tempos mais tardios da cultura, da mesma forma como foi observado quando comparado ao *T. reesei*.

6. Conclusões

Um dos fungos do Cerrado Brasileiro isolado nesse trabalho, identificado como *Trichoderma harzianum* L04, mostrou uma interessante habilidade na produção de significativa quantidade de celulase em um tempo curto de cultivo (a partir de 24h), quando em bagaço de cana de açúcar *in natura* (BCA). Esta linhagem de fungo filamentosos revelou um complexo celulolítico bem balanceado, apresentando uma rápida cinética de produção de endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases.

Em ensaios de sacarificação de BCA e CSD foi detectado rendimento de aproximadamente 60% de glicose após 18h hidrólise. Baseando-se nos resultados obtidos nesse trabalho é proposto que o fungo *T. harzianum* L04 seja considerado como um potencial candidato para a produção de celulases, principalmente utilizando o bagaço de cana de açúcar *in natura* como substrato para essa produção.

7. Perspectivas

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram o potencial da linhagem de *T. harzianum* L04 para a produção de enzimas relacionadas à degradação da lignocelulose. Esse foi o início dos estudos de uma linhagem selvagem isolada diretamente da natureza. Para uma melhor avaliação desse potencial, estudos de otimização das condições de cultivo deste fungo se fazem necessárias para que se obtenha uma produtividade máxima das enzimas em questão.

Outras análises relacionadas à caracterização das enzimas, individualmente, e estudos de regulação da expressão dos genes correspondentes também se fazem importantes para um melhor conhecimento desta linhagem. Há certa facilidade em se trabalhar com uma linhagem de um fungo já tão conhecido, inclusive com o genoma da linhagem *T. harzianum* CECT 2413 sequenciado (Vizcaíno *et al.*, 2006). Sendo interessante mostrar as diferenças existentes entre essa nova linhagem e as outras mais bem caracterizadas.

O conhecimento dos genes e das respectivas enzimas possibilita a sua utilização como heterólogos na melhoria genética de outras linhagens, ou dessa própria linhagem, já que suas deficiências seriam descobertas. A melhoria genética de linhagens de *T. harzianum*, inclusive de L04 encontra-se em andamento no laboratório de Biologia Molecular da UnB em um projeto onde vetores contendo genes responsáveis por enzimas celulolíticas foram introduzidos nessas linhagens visando aumentar ainda mais a capacidade de hidrólise dos seus complexos celulolíticos.

Uma importante análise a ser realizada é a utilização das enzimas produzidas na sacarificação de substratos lignocelulósicos, principalmente o bagaço de cana-de-

açúcar, para que seja avaliada a composição dos açúcares produzidos nesse processo e a viabilidade de se utilizar esse hidrolisado para a fermentação por *S. cerevisiae* a etanol.

8. Referências Bibliográficas

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403 - 410.
- Benoliel, B.; Poças-Fonseca, M.J.; Torres, F.A.G.; Moraes, L.M.P. (2010) Expression of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, p. 2036-2044.
- Berlin, A.; Balakshin, M.; Gilkes, N.; Kadla, J.; Maximenko, V.; Kubo, S.; Saddler, J. (2006) Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*, v. 125, p. 198–209.
- Blum, H; Beier, H; & Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-99.
- Bothast, R.J.; Saha, B.C. (1997) Ethanol production from agricultural biomass substrates. *Advances in Applied Microbiology*, v. 44, p. 261-286.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-54.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007) Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2196-2204.

- Castro, A.P.; Quirino, B.F.; Pappas-Jr, G.; Kurokawa, A.S.; Neto, E.L.; Krüger, R.H. (2008) Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture Wolds. *Archives of Microbiology*. v. 190, p. 129–139.
- Chaverri, P.; Castlebury, L.A.; Samuels, G.J.; Geiser, D.M. (2003) Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 27, p. 302–313.
- Chaverri, P.; Samuels, G. (2003) *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with Green Ascospores. *Mycologia*, v. 95, n. 6, p. 1100-1140.
- Das, M; Royer, T.V.; Leff, L.G. (2007) Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, p. 756–767.
- de Castro, A.M. (2006) *Produção e propriedades de cellulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (Saccharum spp.)*. 2006. 217 f. Tese de Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Brasil.
- de Castro, A.M.; Quirino, B.F.; Allen, H.; Williamson, L.L.; Handelsman, J.; Krüger, R.H. (2011) Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. *Biotechnology Letters*, published online: 12 July 2011. DOI 10.1007/s10529-011-0693-6
- de Castro, A.M.; Carvalho, M.L.A.; Leite, S.G.F.; Pereira Jr, N. (2010a) Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose

- hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 37, p. 151–158.
- de Castro, A.M.; Ferreira, M.C.; Cruz, J.C.; Pedro, K.C.N.R.; Carvalho, D. F.; Leite, S.G.F.; Pereira Jr, N. (2010b) High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. *Enzyme Research*, v. 2010, p.
- Demain, A.L. (2009) Biosolutions to the energy problem. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 36, n. 3, p. 319-32.
- Doran, J.W.; Zeiss, M.R. (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, v.15, p. 3–11.
- do Vale, L.H.F.; Gómez-Mendonza, D.P.; Kim, M.S.; Pandey, A.; Ricart, C.A.O.; Filho, E.X.F. Sousa, M. (2012) Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics*, v. 12, p. 2716 – 2728.
- Druzhinina, I.S.; Kopchinskiy, A.G.; Komón, M.; Bissett, J.; Szakacs, G.; Kubicek, C.P. (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 42, p. 813–828.
- Druzhinina, I.S.; Kopchinskiy, A.G.; Komón, M.; Bissett, J.; Szakacs, G.; Kubicek, C.P. (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 42, p. 813–828.
- Engelen, B.; Meinken, K.; von Wintzingerode, F.; Heuer, H.; Malkomes, H.P.; Backhaus, H. (1998) Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied Environmental Microbiology*, v. 64, p. 2814–2821.

