

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PRISCILA DA SILVA DELABONA**

**PRODUÇÃO DE GLICOSIL HIDROLASES POR  
*Trichoderma harzianum* PARA O PROCESSO DE  
SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL**

**SÃO CARLOS-SP**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Priscila da Silva Delabona**

**“Produção de glicosil hidrolases por *Trichoderma harzianum*  
para o processo de sacarificação da biomassa vegetal”**

Orientadores: Dra. Cristiane Sanchez Farinas

Dr. José Geraldo da Cruz Pradella

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção de título de doutor ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, Campus de São Carlos.

**São Carlos-SP**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

D331pg

Delabona, Priscila da Silva.

Produção de glicosil hidrolases por *Trichoderma harzianum* para o processo de sacarificação da biomassa vegetal / Priscila da Silva Delabona. -- São Carlos : UFSCar, 2015.

149 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Biotecnologia. 2. *Trichoderma harzianum*. 3. Biomassa vegetal. 4. Celulase. I. Título.

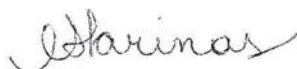
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

Priscila da Silva Delabona

Tese de Doutorado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia

Aprovado em: 20/03/2015

**BANCA EXAMINADORA**



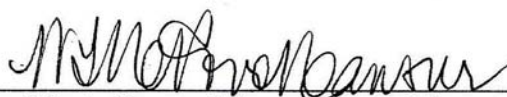
---

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (Orientador)  
(Embrapa)



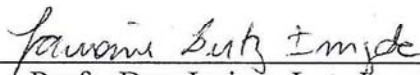
---

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
(UFSCar)



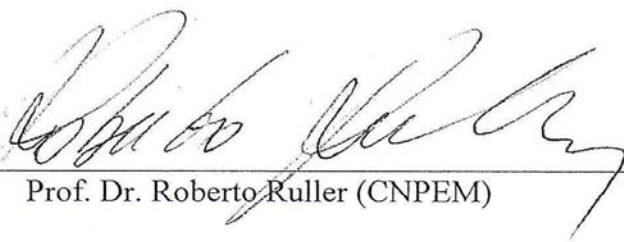
---

Profa. Dra. Maria Teresa Marques novo Mansur (UFSCar)



---

Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak (CNPEN)



---

Prof. Dr. Roberto Ruller (CNPEN)

*"Mas é preciso ter manha*

*É preciso ter graça*

*É preciso ter sonho sempre..."*

*Milton Nascimento*



Dedico este trabalho ao iluminador da minha vida, Deus, e aos guias do meu caminho, meus pais, Osmarina e Paulo.





## **Agradecimentos**

A Deus por sempre me guiar e me conduzir por caminhos brilhantes, por todas as oportunidades e por me cercar de pessoas excelentes;

A minha orientadora Cristiane Sanchez Farinas cuja contribuição em minha vida profissional supera todas as expectativas de uma orientação, almejando sempre meu crescimento profissional, pelos incentivos e confiança;

Ao meu orientador José Geraldo da Cruz Pradella que me forneceu todo o suporte necessário para a realização deste trabalho e acima de tudo por sempre acreditar no meu potencial;

Aos meus pais Osmarina Alves da Silva e Paulo Sérgio Delabona por sempre me mostrar o caminho certo, pelo exemplo de persistência e capacidade de lutar;

Aos meus queridos irmãos Gustavo e Alessandro e minha querida avó Onilda pelo incentivo e torcida;

Ao meu namorado Daniel Falconi por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, pelo seu companheirismo, amor e carinho em horas difíceis e alegres;

A técnica do laboratório e amiga Deise Lima, por todos os esforços dedicados na execução deste trabalho, pelo apoio e também pelos momentos de descontração;

Aos meus estagiários e colegas de laboratório e a todos que me socorreram quando eu precisei: Gisele Nunes, Cleiton Braga, Patrícia Costa, Diogo Robl, Douglas Paixão, Rogério Medina, Daniel Kolling, João Paulo Cairo, Daniela Ribeiro, Mateus Ribeiro, Aline Tavares, Letícia Murakami, Zaira Hoffmam e Mariane Zubieta.

Aos pesquisadores do CTBE por toda contribuição científica na realização deste trabalho, a todos os técnicos pelo suporte e ao Diretor do CTBE Carlos Eduardo Vaz Rossell por acreditar no trabalho e aceitar a sua realização.

Ao professor Bernhard Seiboth da Vienna University of Technology pela oportunidade e pelos ensinamentos enquanto estive por lá.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES e FAPESP e em especial ao programa do CNPq “Ciência sem Fronteiras” meus sinceros agradecimentos pelo investimento em meu trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade e busca incansável pela melhoria do programa. E é claro à secretária Claudia por suportar nossas dúvidas e vários telefonemas.

E a todos aqueles que lerem esse trabalho e sentirem parte dele.

Muito Obrigada!

## Sumário

Resumo .....	17
Abstract .....	19
INTRODUÇÃO .....	21
Capítulo I .....	25
1.1. Revisão Bibliográfica .....	25
1.1.1. <i>Bioetanol e etanol 2G no Brasil</i> .....	25
1.1.2. <i>Biomassa lignocelulósica</i> .....	28
1.1.2. <i>Enzimas envolvidas na hidrólise de biomassa</i> .....	39
1.1.3. <i>Produção de enzimas microbianas</i> .....	46
1.1.4. <i>Trichoderma harzianum</i> .....	48
1.2. Objetivo.....	52
Capítulo II .....	55
Capítulo III .....	61
Artigo publicado na Revista Bioresource Technology, volume 132, páginas 401–405, ano 2013. .....	61
Capítulo V.....	77
Capítulo V.....	105
1. Introdução .....	106
2. Objetivo.....	109
3. Estratégia metodológica .....	109
3.1. Origem e manutenção do fungo.....	109
3.2. Identificação dos genes <i>lae1</i> e <i>xyl1</i> .....	109
3.2.1. <i>Digestão dos produtos de PCR com Enzimas de Restrição</i> .....	110
3.3. Construção dos vetores.....	110
3.3.1. <i>Seleção do marcador molecular</i> .....	110
3.3.2. <i>Cassetes</i> .....	110
3.4. Obtenção de células competentes .....	111

3.5. Transformação em <i>E. coli</i> .....	112
3.5.1. <i>Miniprep e purificação do DNA plasmidial</i> .....	113
3.6. Transformação em <i>T. harzianum</i> .....	113
3.6.2. <i>Transformação</i> .....	113
3.7. Fermentação submersa para seleção dos melhores clones .....	114
3.8. Metodologia Analítica.....	115
3.8.1. <i>Atividade de FPase</i> .....	115
3.8.2. <i>Atividade de Xilanase e CMCase</i> .....	116
3.8.3. <i>Atividade de <math>\beta</math>-glicosidase</i> .....	116
3.8.4. <i>Proteínas Totais</i> .....	117
4. Resultados e Discussão .....	117
4.1. Seleção do marcador molecular .....	117
4.2. Identificação dos genes <i>xyl1</i> e <i>lae1</i> .....	119
4.3. Estratégia para super expressão de <i>xyl1</i> e <i>lae1</i> .....	119
4.3.1. <i>Fermentações com os clones positivos para superexpressão de xyl1</i> .....	122
4.3.2. <i>Fermentações com os clones positivos para superexpressão de lae1</i> .....	128
Capítulo VII.....	135
Considerações Finais e Perspectivas .....	135
Perspectivas para trabalhos futuros .....	137
Referências Bibliográficas .....	139