- Eveleigh, D.E.; Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. (2009) Measurement of sccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, v. 2:21 doi:10.1186/1754-6834-2-21.
- Farrell, A.E.; Plevin, R.J.; Turner, B.T.; Jones, A.D.; O'Hare, M.; Kammen, D.M. (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, v. 311, n. 5760, p. 506–508.
- Frazzetto, G. (2003) White biotechnology. *EMBO Reports*, v. 4, n. 9, p. 835-837.
- Generoso, W.C.; Malago-Jr, W.; Pereira Jr, N. Henrique-Silva, F. (2012) Recombinant expression and characterization of an endoglucanase III (cel12a) from *Trichoderma harzianum* (Hypocreaceae) in the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, p. 1544 – 1557.
- Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268.
- Goldemberg, J. (2007) Ethanol for a sustainable energy future. *Science*, v. 315, n. 5813, p. 808-10.
- Gowen, C.M.; Fong, S.S. (2010) Exploring Biodiversity for Cellulosic Biofuel Production. *Chemistry & Biodiversity*, v. 7, p. 1086-1097.
- Gray, K.A.; Zhao, L.; Emptage, M. (2006) Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, n. 2, p. 141-146.
- Grondona, I.; Hermosa, R.; Tejada, M.; Gomis, M.; Mateos, P.; Bridge, P.; Monte, E.;

- Garcia-Acha, I. (1997) Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent Against Soilborne Fungal Plant Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 8, p. 3189-3198.
- Gueguen, Y.; Chemardin, P.; Arnaud, A.; Galzy, P. (1995) Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 78, p. 900-906.
- Guimarães, L.H.S.; Peixoto-Nogueira, S.C.; Michelin, M.; Rizzatti, A.C.S.; Sandrim, V.C.; Zanoelo, F.F.; Aquino, A.C.M.M.; Junior, A.B.; Polizeli, M.L.T.M. (2006) Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 474-480.
- Gusakov, A.V. (2011) Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, v. 29, p. 419-425.
- Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Lidén, G.; Zacchi, G. (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today *TRENDS in Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 549-556.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95–98.
- Hawksworth, D.L. (1991) The fungal dimensioned biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycology Research*, v. 95, p. 641–655.
- Hawksworth, D.L.; Rossman, Y.A. (1997) Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, v. 87, p. 888–891.

- Howarth, R.W. & Bringezu, S. (2008) Environment consequences & implications of changing land use. Proceedings of the Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE) International Biofuels Project Assessment 22-25 September 2008, Gummersbach, Germany. Cornell University, Ithaca, NY, EUA.
- Ilmén, M.; Saloheimo, A.; Onnela, M.L.; Penttilä, M.E. (1997) Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 1298-1306.
- Jeewon, R.; Hyde, K.D. (2007) Detection and Diversity of Fungi from Environmental Samples: Traditional Versus Molecular Approaches. In: Varma, A.; Oelmüller, R. (Eds.) *Soil Biology: Advanced Techniques in Soil Microbiology*, volume 11 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Jeewon, R.; Liew, E.C.Y.; Hyde K.D. (2004) Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* In relation to host association. *Fungal Diversity*, n. 17, p. 39-55.
- Jeffries, T.W. (1990) Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*, v. 1, p. 163-176.
- Josen, K.; Jacobsen, C.S.; Torsvik, V. (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—a review. *Biology & Fertility Soils*, v. 33, p. 443–453.
- Kerr, R.A.; Service, R.F. (2005) What can replace cheap oil - and when? *Science*, v. 309, p. 101.
- Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass:

- biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 377–391.
- Larsson, S.; Palmqvist, E.; Hahn-hägerdal, B.; Tengborg, C.; Stenberg, K.; Zacchi, G.; Nilvebrant, N.-O. (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 151–159.
- Le Crom, S.; Schackwitz, W.; Pennacchio, L.; Magnuson, J.K.; Culley, D.E.; Collette, J.R.; Martin, J.; Druzhinina, I.S.; Mathis, H.; Monot, F.; Seiboth, B.; Cherry, B.; Rey, M.; Berka, R.; Kubicek, C.P.; Baker, S.E.; Margeot, A. (2009) Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, p. 16151–16156.
- Lee, J.M.; Shin, J.W.; Nam, J.K.; Choi, J.Y.; Han, I.S.; Nam, S.W.; Choi, Y.J.; Chung, D.K. (2009) Molecular Cloning and Expression of the *Trichoderma harzianum* C4 Endo- β -1,4-Xylanase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 823 – 828.
- Leite, R.S.R.; Alves-Prado, H.F.; Cabral, H.; Pagnocca, F.C.; Gomesa, E.; Da-Silva, R. (2008) Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 391–395.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; van Zyl, W.H.; Pretorius I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sept.: 506 – 577.

- Maeda, R.N.; Serpa, V.I.; Rocha, V.A.L.; Mesquita, R.A.A.; Anna, L.M.M.S.; Castro, A.M.; Driemeier, C.E.; Pereira Jr, N.; Polikarpov, I. (2011) Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1196 – 1201.
- Manoharachary C.; Sridhar, K.; Singh, R.; Adholeya, A.; Suryanarayanan, T.S.; Rawat, S.; Johri, B.N. (2005) Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India. *Current Science*, v. 89, p. 58-71.
- Marris E (2005) The forgotten ecosystem. *Nature* 437:944–945.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428.
- Mishima, D.; Tateda, M.; Ike, M.; Fujita, M. (2006) Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 16, p. 2166–2172.
- Montenecout, B.S.; Eveleigh, D.E. (1977) Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 34, n. 6, p. 777-782.
- Nilsson, R.H.; Larsson, K.H.; Ursing, B.M. (2004) Galaxie - CGI scripts for sequence identification through automated phylogenetic analysis. *Bioinformatics*, v. 20, p. 1447-1452.
- O'Donnell, A.G.; Goodfellow, M.; Hawksworth, D.L. (1994) Theoretical practical