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas .....	30
<b>Tabela 2:</b> GenBank das sequencias de <i>T. reesei</i> utilizadas para fazer o blast no NCBI do <i>T. harzianum</i> .....	119
<b>Tabela 3:</b> Fermentação submersa dos clones de <i>xyl1</i> e do <i>T. harzianum</i> selvagem no tempo de 48 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática para as enzimas avaliadas....	123
<b>Tabela 4:</b> Fermentação submersa dos clones de <i>xyl1</i> e do <i>T. harzianum</i> selvagem no tempo de 72 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática para as enzimas avaliadas....	124
<b>Tabela 5:</b> Fermentação submersa do <i>T. harzianum</i> selvagem no tempo de 96 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática para as enzimas avaliadas. ....	125
<b>Tabela 6:</b> Atividades enzimáticas dos sobrenadantes de <i>xyl1</i> obtidos por fermentação submersa em frascos agitados de 500 mL com 200 mL de meio de cultura em 96 horas de incubação à 29°C e 200 rpm de agitação. ....	127
<b>Tabela 7:</b> Fermentação submersa tendo Celufloc® como fonte de carbono, dos clones de <i>lae1</i> e do <i>T. harzianum</i> selvagem no tempo de 48 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática.....	129
<b>Tabela 8:</b> Fermentação submersa tendo Celufloc® como fonte de carbono, dos clones de <i>lae1</i> e do <i>T. harzianum</i> selvagem no tempo de 72 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática.....	130
<b>Tabela 9:</b> Fermentação submersa tendo Celufloc® como fonte de carbono, dos clones de <i>lae1</i> e do <i>T. harzianum</i> selvagem no tempo de 96 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática.....	131
<b>Tabela 10:</b> Atividades enzimáticas dos sobrenadantes de <i>lae1</i> obtidos por fermentação submersa em frascos agitados de 500 mL com 200 mL de meio de cultura em 96 horas de incubação à 29°C e 200 rpm de agitação. ....	133

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Principais unidades de produção de etanol 2G no mundo .....	27
<b>Figura 2:</b> Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.....	29
<b>Figura 3:</b> Estrutura da celobiose e da ligação $\beta$ -glicosídica na celulose .....	31
<b>Figura 4:</b> Estrutura cristalina da celulose. Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra) .....	31
<b>Figura 5:</b> Estrutura da celulose destacando a região amorfa e cristalina .....	32
<b>Figura 6:</b> Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses .....	34
<b>Figura 7:</b> a) Modelo de uma estrutura de lignina e b) os seus monômeros precursores	35
<b>Figura 8:</b> Representação da cadeia pectica com suas unidades estruturais .....	37
<b>Figura 9:</b> Mecanismo de ação sinérgico do complexo celulolítico .....	41
<b>Figura 10:</b> Estrutura da enzima CBH I, demonstrando o domínio catalítico, linker e CBM de <i>Trichoderma</i> sp .....	43
<b>Figura 11:</b> Estrutura da xilana e as hemicelulases responsáveis por sua degradação ...	44
<b>Figura 12:</b> Crescimento fúngico do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> em placa de Petri.	50
<b>Figura 13:</b> a) vetor pLHhtef1, resistente à higromicina B e que possui a região promotora de tef 1; b) vetor contendo aminoglicoside 3'fosfotransferase, resistente à geneticina e que possui a região promotora de pki1 de <i>T. reesei</i> para transformação de <i>T. harzianum</i> .....	111
<b>Figura 14:</b> a) Seleção do marcador para xyl1, range de concentrações de geneticina; b) Seleção do marcador para lae1, range de concentrações de higromicina B. ....	118
<b>Figura 15:</b> Plasmídeo tef1 digerido com as enzimas ClaI e HindIII, tef 1 com 6kb (banda superior) e lae1 de <i>T. reesei</i> com 3kb (banda inferior).....	120
<b>Figura 16:</b> Confirmação das colônias de superexpressão por excisão, em a) mostra as duas bandas excisadas correspondente ao vetor pki (banda superior) e gene xyl (banda inferior), já em b) temos as bandas do vetor tef1 (banda superior) e gene lae1 (banda inferior).....	121
<b>Figura 17:</b> Colônias isoladas em placa contendo MEX + 0,1% de TritonX100 + marcador seletivo geneticina na concentração de 100 $\mu$ g/mL.....	121
<b>Figura 18:</b> Crescimento do clone lae1_42 e do fungo selvagem em meio PDA em placa de Petri.....	134

## Lista de abreviações

AF:  $\alpha$ -L-arabinofuransidase

BED, DSB, DEB: Bagaço de cana explodido e deslignificado

BEX, SB: Bagaço de cana explodido

CMC: Carboxi-metil-celulose

EMD: planejamento experimental de misturas

FOS: Fruto-oligossacarídeo

FPU: Unidade de atividade contra Papel de filtro

GH: Glicosil hidrolases

HB: Bagaço de cana hidrotérmico

LAE: Proteína nuclear Metil transferase

SF: Farelo de soja

SUC: Sacarose

XYR1: Ativador de expressão dos genes da celulase e hemicelulase





## Resumo

Delabona, P.S. Produção de celulases por *Trichoderma harzianum* para o processo biomassa a bioetanol. São Carlos, UFScar, Março, 2015. Projeto de Tese (Doutorado em Biotecnologia). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Atualmente o grande desafio para a produção de etanol de segunda geração consiste em diminuir o custo das enzimas degradantes da fibra lignocelulósica. Uma alternativa que pode levar a redução de parte desse custo é a otimização do processo fermentativo utilizando fontes indutoras das enzimas (hemi)celulolíticas que permitam um maior crescimento da biomassa fúngica e maior secreção de proteínas. A utilização de uma linhagem mutante com a superexpressão dos ativadores dessas enzimas também pode contribuir nesse sentido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de enzimas envolvidas na degradação da biomassa pelo fungo recém-isolado *Trichoderma harzianum* P49P11 com foco no melhoramento dos processos fermentativos submersos e no uso de ferramentas de biologia molecular para o melhoramento da linhagem fúngica. Em relação ao processo fermentativo foi avaliado o efeito de diferentes fontes indutoras em frascos agitados e em biorreator utilizando ferramentas estatísticas de planejamento de experimentos e estratégias de aumento de biomassa na fase de pré-inóculo. Em relação ao melhoramento da linhagem fungica foram utilizadas ferramentas de biologia molecular para a superexpressão de dois ativadores de celulases (*xyl1* e *lae1*). Para um melhor entendimento das proteínas produzidas em cultivo submerso foi realizado o proteoma do extrato enzimático secretado pelo fungo selvagem em bagaço de cana pré-tratado. Os resultados mostraram que a melhor fonte de carbono indutora de celulases foi o bagaço de cana explodido e deslignificado (BED) + sacarose na proporção 3:1, alcançando valores de 1,21 FPU/mL, 80.0U/mL de xilanse e 17,30 U/mL de  $\beta$ -glicosidase. O proteoma do extrato enzimático de *T. harzianum* resultou na identificação de 24 hidrolases glicosídicas diferentes, 4 proteínas CBM dentro de 12 diferentes famílias do CAZy. A partir deste estudo pode-se suplementar o coquetel enzimático “on site” com duas enzimas acessórias, pectinase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase que aumentaram o rendimento de hidrólise em mais de 100%. Em relação ao estudo das fontes de carbono na fase de pré-inóculo foi possível aumentar a produção de celulases em 130% utilizando o glicerol como fonte de carbono inicial, seguida de fonte de

carbono indutora (BED). A aplicação de técnicas de biologia molecular para a mutação do *T. harzianum* visando a superexpressão de *xyr1* e *lae* teve influência positiva na produção das enzimas FPase, CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase, representando uma nova abordagem para aumentar a produção dessas enzimas.