- aspects of the quantification of biodiversity among microorganism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 345, p.65–73.
- Ohtonen, R.; Aikio, S.; Väre, H. (1997) Ecological Theories in Soil Biology. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 29, p. 1613–1619.
- Okunowo, W.O.; Gbenle, G.O.; Osuntoki, A.A.; Adekunle, A.A.; Ojokuku, S.A. (2010) Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 7, p. 1074-1078.
- Papavizas, G. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. *Annual Reviews Phytopathology*, v. 23, p. 23-54.
- Peterson, R.; Nevalainen, H. (2012) *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. *Microbiology*, v. 158, p. 58-68.
- Poças-Fonseca, M.J.; Silva-Pereira, I.; Benoliel, B.; Azevedo, M.O. (2000) Substrate-dependent differential expression of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 46, p. 749-752.
- Rao, M.N.A.; Mithal, B.M.; Thakur, R.N.; Sastry, K.S.M. (1983) Productions of cellulase from *Pestalotiopsis versicolor*. *Biotechnology and bioengineering*, v. 25, p. 2395-2398.
- Ratter, J.A.; Ribeiro, J.F.; BridGeWater, S. (1997) The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, v. 80, p. 223–230.
- Rezende, M.I.; Barbosa, A.M.; Vasconcelos, A.F.D.; Endo, A.S. (2002) Xylanase

- production by *Trichoderma harzianum rifai* by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 67 – 72.
- Riou, C.; Salmon, J.M.; Vallier, M.J.; Günata, Z.; Barre, P. (1998) Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3607-3614.
- Roeder, V.; Broda, P. (1987) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters Applied Microbiology*, v. 1, p. 17-20.
- Ruegger, M.J.S.; Tauk-Tornisielo, S.M. (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 2, p. 205-211.
- Ruth, L. (2008) Bio or bust? The economic and ecological cost of biofuels. *EMBO Reports*, v. 9, n. 2, p. 130–133.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 3rdEdition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuels, J.G. (2006) *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State and Ecology. *Phytopathology*, v. 96, n. 2, p. 195-206.
- Schmidt, O.; Moreth, U. (2002) Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. *Wood Science and Technology*, v. 36, p. 429-433.
- Schubert C. (2006) Can biofuels finally take center stage? *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 7, p. 777-784.
- Service, R.F. (2007) Biofuel Researchers Prepare To Reap a New Harvest. *Science*, v.

315, p. 808.

Silva, A.J.; Gómez-Mendonza, D.P.; Junqueira, M.; Domoni, G.B.; Ximenes-Filho, E.; Sousa, M.V.; Ricart, C.A.O. (2012) Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. *Proteomics*, v. 12, p. 2729-2738.

Silva-Pereira, I. (2003) Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*, Cap. XII. Editora UnB, Brasília, 175-186.

Singhania, R.R.; Sukumaran, R.K.; Pandey, A. (2007) Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 142, n. 1, p. 60-70.

Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*, v. 158, p. 1-261.

Smit E.; LeeXang P.; Glandorf B.; van Elsas J.D.; Wernars K. (1999) Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, p. 2614–2621.

Spínola C.M.; Bechara F.C.; Barretto K.D. (2007) Uso de Sensoriamento Remoto na Identificação de Fitofisionomias do Cerrado Lato Sensu. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 378-380.

Stryer, L. (1996) *Bioquímica*. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Sukumaran, R.K.; Singhania, R.R.; Mathew, G.M.; Pandey, A. (2009) Cellulase

- production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, n. 2, p. 421-424.
- Sun, J.X.; Sun, X.F.; Sun, R.C.; Sun, Y.Q. (2004) Fractional extraction and structural characterization of sugarcane hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, n. 2, p. 195-204.
- Szengyel, Z. *Ethanol from wood: Cellulase enzyme production*. (2000) 61 f. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia.
- Szijártó, N.; Szengyel, Z.; Lidén, G.; Réczey, K. (2004) Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 113, p. 115-124.
- Taherzadeh, M.J.; Karimi, K. (2007) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources* v. 2, p. 707–738.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, n. 8, p. 1596-1599.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.

22, p. 4673–4680.

Vasconcelos, A.M.H.; Valle, A.B.F.; Tenan, M.N. (2002) *Cursos práticos em Bioquímica*. 11^a. Edição. Rio de Janeiro, Brasil.

Vásquez, M.P. *et al.* (2005) Efecto de diferentes métodos de deslignificación sobre la hidrólise enzimática de celulignina. In: SYMPOSIUM ON ENZYMATIC HYDROLISIS OF BIOMASS, 2005, Maringá. *Anais do VIII Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Biomass*. Maringá, Brasil,

Vizcaíno, J.A.; González, F.J.; Suárez, M.B.; Redondo, J.; Heinrich, J.; Delgado-Jarana, J.; Hermosa, R.; Gutiérrez, S.; Monte, E.; Llobell, A.; Rey, M. (2006) Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BioMed Central Genomics*, v. 7, n 193.

Weber, C.; Farwick, A.; Benisch, F.; Brat, D.; Dietz, H.; Subtil, T.; Boles, E. (2010) Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 87, p. 1303–1315.

Wertz, S.; Degrange, V.; Prosser, J.; Poly, F.; Commeaux, C.; Freitag, T.; Guillaumaud, N.; Le Roux, X. (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology*, v. 8, p. 2162–2169.

Wertz, S.; Degrange, V.; Prosser, J.; Poly, F.; Commeaux, C.; Guillaumaud, N.; Le Roux, X. (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology*, v. 9, p. 2211–2219.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing

of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. pp 315 – 322. Academic Press, New York, USA.

Woodward, J.; Wiseman, A. (1982) Fungal and other β -glucosidases - their properties and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 4, p. 73-79.

Yu, H.; Zeng, G. Huang, H.; Xi, X.; Wang, R.; Huang, D.; Huang, G.; Li, J. (2007) Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation*, v. 18, p. 793–802.

Zhang, Y.-H.P.; Lynd, L.R. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, p. 797-824.

Zhou, S.; Ingram, L.O. (2000) Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 5676–5682.

9. Anexos

Benoiel et al. *SpringerPlus* 2013, **2**:656
<http://www.springerplus.com/content/2/1/656>

 SpringerPlus
a SpringerOpen Journal

RESEARCH

Open Access

A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura

Bruno Benoiel¹, Fernando Araripe Gonçalves Torres¹ and Lidia Maria Pepe de Moraes^{1,2*}

Abstract

Brazil is a major producer of agro-industrial residues, such as sugarcane bagasse, which could be used as raw material for microbial production of cellulases as an important strategy for the development of sustainable processes of second generation ethanol production. For this purpose, this work aimed at screening for glycosyl hydrolase activities of fungal strains isolated from the Brazilian Cerrado. Among 13 isolates, a *Trichoderma harzianum* strain (L04) was identified as a promising candidate for cellulase production when cultured on *in natura* sugarcane bagasse. Strain L04 revealed a well-balanced cellulolytic complex, presenting fast kinetic production of endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases, achieving 4,022, U.L⁻¹ (72 h), 1,228 U.L⁻¹ (120 h) and 1,968 U.L⁻¹ (48 h) as the highest activities, respectively. About 60% glucose yields were obtained from sugarcane bagasse after 18 hours hydrolysis. This new strain represents a potential candidate for on-site enzyme production using sugarcane bagasse as carbon source.