**Palavras-chave:** *Trichoderma harzianum*, celulases, indutores e ativadores de celulases.

## Abstract

Delabona, P.S. Production of cellulases by *Trichoderma harzianum* for biomass process to bioethanol. São Carlos, UFScar, March, 2015. Thesis Project. (PhD in Biotechnology). Center of Exact Sciences and Technology, Federal University of São Carlos.

Currently the great challenge for the production of second generation ethanol is to reduce the cost of the enzymes. It is possible to reduce part of this cost by carrying out an optimization of the process fermentation using sources of cellulase-induction that allow further growth of fungal biomass, and increased secretion of proteins. The use of a mutant strain with overexpression of hemicelulolytics activators could increase expression of the enzymes of interest and thereby contribute to cost reduction. This work aimed to study the production of enzymes involved in the degradation of biomass by the newly isolated strain of *Trichoderma harzianum* P49P11 focusing on the improvement of the submerged fermentation processes and on the use molecular biology tools to improve the fungal strain. Regarding the fermentation process, the effects of different inducing sources were evaluated in flasks and bioreactor using statistical experimental design tools and strategies to enhance biomass in the pre-culture step. For fungal strain improvement, it was used molecular biology tools for the overexpression of two activators of cellulases (*xyl1* and *lae1*). A proteomic analysis of the *T. harzianum* enzymatic extract obtained using sugarcane bagasse pretreated by steam explosion followed by delignification (BED) was performed. The results showed that the best source for inducing cellulase was BED + sucrose (3: 1), reaching values of 1.21 FPU/mL 80.0U/mL of xylanase and 17.30 U/mL of  $\beta$ -glucosidase. The proteomic analysis identified 24 different glycoside hydrolases and four CBM proteins, within 12 different CAZy families. From this study, the enzymatic cocktail produced "on site" could be supplemented using two accessory enzymes, pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, leading to an increase of 100% of the hydrolysis yield. Regarding the study of carbon sources in the pre-culture step, it was possible to increase cellulases production in 2 times using glycerol as the initial carbon source, followed by inducing carbon source (BED). The *xyl1* and *lae1* overexpression influenced positively the FPase, CMCase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase production, representing a new approach to increase production of these enzymes.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*, cellulases, inductors and cellulases activators



## INTRODUÇÃO

A crescente industrialização global requer uma grande demanda de energia, que é gerada, principalmente, a partir de combustíveis de origem fóssil (80% da energia primária consumida no mundo) (Morales et al., 2015). Visando atingir essa demanda de energia, a exaustão das fontes de combustíveis fósseis leva a vários efeitos negativos como alterações climáticas, recuo das geleiras, aumento do nível do mar, perda de biodiversidade e aumento do preço do petróleo, afetando diretamente a economia global (Mehulkumar et al., 2015). A emissão de CO<sub>2</sub> global alcançou 34 bilhões de toneladas em 2011, um valor 3% acima do que foi previsto no ano e maior do que o aumento médio anual da última década, sendo que o setor de transporte é responsável por uma grande parte dessa emissão (Morales et al., 2015). Tal cenário proporciona a necessidade de exploração de novas fontes de energia: i) renováveis, ii) que causem o mínimo impacto ambiental e iii) que seja economicamente viável.

O material lignocelulósico originado de produtos residuais é renovável, abundante e barato, sendo o mais abundante dos substratos naturais renováveis para conversão em combustível. Seu conteúdo de celulose e hemicelulose pode ser convertido em oligossacarídeos, hexoses e pentoses mais lignina (Yusuf; Kamarudin; Yaakub, 2011). O teor de celulose e hemicelulose nesta matéria-prima representa uma alternativa sustentável, ou seja, uma fonte de energia barata e renovável para aumentar a produção de biocombustíveis e para melhorar o balanço de energia com menos contribuição ao efeito estufa (Kelbert et al., 2015).

Portanto, a busca do etanol produzido a partir de celulose está mobilizando um número crescente de pesquisadores ao redor do mundo, estimulados por políticas de pesquisa voltadas para ampliar a produtividade no setor bioenergético. Projeções indicam que esses processos poderiam produzir cerca de 300 litros de etanol por tonelada de bagaço seco, aumentando o rendimento de produção de etanol por hectare em até 100% (Ferraresi de Araujo et al., 2014).

Uma das rotas mais promissoras para a transformação de materiais celulósicos em etanol é a hidrólise enzimática seguida da fermentação (Piccolo e Bezzo, 2009). Enzimas como as celulasas convertem celulose em glicose. Porém, o alto custo das enzimas pode ser um fator limitante no processo de obtenção do etanol a partir de

resíduos celulósicos (Marcuschamer et al., 2012). É neste ponto que muitos microrganismos desempenham um importante papel na produção de etanol celulósico, pois estes possuem sistemas enzimáticos capazes de degradar os componentes dos resíduos celulósicos e assim reduzir o custo das enzimas.

O fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* é conhecidamente utilizado como biocontrole de fungos patógenos de plantas há mais de três décadas (Elad; Chet e Katan, 1980), e mais recentemente muita atenção tem sido dada à sua capacidade de degradar paredes celulares de plantas. Algumas linhagens de *T. harzianum* se destacam pela grande quantidade de algumas enzimas celulolíticas secretadas, como as de *T. harzianum* P49P11 (Delabona et al., 2012a), *T. harzianum* L02 (Benoliel et al., 2013) e *T. harzianum* IOC-3844 (Horta et al., 2014).

Para a redução dos custos de produção de enzimas celulolíticas, o estudo das variáveis para a otimização dos processos de produção (agitação, tensão de cisalhamento, nível de oxigênio dissolvido, pH e temperatura, fonte de carbono e nutrientes), aliado ao estudo das técnicas de melhoramento genético do microrganismo são de fundamental importância para aumentar a expressão e produtividade das enzimas envolvidas na degradação da biomassa.

Desta forma, no presente trabalho foram abordados estes dois aspectos relacionados ao processo de produção de enzimas celulolíticas pelo fungo recém-isolado *Trichoderma harzianum* P49P11 realizando o melhoramento de processos fermentativos submersos utilizando frascos agitados e biorreatores e o uso de ferramentas de biologia molecular para o melhoramento da linhagem fúngica com o aumento da expressão de genes indutores de celulasas.

## **1.1 Estrutura do trabalho**

Esta Tese de doutorado está apresentada no formato de Capítulos. Inicialmente, no Capítulo I é apresentada uma revisão de literatura atualizada, na qual se encontram informações relevantes para o entendimento do trabalho desenvolvido, juntamente com os objetivos propostos.

No Capítulo II são apresentados os resultados obtidos durante o desenvolvimento da primeira etapa do trabalho e refere-se ao estudo de diferentes fontes de carbono para indução de celulasas por fermentação submersa em frascos agitados.

Foi avaliado também o cultivo em biorreatores das melhores condições encontradas em frascos agitados. Para avaliar a eficiência do extrato enzimático produzido, foram feitos ensaios de hidrólise enzimática. Para isso, os sobrenadantes do cultivo de *Trichoderma harzianum* foram comparados com sobrenadante do fungo hipercelulolítico *Trichoderma reesei*. Esses resultados estão apresentados na forma de artigo, publicado na revista científica *Bioresource Technology*, intitulado “*Use of a new Trichoderma harzianum strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production*”.

No Capítulo III são apresentados os resultados obtidos do estudo de planejamento experimental realizado em biorreator com as fontes de carbono indutoras estudadas no artigo do Capítulo II. Os resultados estão também apresentados em forma de artigo, “*Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new Trichoderma harzianum P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation*” publicado na revista científica *Bioresource Technology*.

No Capítulo IV são apresentados os resultados obtidos do estudo de proteôma do sobrenadante de *Trichoderma harzianum* P49P11 e baseado nessa informação foi proposto um coquetel enzimático suplementado com duas enzimas acessórias, pectinase e  $\alpha$ -L-arabinofuronosidase, demonstrando significativo aumento da hidrólise enzimática com a suplementação realizada. Os resultados estão apresentados em forma de artigo, “*Understanding the cellulolytic system of Trichoderma harzianum P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase*” publicado na revista científica *Bioresource Technology*.

No capítulo V são apresentados os resultados do estudo do aumento de concentração de biomassa fúngica. Para escolha da melhor fonte de carbono “crescedora” (maior formação de biomassa fúngica e conseqüentemente maior secreção de proteínas) na fase de pré-inóculo foram avaliadas 11 fontes de carbono diferentes. Após escolha da melhor fonte de carbono crescedora foram propostas diversas estratégias de indução com material celulósico em diferentes concentrações. Os resultados apresentados são mostrados na forma de artigo o qual está em fase de submissão.



No Capítulo VI são apresentados os resultados obtidos durante o período de doutorado sanduíche realizado na *Vienna University of Technology* com supervisão do professor Dr. Bernhard Seiboth. Nesta etapa do trabalho foram desenvolvidas técnicas de biologia molecular para superexpressar os genes *xyr1* e *lae1* e, assim, proporcionar o melhoramento da linhagem selvagem de *Trichoderma harzianum* visando aumentar a expressão das enzimas envolvidas na degradação da biomassa em fermentação submersa.

Por fim, no Capítulo VII são apresentadas as conclusões e perspectivas do presente trabalho.

# Capítulo I

## 1.1. Revisão Bibliográfica

### 1.1.1. Bioetanol e etanol 2G no Brasil

A produção em larga escala de biocombustíveis oferece uma oportunidade para que os países possam reduzir a sua dependência das importações de petróleo. Nos países desenvolvidos existe uma tendência crescente para empregar tecnologias modernas e eficientes na conversão da bioenergia usando uma gama de biocombustíveis que são competitivos com os combustíveis fósseis

O uso do álcool combustível no Brasil foi desde o seu início, fortemente ligado à produção e comércio de açúcar, que, como um dos principais produtos de exportação do país, desde o período colonial, sempre foi importante para assegurar a estabilidade econômica. Portanto, a produção do álcool de cana-de-açúcar como combustível tinha, em primeiro lugar, um papel mais importante como um amortecedor para proteger os produtores das flutuações do preço do açúcar do que como instrumento de inovação tecnológica ou abertura de novas fronteiras comerciais (Rico et al., 2010). Inspirado em experiências realizadas na Europa e nos EUA, elites agrárias do nordeste brasileiro comprometeram-se, desde a primeira década do século 20 iniciar experiências com o álcool combustível a partir de tecnologia e equipamentos alemão, e em 1925, o primeiro produto economicamente viável, o álcool-motor USGA (Serra Grande Alagoas Plant) foi lançado comercialmente no estado de Alagoas (Rico et al., 2010).

Nessa época, a produção de bioetanol era 70 vezes maior do que a produção e consumo de petróleo. Já na Europa e nos Estados Unidos, o uso do bioetanol como combustível foi difundido no início de 1900 (Balat, 2011). Por ter se tornado mais caro de produzir do que o combustível a base de petróleo, especialmente após a II Guerra Mundial, o potencial do bioetanol foi amplamente ignorado até a crise do petróleo da década de 70 (Balat, 2011).

No Brasil, em resposta aos choques do preço do petróleo em 1973 e 1979, foi lançado o programa Proálcool, que era estruturado em torno de um quadro global compreendendo: a) políticas econômicas (fixação de preços, subsídios, transferências),

b) aumento da mistura obrigatória do etanol na gasolina, c) equalização de custos, d) isenção de impostos, e) pagamento seguro aos produtores e compra garantida, f) ações sustentadas, g) financiamentos no setor agrário, industrial, logístico e automobilístico (Rico et al., 2010).

Atualmente o bioetanol é produzido ao redor do mundo, principalmente a partir de açúcares e materiais rico em amido. Nos EUA e Brasil, a produção de etanol é feita por milho e cana-de-açúcar, respectivamente. Enquanto na Europa e China são utilizados cereais como matérias-primas. Os EUA e o Brasil são os produtores de bioetanol líderes no mundo, com 89% da produção total mundial (Morales et al., 2015). O Brasil chegou a mais de 25 bilhões de litros de etanol na safra 2013/2014 (MAPA, 2015), equivalente a cerca de 30% da produção mundial de etanol (USDA, 2015).

Porém, os biocombustíveis de primeira geração derivam de culturas terrestres, como cana, beterraba, milho e tem gerado uma série de controvérsias, principalmente devido ao seu impacto nos mercados globais de alimentos e sobre a segurança alimentar, especialmente no que diz respeito às regiões mais vulneráveis da economia mundial. Isso tem levantado perguntas pertinentes sobre o seu potencial para substituir os combustíveis fósseis e da sua produção de sustentabilidade. (Brennan e Owende, 2010). Além disso, a utilização de apenas uma pequena fração da biomassa total das plantas reduz a eficiência de uso da terra (Nigam; Singh, 2011).

O etanol celulósico, também chamado de etanol de segunda geração (2G), apresenta grande potencial de crescimento, pois não depende da produção de alimentos para sua industrialização e nem da expansão da área plantada, e sim do reaproveitamento dos resíduos da produção de etanol e açúcar, como por exemplo, o bagaço e a palha da cana, que são fontes de celulose e respondem por dois terços do potencial energético da planta (Nigam; Singh, 2011).

A biodegradação desses materiais lignocelulósicos constituídos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina é um processo natural de reciclagem de matéria orgânica que atualmente tem sido alvo de muitos estudos devido à grande quantidade de biomassa gerada a partir de resíduos industriais, sendo apontada como grande aposta para a solução do problema energético mundial.