Keywords: Sugarcane bagasse; Cellulases; *Trichoderma harzianum*; Brazilian Cerrado

Introduction

Lignocellulosic residues derived from different agro-industrial activities represent a massive source of raw material for the production of fuels, chemical feedstock, foods and livestock feeds (Kumar et al. 2008). Brazil is a major producer of renewable feedstock including sugarcane which is essentially used for sugar and fuel ethanol production. In 2010, sugarcane production reached ~717.5 million tons (FAOSTAT 2012). A significant fraction of this biomass goes to industries for steam and electricity generation. The remaining fraction represents the ideal feedstock for the generation of high-value commodities as second-generation ethanol (Canilha et al. 2012).

The use of lignocellulosic biomass for the production of second generation ethanol requires a pretreatment for the liberation of carbohydrate polymers. A number of different strategies have been envisioned to convert the polysaccharides into fermentable sugars. One of them is

accomplished by weak acid (chloridric or sulfuric acid) treatment (Betancur and Pereira Jr. 2010) to hydrolyze the hemicellulose fraction. The resulting solid fraction is then depolymerized by a chemical or enzymatic treatment. The later involves the use of different classes of hydrolytic enzymes generally produced by filamentous fungi. The conversion of cellulose to glucose involves the concerted action of three classes of enzymes: endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4), exo-cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91), and β -glucosidases (β -D-glucosidic glucosylhydrolases, EC 3.2.1.21). Hydrolytic enzymes represent a considerable cost in industrial biofuel plants. On-site enzyme production has been proposed as a way of lightening this burden. A fraction of lignocellulosic material partially hydrolyzed is diverted from the process and used as a cheap carbon source for enzyme production. Consequent reductions in enzyme storage time and downstream processing can thus lower the overall costs (Himmel et al. 1999; Tolan 2002).

The capacity of a particular microorganism to grow in lignocellulosic substrates is directly related to the production of a broad spectrum of enzymes that act synergistically to deconstruct the plant cell wall by depolymerization of substrates of different complexities (Andreas et al. 2008;

* Correspondence: lmoraes@unb.br

¹Centro de Biotecnologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil
²Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil



© 2013 Benoiel et al.; licensee Springer. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kumar et al. 2008; Siqueira et al. 2010; Moreira et al. 2012). An assorted library of cellulolytic microbes should facilitate the development of optimal enzyme cocktails specific for locally available lignocellulosic biomass, such as sugarcane bagasse.

The Cerrado is the main savanna-like region in the Americas covering about 2 million km². Although considered an important biodiversity hotspot (Myers et al. 2000) its microbial diversity has not been thoroughly assessed for biotechnological purposes. Our group has previously isolated an xylanase producing yeast from de Brazilian Cerrado (Parachin et al. 2009). The objective of this work was to evaluate the production of cellulases by a set of filamentous fungi isolated from the Brazilian Cerrado aiming their use as a potential source for on-site enzyme production.

Materials and methods

Microorganisms and fungal isolation

Trichoderma reesei Rut-C30 (ATCC 56765) (Montenecout and Eveleigh 1977) was used as reference strain. Decaying leaf litter encountered in the Cerrado's soil from different areas around the city of Brasília was used as a source for fungal isolation. Collected samples were immersed in sterile distilled water and after vigorous agitation the suspension was subjected to serial dilutions and plated in a medium similar to the basic nutrient medium of Mandels and Weber (1969), with the exception that urea was omitted, a double amount of (NH₄)₂SO₄ was included, and the peptone content was elevated by 20% (Szijártó et al. 2004), supplied with 1% carboxymethyl cellulose. Plates with standard inoculum of 10³ spores were incubated for 5 days at 30°C following Congo red staining (Ruegger and Tauk-Tornisielo 2004). Positive cellulolytic colonies were picked up and subcultured on potato dextrose agar (PDA - 0.4% potato, 2% dextrose, 0.5% peptone, 2% agar) slants and grown at 30°C for 10 days.

Submerged fermentations were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks. Total of 10⁶ spores were inoculated into 100 mL of modified basic nutrient Mandels and Weber medium (Szijártó et al. 2004) supplied with 10 g L⁻¹ of different carbon sources. The cultures were incubated on a rotary shaker with an agitation rate of 200 rpm at 30°C for up to 120 hours. Throughout the cultivation, aliquots were withdrawn, centrifuged at 20,000 g for 5 min for cell and residual substrate analysis. Supernatants were stored at -20°C until the enzyme assays were carried out. Three biological replicates were performed for each condition.

Enzyme and protein assays

Total cellulase, endoglucanase, and exoglucanase activities were determined using Whatman no. 1 filter paper (FPA), carboxymethyl cellulose (CMC, low viscosity), and

microcrystalline cellulose (SIG) as substrates, respectively, according to standard conditions described by Ghose (1987). Reducing sugars, expressed as glucose liberated during reactions on FPA, CMC and SIG were quantified by the DNS method (Miller 1959). Endoxylanase activities were determined using xylan from oat spelts (XYL) as substrate according to Bailey et al. (1992). For all reactions one enzyme unit (U) was defined as the amount of biocatalyst that releases 1 μmol of the correspondent monosaccharide (xylose for xylanase and glucose for the other groups of enzymes) per minute under the assay conditions (30 min incubation at 50°C with 50 mM acetate buffer pH 5.0). β-Glucosidase activity was assayed in a 100 μL reaction mixture containing 3 mM p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNPG; Sigma, St. Louis, USA), 50 mM acetate buffer (pH 5.0), and an appropriate dilution of enzyme preparation. After 10 min incubation at 50°C, the reaction was stopped by adding 200 μL of 1 M Na₂CO₃, and p-nitrophenol (pNP) release was monitored at A_{405nm}. Enzyme unit was defined as the amount of biocatalyst that releases 1 μmol p-nitrophenol per minute under the assay conditions. Total extracellular protein content was measured using the Bio-Rad protein reagent according to the Bradford method (Bradford 1976) using bovine serum albumin (Sigma) as standard. All analyses were done in triplicate in a temperature-controlled incubator.

Sugarcane bagasse hydrolysis

In natura sugarcane bagasse (SCB), used as substrate in the hydrolysis assays, was provided by Costa Pinto Mill (Piracicaba, SP, Brazil). This biomass was also subjected to pretreatments to generate partially delignified cellulignin (PDC). Acid and alkali pretreatments were carried out to increase the cellulose content in the materials by removing the hemicellulose fraction and partially removing the lignin fraction, respectively. The acid pretreatment consisted of incubating the solid material with a 3% (v/v) sulfuric acid solution (solid:liquid ratio of 1:4), while the alkali pretreatment was performed by incubating the material with a NaOH 4% (w/v) solution (solid:liquid ratio of 1:20). Both pretreatments were carried out at 121°C (1 atm) for 20 min.

Enzymatic hydrolysis was carried out using 1.0% partially delignified cellulignin (PDC) or *in natura* sugarcane bagasse (SCB) using a SCB-induced (72 h) culture supernatant. Suspensions were incubated at 50°C in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0) for 18 h with regular sampling. Glucose concentration was determined using a kit based on the glucose oxidase assay (Katal®) and total reducing sugar content was determined according to the method described by Miller (1959). The hydrolysis yield was determined using equation described by Maeda et al. (2011) from the carbohydrate contents of SCB and PDC previously determined by Castro et al. (2010a).

Gel electrophoresis and zymogram analysis

SDS-PAGE analysis was performed to detect extracellular proteins. For visualization of carboxymethyl-cellulase and xylanase activities on gels a zymogram was performed according to Sun et al. (2008) with modifications. Briefly, proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gel with either 0.15% CMC (low viscosity sodium salt) or 0.15% XYL (xylan from birch wood). The gel was washed twice in a solution of 0.5 M sodium acetate and 25% isopropanol at room temperature to remove SDS. Proteins were renatured in 50 mM acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM β -mercaptoethanol by stirring the gel overnight at 4°C. The gel was then incubated in 50 mM acetate buffer (pH 5.0) at room temperature for 2 h followed by incubation at 50°C for another 2 h. The gel was stained in 0.2% Congo red for 1 h and destained with 1 M NaCl.

Molecular identification

Standard protocols were followed for DNA manipulations (Sambrook and Russel 2001). Total fungal DNA was obtained from a mycelium grown on PDA as described by Roeder and Broda (1987). Ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region was amplified from genomic DNA by PCR using primers ITS1 (5'-GCGGATCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (5'-GCGGATCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al. 1990). Double-stranded DNA sequencing was performed with the MegaBACE® Dye Terminator kit (GE Healthcare). Computer sequence analysis was carried out using the Phrap and Phred programs (Ewing et al. 1998).

Fungal isolates were identified via ITS sequence analysis using BLASTn search tools (www.ncbi.nlm.nih.gov). For taxonomic considerations, the obtained sequences were also used to include related species into phylogenetic trees. Sequence alignment was carried out using CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Phylogenetic analysis was performed using MEGA v 4.0 software (Tamura et al. 2007). Bootstrap resampling analysis for 1000 replicates was performed to estimate the confidence of results. The DNA BarCode method for *Trichoderma* identification was carried out using the *Tricho*KEY v. 2 program (Druzhinina et al. 2005).

Results

In a screening for cellulolytic activity a total of 13 isolates (L01-L13) from decaying leaf litter were selected after growth on cellulose as sole carbon source. Sequence analysis of PCR-amplified fungal ITS revealed a wide diversity of fungal taxa representing five genera: *Trichoderma* (5), *Penicillium* (4), *Aspergillus* (2), *Pestalotiopsis* (1) and *Curvularia* (1). All thirteen isolates demonstrated the ability to grow on cellulose as sole carbon source, but only four (L04, L08, L10, L11) showed a significant CMC hydrolysis halo when submitted to a rapid screening for

cellulolytic activity on Congo red plate assay. The L04 isolate presented the fastest growth occupying all 9 cm diameter plate area in about 3 days while L10 took 4 days. Isolates L08 and L11 presented slower growth on CMC medium although the best colony/halo ratios, 0.72 and 0.63, respectively. No significant growth and/or activity hydrolysis halo on cellulosic substrate were observed in the other strain plates, therefore L04, L08, L10 and L11 isolates were selected for further studies.

To evaluate the cellulolytic productivity of the four selected isolates, submerged fermentation using CMC as sole carbon source was carried out for up to 120 hours. Every 24 hours, samples were withdrawn and assayed for cellulase activity. All analyzed isolates showed similar exoglucanase productivity when CMC was used as carbon source; the highest values observed were all around 1,200 U.L⁻¹ in a culture time of 72 hours. L04 excelled at the endoglucanase productivity when compared to the others analyzed fungi, reaching the value of 2,206 U.L⁻¹ (72 h). It represents about 6 times the production of L08, L10 and L11 at the same point of the growth curve. The production of β -glucosidase was also analyzed. The maximum activity detected for L04 was 2,938 U.L⁻¹ (120 h), although at 96 hours of culture 2,350 U.L⁻¹ has been achieved.

To evaluate the cellulolytic production ability of the selected strain in a complex substrate, SCB was used as carbon source in a submerged fermentation. Strain L04 demonstrated to be more efficient than the others analyzed strains when grown on SCB. The L04 maximum activities for endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase when grown on this substrate were 4,022 U.L⁻¹ (72 h), 1,228 U.L⁻¹ (120 h) and 1,968 U.L⁻¹ (48 h), respectively. SCB seemed as a poor cellulase inducer for the other analyzed strains. No activities or very low endoglucanase and β -glucosidase activities were detected in the supernatant from L08, L10 and L11, and the maximum exoglucanase activity detected reached half of the values obtained by L04 on this substrate.