Espera-se que produção mundial de etanol celulósico será de pelo menos 60,5 bilhões de litros em 2020 se as metas estabelecidas por Estados Unidos, China, Europa, Japão e Brasil forem alcançadas, estando os Estados Unidos com a maior parte deste

mercado (63,9%), com base em propostas e legislações já assinadas. Não há nenhuma legislação oficial no Brasil para o etanol celulósico, mas de acordo com a UNICA (União das Indústrias de Cana de Açúcar), o Brasil contará com uma participação de 7,6 bilhões de litros (12,9%) de etanol celulósico em 2020 (Mussato et al., 2010).

A empresa GranBio inaugurou, em setembro de 2014, uma planta em Alagoas que produzirá 84 milhões de litros por ano de etanol 2G. Foi a primeira unidade no hemisfério sul a alcançar uma escala industrial. Até 2020 a GranBio planeja investir R\$ 4 bilhões em 10 novas unidades, para também chegar a um bilhão de litros (Cunha, 2013). A Figura 1 mostra as principais unidades de produção de etanol 2G no mundo e a sua capacidade de produção.

**Figura 1: Principais unidades de produção de etanol 2G no mundo e a sua capacidade de produção. (CTBE, 2015).**



**Figura 1: Principais unidades de produção de etanol 2G no mundo e a sua capacidade de produção. (CTBE, 2015).**

No âmbito estatal cabe ressaltar a iniciativa do Ministério da Ciência e Tecnologia com a construção de uma plataforma para produção de coquetéis enzimáticos e hidrólise do bagaço de cana em escala piloto junto ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), em Campinas, SP.

Contudo, a viabilidade econômica do aproveitamento da biomassa lignocelulósica para a obtenção de álcool é um dos gargalos para a produção em escala

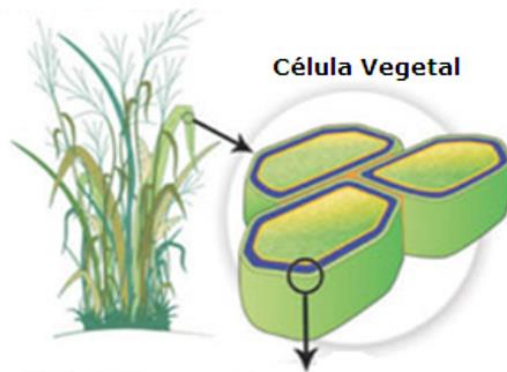
industrial até o momento. O elevado custo se deve, principalmente, à etapa de produção de enzimas celulolíticas, necessárias para a conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. São poucas as empresas que conseguiram sucesso em desenvolver coquetéis enzimáticos eficientes a um custo viável, sendo este um dos principais fatores que encarecem a produção do etanol 2G no Brasil e no mundo.

### ***1.1.2. Biomassa lignocelulósica***

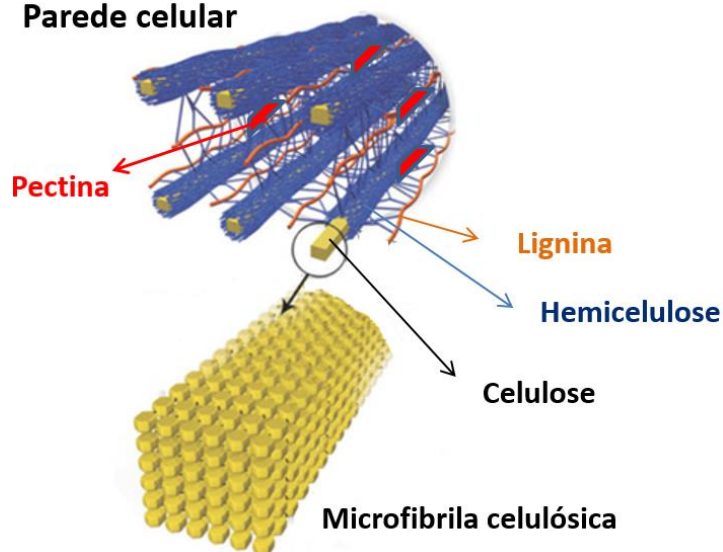
A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte natural de carboidratos do mundo, representa mais de 90% do peso seco de uma célula vegetal e é constituída por três principais frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina. Estas frações estão unidas fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes, sendo o restante composto por extrativos e cinzas (Balat, 2011).

As paredes das células das plantas são compostas por diferentes camadas, que diferem umas das outras quanto à estrutura e à composição química. Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas como espirais, de forma a conferir força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lignina, polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis, cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração principal, a hemicelulose, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina, como mostra a Figura 2. Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas.

### Biomassa lignocelulósica



### Parede celular



**Figura 2:** Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (Bidlack et al., 1992).

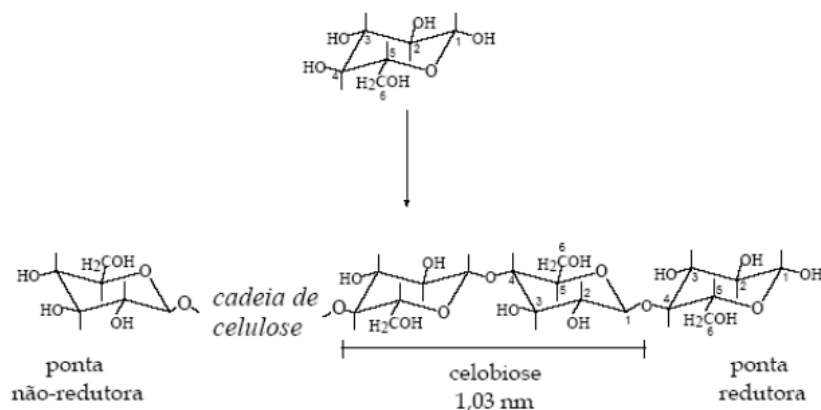
A composição química da biomassa lignocelulósica, pode variar em função do tipo de biomassa, conforme mostra a Tabela 1, mas geralmente contém 35- 50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas (Menon e Rao, 2012). A composição química do bagaço de cana pode apresentar algumas diferenças em função da variedade e da localização dos cultivos.