In terms of volumetric productivity, strain L04 reached the maximum values as early as 24 hours for β -glucosidase (52.0 U.L⁻¹.h⁻¹) and 48 hours for endoglucanase (64.2 U.L⁻¹.h⁻¹) when SCB was used as inducer (Table 1). When *T. reesei* Rut C30 was grown on SCB as carbon source, it presented maximum volumetric productivity values for endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase of 38.6 U.L⁻¹.h⁻¹ (72 h), 14.2 U.L⁻¹.h⁻¹ (24 h) and 29.3 U.L⁻¹.h⁻¹ (48 h), respectively. The *T. reesei* Rut C30 maximum detected activities for endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase when grown on this substrate were 3,795 U.L⁻¹ (192 h), 567 U.L⁻¹ (120 h) and 1,979 U.L⁻¹ (192 h), respectively. Strain L04 was identified as *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) by phylogenetic analysis of its ITS1/2 regions and was selected for further analysis.

Table 1 Maximum values of volumetric productivity observed for cellulases production by Cerrado isolates

Strain	Substrate	Endoglucanase	Exoglucanase	β -glucosidase
L04	CMC	30.6 \pm 1.2 (72)	25.9 \pm 2.0 (24)	24.5 \pm 1.0 (96)
	SCB	64.2 \pm 6.4 (48)	10.2 \pm 1.2 (120)	52.0 \pm 0.4 (24)
L08	CMC	20.2 \pm 1.2 (24)	24.9 \pm 1.5 (48)	ND
	SCB	ND	6.3 \pm 0.3 (96)	ND
L10	CMC	8.8 \pm 0.3 (24)	30.9 \pm 1.2 (24)	ND
	SCB	2.9 \pm 0.1 (48)	36.8 \pm 1.4 (24)	ND
L11	CMC	10.6 \pm 0.7 (24)	25.2 \pm 1.7 (48)	4.5 \pm 0.2 (48)
	SCB	ND	12.2 \pm 0.5 (24)	ND

Volumetric productivity (U. L⁻¹ .h⁻¹). Values in parentheses correspond to time of fermentation (h) when maximum results were observed. Not detected activity (ND).

The L04 enzymatic profile produced on SCB presented more xylanase, endoglucanase and β -glucosidase activities, even when grown on specific substrates (Table 2). However, partially delignified cellulignin (PDC) showed to be a poor inducer of L04 cellulolytic system (data not shown).

PDC and SCB were subjected to enzymatic saccharification using the enzymatic cocktail produced by L04 grown on SCB. The enzyme/biomass loading ratio at this assay was equivalent to 5.0 FPU/g substrate. Figure 1 presents the temporal profile of the concentration of reducing sugars and glucose released by enzyme extract. After 18 h of saccharification, the L04 extract was able to release 4.32 g.L⁻¹ of total reducing sugars from SCB and 8.16 g.L⁻¹ from PDC. Glucose contents were also measured presenting values of 2.28 g.L⁻¹ from SCB and 4.48 g.L⁻¹ from PDC after 18 h of substrate hydrolysis. The released glucose concentrations were higher for PDC than SCB, however, in terms of glucose yield after 18 h of hydrolysis, calculated from the cellulose contents of SCB and PDC, the values were not different. The hydrolysis yield determined using SCB and PDC were 60.32% and 59.35%, respectively.

To detect cellulolytic and xylanolytic activities in L04 enzymatic cocktail used in the saccharification assay, electrophoretic analysis on SDS-PAGE and zymographic assays was also performed. The L04 protein profile presented two distinct molecular mass cellulolytic

activities, ~50 kDa and 20 kDa (Figure 2, lane 3). Xylanolytic activities were also detected as a defined 20 kDa band and multiple activities over 75 kDa (Figure 2, lane 5).

Discussion

In nature, the breakdown of plant materials is done primarily by fungi. In its natural environment saprophytic fungi can colonize the leaf litter and woody debris in humus or associated with plant matter in the soil. In order to grow on these complex substrates the ability to produce a broad spectrum of protein and polysaccharide hydrolyzing enzymes is required. For this reason, samples were collected from the Brazilian Cerrado environment and the fungi biodiversity analysed.

The wide diversity of fungal taxa found on Cerrado samples and the predominance of *Trichoderma* and *Penicillium* genera were expected, since the technique employed favors the isolation of the most common and abundant fungi (often referred as "generalists") (Jeewon and Hyde 2007). The saprophytic condition of the Cerrado's isolates reinforces their ability to use lignocellulose as carbon source, however not all of the isolated fungi were able to secrete significant amounts of cellulase activities for biotechnological use.

The strain L04 identified as *Trichoderma harzianum*, when grown on SCB presented the best ratios of cellulase production among all analyzed strains including *T. reesei* Rut C30. *T. harzianum* are frequently reported as control agent against fungal pathogens (Arantes and Saddler 2010; Banerjee et al. 2010). However, recent studies have also revealed the potential of this fungus for cellulase production and industrial applications (Ahmed et al. 2009; Castro et al. 2010a, 2010b). Likewise, *T. harzianum* has also become a promising system for xylanase production under appropriate conditions (Franco et al. 2004).

Castro et al. (2010b) had previously shown that *T. harzianum* IOC3844 exhibited an expressive production of endoglucanase activity with a fast kinetics with the exponential production phase detected between 31 and 72 hours of fermentation after a short lag phase. In this work, under the same assay conditions, strain L04 showed a shorter lag phase with an earlier exponential production phase starting before 24 hours when grown on SCB. Our results have shown that, unlike the other fungi

Table 2 Maximum values of volumetric productivity observed for production of cellulases by *T. harzianum* L04 strain grown on different carbon sources

Substrate	Endoglucanase	Exoglucanase	Total cellulase	β -glucosidase	Xylanase
SCB	64.2 \pm 6.4 (48)	10.2 \pm 1.2 (120)	15.4 \pm 0.2 (48)	52.0 \pm 0.4 (24)	135.7 \pm 1.7 (48)
CMC	30.6 \pm 1.2 (72)	25.9 \pm 2.0 (24)	3.8 \pm 0.3 (24)	24.5 \pm 1.0 (96)	44.5 \pm 3.1 (48)
SIG	37.2 \pm 1.6 (96)	3.1 \pm 0.1 (24)	9.8 \pm 0.6 (96)	40.4 \pm 3.4 (48)	105.8 \pm 5.3 (24)
XIL	19.0 \pm 0.9 (24)	9.5 \pm 0.6 (24)	3.8 \pm 0.4 (48)	4.5 \pm 0.3 (96)	132.5 \pm 6.1 (24)

Volumetric Productivity (U. L⁻¹ .h⁻¹). Values in parentheses correspond to time of fermentation (h) when maximum results were observed.