**Tabela 1:** Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas (Menon e Rao, 2012).

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

### *Celulose*

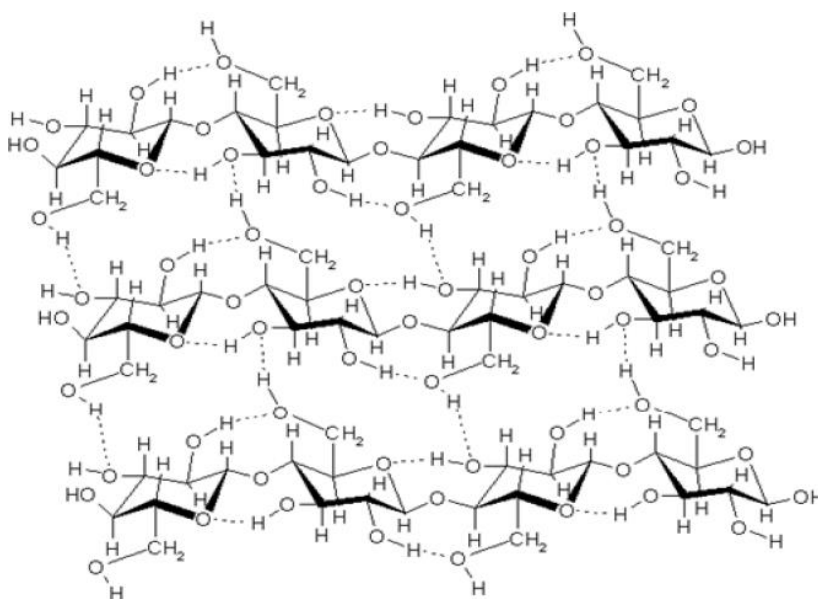
A celulose é o principal componente da biomassa vegetal (30-60% da massa seca da matéria-prima), podendo ser encontrada na forma pura, como no algodão, ou mais comumente, associada à lignina e hemicelulose na parede celular. É um polímero formado por unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando cadeias longas e paralelas, insolúveis em água com massa molecular que varia entre 50 mil e 2,5 milhões de Dalton, dependendo da sua origem. Esses polímeros de D-glicose, podem ser representados por uma série de anéis piranosídicos rígidos conectados por um átomo de oxigênio, que faz ponte entre dois átomos de carbono. A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glicose, cujo carbono anomérico não está livre é chamada de extremidade redutora. Já a outra extremidade é conhecida como não redutora (Sandgren et al., 2005). A junção de duas moléculas de glicose forma o dissacarídeo celobiose, como mostrado na Figura 3.



**Figura 3:** Estrutura da celobiose e da ligação  $\beta$ -glicosídica na celulose (Adaptado Sandgren et al., 2005).

As moléculas de celulose têm forte tendência para formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias justapostas de glicose, fazendo-as impenetráveis à água e, portanto, insolúveis, originando fibras compactas e que constituem a parede celular dos vegetais (Ogeda e Petri, 2010).

Os grupos hidroxilas (OH) são os responsáveis pelo comportamento físico e químico da celulose. Em função de seu posicionamento na unidade glicosídica, são capazes de formar dois tipos de ligações de hidrogênio: ligações de hidrogênio entre os grupos OH de unidades adjacentes da mesma molécula de celulose (intramoleculares) e ligações entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose (intermoleculares), como mostrado na Figura 4.

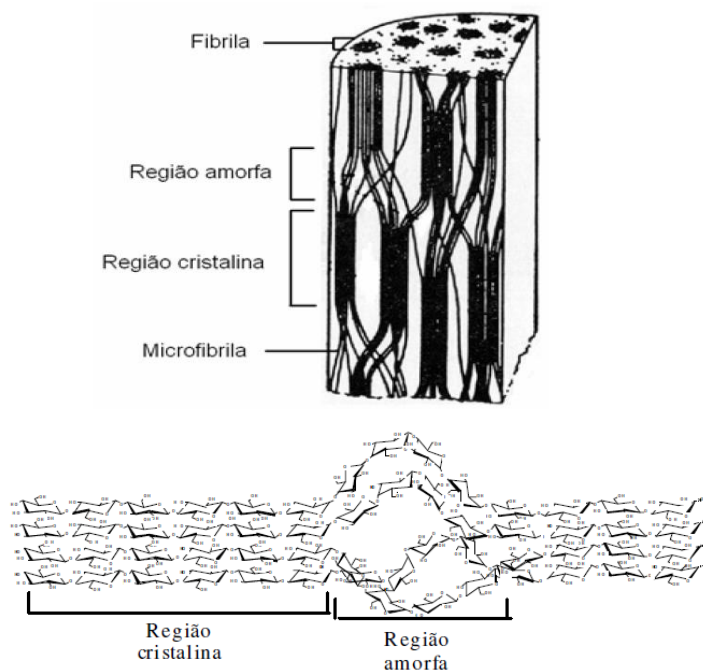


**Figura 4:** Estrutura cristalina da celulose. Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra) (Radford e Taleb 1996).

Cada uma das fibrilas que compõe a estrutura da celulose é formada pela agregação de cerca de 250 microfibrilas, sendo que cada uma delas é formada por um pequeno número de feixes de molécula de celulose (fibrilas elementares), que por sua vez é formada por mais de mil unidades de glicose, as quais se interligam por ligações de hidrogênio. Em alguns pontos das fibrilas elementares, as moléculas de celulose



estão dispostas de maneira desordenada (regiões amorfas), em outras elas se dispõem ordenadamente, formando as micelas de estrutura cristalina, como mostrado na Figura 5.



**Figura 5:** Estrutura da celulose destacando a região amorfa e cristalina (Sun e Cheng 2002).

A celulose possui polimorfismo, ou seja, dependendo da origem ou das condições de isolamento ou conversão, a molécula pode adquirir uma conformação de cristais reticulados. A resistência da celulose a processos de hidrólise é devida muito mais à sua estrutura cristalina do que à existência de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. As ligações de hidrogênio conferem às cadeias de celulose uma estrutura altamente ordenada e rígida. As regiões menos ordenadas são mais sensíveis à hidrólise (Lynd et al., 2002).

### ***Hemicelulose***

A hemicelulose é considerada, na raiz da sua palavra, uma meia celulose, porém é constituída de unidades de pentoses (xilanas) ou unidades alternadas de manoses e glicoses ou unidades de galactoses. Além disso, todas as hemiceluloses possuem cadeias laterais constituídas de ácido acético, pentoses, ácidos hexurônicos e deoxihexoses que

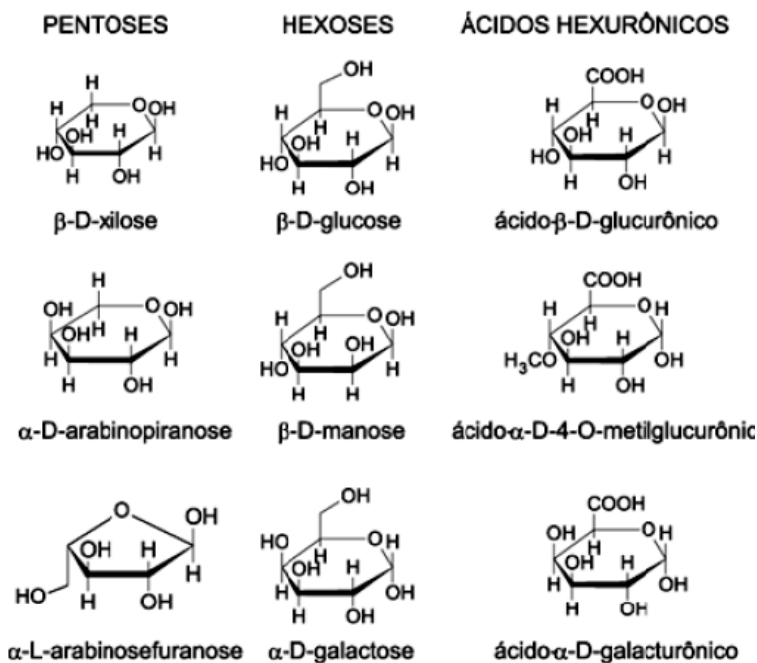
são responsáveis pela solubilidade da hemicelulose em água e em álcalis (Menezes, 2007).

Portanto, as hemiceluloses compreende um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, que se ligam, firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose. Quimicamente, as hemiceluloses são compostas de uma série de heteropolissacarídeos, não-amiláceos e não-celulósicos, formados por vários resíduos de pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, Dglicose e D-galactose) e por seus ácidos urônicos (Chandel et al., 2007).

Os monossacarídeos estão ligados entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir do qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Sua estrutura de ramificações e cadeias laterais interage facilmente com a celulose dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (Ramos, 2003; Santos et al., 2012).

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas e concentram-se, principalmente, nas camadas primárias e secundárias, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina. Em madeiras duras e em uma série de resíduos agroindustriais, o componente hemicelulósico apresenta alto conteúdo de xilanas (Menezes, 2007).

Nos polímeros ou heteropolímeros formados de galactose, manose, xilose, e arabinose, as xiloglicanas (compostas de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e ramificações de xilose em ligações  $\alpha$ -1,6) e as xilanas (compostas de cadeias de xilose com ligações  $\beta$ -1,4) são os constituintes predominantes nas paredes primárias e secundárias da parede celular, respectivamente, sendo que as xilanas são as formas mais comuns de hemiceluloses (Girio et al., 2010). A Figura 6 mostra alguns monossacarídeos constituintes das hemiceluloses.



**Figura 6:** Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses (Adaptado de Dodd e Cann, 2009).

A natureza química das hemiceluloses varia, nas plantas, em relação ao tipo de tecido vegetal e à espécie a que pertencem. Em geral, as hemiceluloses participam nas madeiras em 20 a 30% da composição total, enquanto que, nas gramíneas, estes valores podem chegar a 50% e no bagaço de cana as hemiceluloses são o segundo maior constituinte químico representando 20 a 25% da massa do bagaço seco (Polizelli et al., 2005).

### *Lignina*

A lignina é um constituinte da parede celular de todas as plantas vasculares. É uma macromolécula de alta massa molecular e de estrutura irregular constituída de unidades de fenilpropano. Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano. A lignina apresenta um esqueleto básico de quatro ou mais unidades de fenilpropano por molécula substituída (Cornu et al. 1994). Esses monômeros que formam a lignina são denominados alcoóis que são diferenciados entre si pelas substituições que apresentam no anel aromático (álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) (Figura 7).



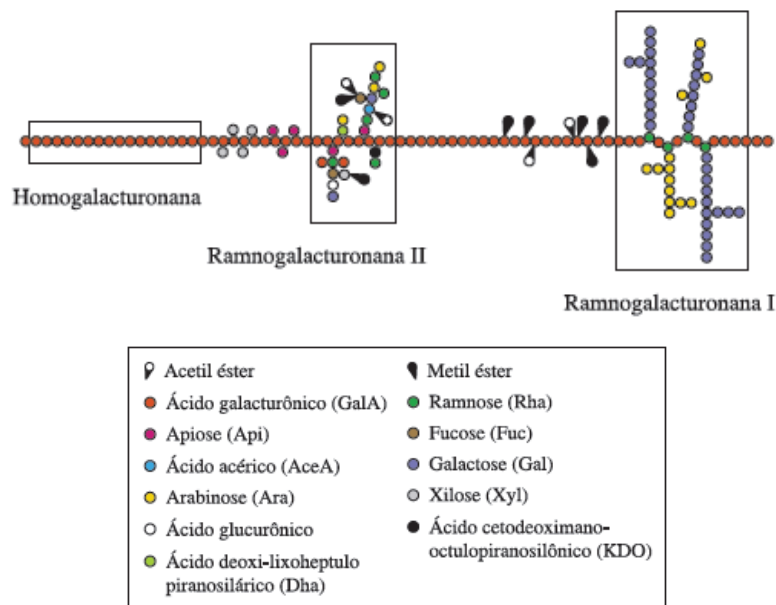
compostos não estão uniformemente distribuídos na parede celular das plantas. A parede secundária contém alta quantidade de celulose, enquanto a lamela média possui maior quantidade de lignina. Entretanto, todos estes três compostos podem ser encontrados em todas as camadas da parede celular vegetal, sendo que a lignina representa de 15 a 25% do total dos materiais lignocelulósicos (Stewart, 2008).

As funções biológicas da lignina são fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares, tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo assim o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares e conferir resistência contra ataques microbianos (Fasanella, 2008).

A lignina representa um dos maiores estoques de carbono da natureza e é, ainda, o maior depósito natural de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química.

### *Pectinas*

A pectina é um dos principais componentes da parede celular vegetal e provavelmente a mais complexa macromolécula encontrada na natureza, pode ser formada por mais de 17 monossacarídeos diferentes a partir de mais de vinte diferentes ligações para formação de uma rede quando unidos, agrupados em diferentes tipos de cadeia, constituídas por ácidos urônicos, hexoses, pentoses e metilpentoses. (Voragen et al. 2009). Diversas unidades estruturais podem estar substituídas por metanol, ácido acético e ácidos fenólicos. Os açúcares podem existir nas formas furanosídicas ou piranosídicas e com diferentes anômeros ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), com diversos tipos de ligações entre os monômeros, tais como  $\alpha(1\rightarrow4)$ ,  $\alpha(1\rightarrow5)$ ,  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow4)$  e  $\beta(1\rightarrow6)$  (Ridley; O'Neill e Mohnen, 2001). A Figura 8 mostra a representação da cadeia pectíca.



**Figura 8:** Representação da cadeia pectínica com suas unidades estruturais (Canteri et al., 2012).

A homogalacturonana (HG) é o mais abundante polissacarídeo pectínico na parede celular, correspondente a cerca de 60-65% do total da pectina. Apresenta unidades de ácido  $\alpha$ -D galactopiranosilurônico em ligações 1 $\rightarrow$ 4 num padrão linear (Voragen et al. 2009).

A ramnogalacturonana I (RG-I) apresenta uma variedade de diferentes cadeias de glucanas (principalmente arabinana e galactana) e está ligada às unidades de ramnose. O comprimento das cadeias pode variar consideravelmente e a composição de açúcares de RG-I pode ser altamente heterogênea, representando 20-35% da pectina. (Voragen et al. 2009).

A ramnogalacturonana II (RG-II) é o segmento estruturalmente mais complexo e compõe 10% da pectina. Essa estrutura, altamente conservada na maior parte das espécies vegetais, consiste de um esqueleto de homogalacturonana de no mínimo oito (provavelmente mais) unidades monoméricas, contendo cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de açúcares (Yapo, 2011).

As pectinas constituem o componente principal da lamela média da parede vegetal e são as frações mais facilmente extraíveis da parede celular, apresentando propriedades de gel (Canteri et al., 2012). Os fatores que envolvem a deposição de pectina durante a formação da parede celular ainda não estão elucidados. Os polissacarídeos pectínicos parecem ser importantes no controle da porosidade da parede e

na adesão de células subjacentes parede celular. Análises de mutações que alteram a estrutura de uma das cadeias de pectina, a ramnogalacturonana II, indicam que alguns tipos de ligações pécticas têm importância também sobre o reforço da parede, a aderência intercelular e o crescimento normal em plantas vasculares. Outra função está ligada aos mecanismos de defesa vegetal (Yapo, 2011).

O ácido galacturônico, unidade básica da pectina, é um componente essencial de elicitores, que são moléculas capazes de induzir resposta de defesa na planta, e encontram-se como fragmentos da parede celular sendo liberados durante processos de infecção para sua minimização (Ridley; O'Neill e Mohnen, 2001).