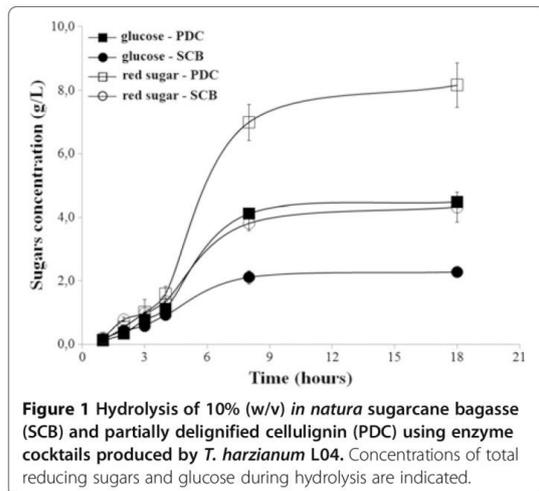


Figure 1 Hydrolysis of 10% (w/v) *in natura* sugarcane bagasse (SCB) and partially delignified cellulignin (PDC) using enzyme cocktails produced by *T. harzianum* L04. Concentrations of total reducing sugars and glucose during hydrolysis are indicated.

analyzed in this work, L04 showed a shorter acclimation period when cultivated in a complex substrate such as SCB. This observation is particularly interesting when compared to *T. reesei* Rut C30, a widely used filamentous fungus strain used for the production of cellulolytic enzymes (Peterson and Nevalainen 2012). *T. reesei* Rut C30 shows a longer acclimation to lignocellulosic feedstock

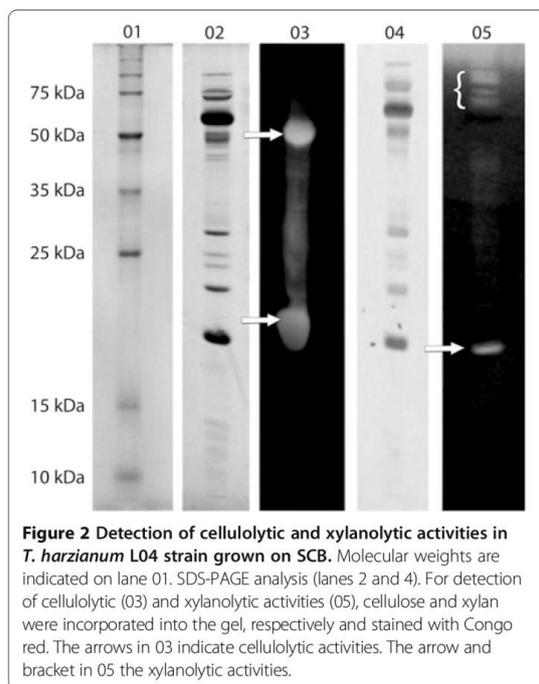


Figure 2 Detection of cellulolytic and xylanolytic activities in *T. harzianum* L04 strain grown on SCB. Molecular weights are indicated on lane 01. SDS-PAGE analysis (lanes 2 and 4). For detection of cellulolytic (03) and xylanolytic activities (05), cellulose and xylan were incorporated into the gel, respectively and stained with Congo red. The arrows in 03 indicate cellulolytic activities. The arrow and bracket in 05 the xylanolytic activities.

and is known to have a better performance for cellulase production when grown on pure cellulosic substrates than on lignocellulosic ones (Juhász et al. 2005), data confirmed by Castro et al. (2010c) where maximum values of volumetric productivity for *T. reesei* Rut C30 were obtained at 333 hours culture.

Strain L04 produced more xylanase, endoglucanase and β -glucosidase activities on different substrates irrespective of the carbon source (Table 2). The best results were obtained when L04 was grown on SCB. Partially delignified cellulignin (PDC) showed to be a poor inducer of L04 cellulases with delayed enzymatic production, contrary to expectations where delignification can improve enzyme production, since the large amount of lignin in SCB could irreversibly adsorb the enzymes produced during fungal cultivation. This would also be expected during hydrolysis where the absence of lignin probably reduces the adsorption of cellulolytic enzymes onto the lignin fraction of biomass (Berlin et al. 2005). This behavior was also reported for a *T. harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest grown on pretreated sugarcane bagasse (Delabona et al. 2012).

The electrophoretic profile of L04 using SCB as substrate is similar to the one observed by Silva et al. (2012) using *T. harzianum* strain T4 cultivated in medium containing sugarcane bagasse. These authors showed by different electrophoretic techniques that *T. harzianum* was able to secrete active multi enzymatic complexes with cellulolytic and xylanolytic activities which match the high molecular mass signal observed in L04 (Figure 2, lane 5). Both zymograms using CMC and xylan as substrate showed a signal around 20 kDa (Figure 2, lanes 3 and 5). The weaker signal in the xylan zymogram indicates the presence of a ~20 kDa xylanolytic activity which is compatible with other studies of this species that describe xylanase activities around this molecular mass with the lack of cellulase activity (Rezende et al. 2002; Lee et al. 2009; do Vale et al. 2012). The L04 cellulase activity around 20 kDa could correspond to the endoglucanase (EGIII) from *T. harzianum* IOC3844 characterized by Generoso et al. (2012) described with a low molecular mass, lack the cellulose binding domain (CBD) and able to degrade amorphous cellulose such as CMC.

In summary, L04 showed an interesting ability of producing significant yields of cellulase in a short culture time when grown on SCB. Also, it revealed a well-balanced cellulolytic complex, presenting fast kinetics for production of endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. About 60% glucose yields were obtained from SCB and PDC after 18 hours of hydrolysis. We propose that *T. harzianum* L04 should be considered as a potential candidate for on-site enzyme production using *in natura* sugarcane bagasse as carbon source, in ready supply in a bioethanol production plant.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

BB carried out the isolation, characterization and classification of the fungi described in this work and wrote part of the manuscript. FAGT designed all the primers and supplied the equipment for fungi characterization. LMPM supervised the development of the work, analysed and discussed all the results, wrote the manuscript and supplied all the reagents and materials for this work. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Apoio a Pesquisa (FAP/DF) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Received: 22 August 2013 Accepted: 27 November 2013

Published: 6 December 2013

References

- Ahmed S, Bashir A, Saleem H, Saadia M, Jamil A (2009) Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pak J Bot* 41:1411–1419
- Andreas J, Filho EXF, Bom EPS (2008) Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: Hou CT, Shaw JR (ed) *Biocatalysis and Bioenergy*. Copyright, New Jersey, USA, pp 197–229
- Aranes V, Saddler JN (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the hole of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 3:4
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol* 23:257–270
- Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD (2010) Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. *Bioenergy Res* 3:82–92
- Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Skomarovsky A, Okunev O, Gusakov A, Gregg D, Sinityn A, Saddler J (2005) Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates—evidence for the role of accessory enzymes. *Enzym Microb Tech* 37:175–184
- Betanur GJV, Pereira N, Jr (2010) Sugarcane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pretreatment optimization. *Electron J Biotechnol* 13:01–08
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Canilha L, Chandel AK, Milessi TSS, Antunes FAF, Freitas WLC, Felipe MGA, Silva SS (2012) Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *J Biomed Biotechnol* 2012:989572
- Castro AM, Carvalho MLA, Leite SGF, Pereira N, Jr (2010a) Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:151–158
- Castro AM, Ferreira MC, Cruz JC, Pedro KCNR, Carvalho DF, Leite SGF, Pereira N, Jr (2010b) High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. *Enzyme Res* 2010:854526
- Castro AM, Pedro K, da Cruz J, Ferreira M, Ferreira MC, Leite SGF, Pereira N, Jr (2010c) *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant beta-glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. *Appl Biochem Biotechnol* 162:2111–2122
- Delabona PS, Farinas CS, Silva MR, Azzoni SF, Pradella JGC (2012) Use of a new *Trichoderma harzianum* strain from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresour Technol* 107:517–521
- do Vale LHF, Gómez-Mendoza DP, Kim MS, Pandey A, Ricart CAO, Filho EXF, Sousa M (2012) Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics* 12:2716–2728
- Druzhinina IS, Kopchinsky AG, Komón M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol* 42:813–828
- Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P (1998) Basecalling of automated sequencer traces using PHRED. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175–185
- FAOSTAT (2012). Available from: <http://faostat.fao.org>. Accessed October 5, 2012
- Franco P, Ferreira H, Ferreira E (2004) Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Biotechnol Appl Biochem* 40:255–259
- Generoso WC, Malago-Jr W, Pereira N, Jr, Henrique-Silva F (2012) Recombinant expression and characterization of an endoglucanase III (cel12a) from *Trichoderma harzianum* (Hypocreaceae) in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet Mol Res* 11:1544–1557
- Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59:257–268
- Himmel ME, Ruth MF, Wyman CE (1999) Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr Opin Biotechnol* 10:358–364
- Jeewon R, Hyde KD (2007) Detection and diversity of fungi from environmental samples: traditional versus molecular approaches. In: Varma A, Oelmüller R (ed) *Soil biology: advanced techniques in soil microbiology*, vol. 11. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L (2005) Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochem* 40:3519–3525
- Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:377–391
- Lee JM, Shin JW, Nam JK, Choi JY, Han IS, Nam SW, Choi YJ, Chung DK (2009) Molecular cloning and expression of the *Trichoderma harzianum* C4 endo- β -1,4-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 19:823–828
- Maeda RN, Serpa VI, Rocha VAL, Mesquita RAA, Anna LMMS, Castro AM, Driemeier CE, Pereira N, Jr, Polikarpov I (2011) Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochem* 46:1196–1201
- Mandels M, Weber J (1969) The production of cellulases. *Adv Chem Ser* 95:391–414
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
- Montenecout BS, Eveleigh DE (1977) Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl Environ Microbiol* 34:777–782
- Moreira LRS, Ferreira GV, Santos SST, Ribeiro APS, Siqueira FG, Filho EXF (2012) The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. *Braz J Microbiol* 43:498–505
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858
- Parachin NS, Siqueira S, de Faria FP, Torres FAG, de Moraes LMP (2009) Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfxYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Catal B Enzym* 59:52–57
- Peterson R, Nevalainen H (2012) *Trichoderma reesei* RUT-C30—thirty years of strain improvement. *Microbiology* 158:58–68
- Rezende MI, Barbosa AM, Vasconcelos AFD, Endo AS (2002) Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Braz J Microbiol* 33:67–72
- Roeder V, Broda P (1987) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1:17–20
- Ruegger MJS, Tauk-Tornisielo SM (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Bot* 27:205–211
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning—a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Silva AJ, Gómez-Mendoza DP, Junqueira M, Domoni GB, Ximenes-Filho E, Sousa MV, Ricart CAO (2012) Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. *Proteomics* 12:2729–2738
- Siqueira FG, Siqueira AG, Siqueira EG, Carvalho MA, Peretti BMP, Jaramilho PMD, Teixeira RSS, Dias ES, Félix CR, Filho EXF (2010) Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. *Biodegradation* 21:815–824
- Sun X, Liu Z, Zheng K, Song X, Qu Y (2008) The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enz Microb Technol* 42:560–567
- Szjártó N, Szengyel Z, Lidén G, Réczey K (2004) Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. *Appl Biochem Biotechnol* 113:115–124
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599

- Tolan JS (2002) Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean Technol Envir* 3:339–345
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA, pp 315–322

doi:10.1186/2193-1801-2-656

Cite this article as: Benoliel *et al.*: A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. *SpringerPlus* 2013 **2**:656.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- ▶ Convenient online submission
- ▶ Rigorous peer review
- ▶ Immediate publication on acceptance
- ▶ Open access: articles freely available online
- ▶ High visibility within the field
- ▶ Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ▶ springeropen.com