### ***Outros componentes***

Finalmente, existem outras substâncias presentes na biomassa lignocelulósica que não residem na parede celular da planta sendo a maioria solúvel em solventes neutros e dividem-se basicamente em duas classes. A primeira classe engloba materiais conhecidos como extrativos por serem extraíveis em água, solventes orgânicos neutros ou volatilizados a vapor, correspondendo de 4 a 10% do peso seco da madeira. Nessa classe se incluem uma diversidade de compostos como os terpenos, que são polímeros de isopreno; as resinas, que incluem grande variedade de compostos não voláteis como óleos, ácidos graxos, alcoóis, resinas ácidas, fitosterol, dentre outros; e os fenóis que apresentam como representante principal os taninos. Dentro desta fração de extraíveis podem-se incluir carboidratos de baixo peso molecular, alcaloides e lignina solúvel (Klinke et al., 2004).

A segunda classe são as frações não extraíveis como cinzas, compostos inorgânicos, principalmente carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos, que permanecem depois de queimar os substratos a elevadas temperaturas e representam aproximadamente 2% do peso seco das madeiras (Klinke et al., 2004). Esses constituintes são responsáveis por determinadas características da planta como a cor, o cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e suas propriedades abrasivas.

### ***1.1.2. Enzimas envolvidas na hidrólise de biomassa***

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular. Esses catalisadores são moléculas de proteínas e seu poder catalítico está associado à conformação nativa que depende das condições específicas de pH e temperatura (Medigan et al., 2003).

A biossíntese da enzima pode ser associada ao crescimento sendo então a taxa de formação do produto proporcional ao aumento da biomassa; ou não associada ao crescimento celular, e nesse caso, a taxa de formação do produto é independente da taxa de crescimento celular (Schimidell et al., 2001). Esses biocatalisadores tem a função principal de degradar macromoléculas presentes no meio ambiente como celulose, amido e lignina para absorção de seus componentes como nutrientes.

Na natureza, bactérias e fungos secretam enzimas que degradam a lignocelulose de paredes celulares vegetais de forma sinérgica (Dashtban et al. 2009). As bactérias estão diretamente envolvidas na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes, em transformações bioquímicas específicas como nitrificação e desnitrificação, na fixação biológica de nitrogênio, na produção de substâncias de crescimento e metabólitos bioativos. Os fungos filamentosos geralmente estão associados aos processos de micorrização e na degradação de material lignocelulósico promovendo a ciclagem de nutrientes além de produzirem metabólitos bioativos. A capacidade de secretar grandes quantidade de enzimas extracelulares é características de micro-organismos específicos e somente algumas linhagens produzem as enzimas em níveis mais elevados (Yu et al. 2007). As espécies de fungos mais estudadas que produzem enzimas degradantes da biomassa são: *Trichoderma reesei*; *Penicillium echinulatum*; *Humicola insolens*; *Fusarium solani*; *Esporo-trichum pulverulentum*, *Miceliophytera termophila* e *Aspergillus niger* (Lynd et al., 2002; Zhang et al., 2006; Sanches, 2009; Chandra et al., 2009; Reis et al., 2013). Entre as bactérias produtoras de celulases tem-se a *Cellulomonas fimi*, *Clostridium thermocelum* e *Bacillus subtilis* (Lindy et al., 2002; Sadhu e Maiti, 2013).

Em 2001 Wyman reportou que a obtenção de enzimas a partir de micro-organismos celulolíticos, apresentava em termos econômicos, por volta de 50% do custo global do processo de produção de etanol. No cenário atual, dados recentes sobre o



custo das enzimas são limitados e na maioria das vezes, é contabilizado em termos de dólares/galão (Marcuschamer et al., 2012). Na literatura estimativas do custo de produção da enzima para a produção de etanol 2G podem variar significativamente, incluindo \$0.68/gal (Marcuschamer et al., 2012); \$0.40/gal (Kazi et al., 2010); \$0.30/gal (Lynd et al., 2008); \$0.18/gal (Pradella et al. 2014) e \$0.10/gal (Aden and Foust, 2009). E essa variabilidade nas estimativas do custo das enzimas dificulta a realização de uma análise técnica-econômica robusta para o processo de produção, mas segundo um estudo feito pelo pesquisador do CTBE, Antônio Maria Bonomi o custo do etanol 1G está na faixa de R\$1,05/L e R\$1,25/L, enquanto o custo do 2G está entre R\$1,40/L e R\$1,65/L (Comunicação pessoal). Portanto, baseado no estudo feito por Pradella et al. (2014) em relação ao custo de produção da enzima e utilizando a menor faixa de preço para etanol 2G obtida por Bonomi, a obtenção de enzimas representa 30% do custo global do processo de produção de etanol no cenário atual, representando uma diminuição expressiva de 20% comparado ao estudo reportado por Wyman em 2001.

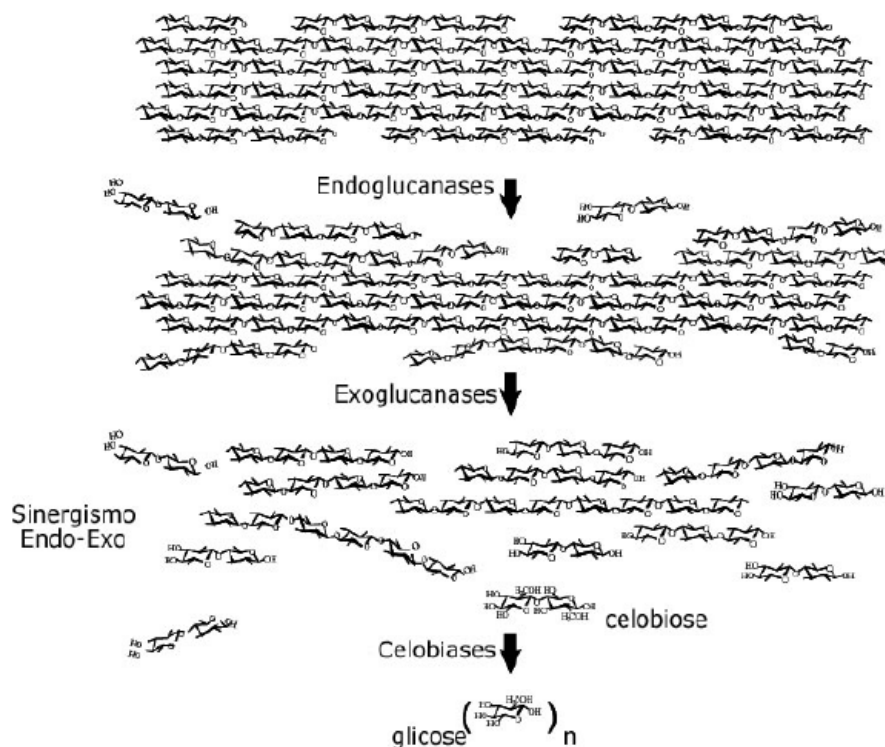
No entanto, até o momento poucos fungos e bactérias produzem altos níveis de enzimas capazes de degradar a biomassa lignocelulósica extensivamente. Essas enzimas incluem as ativas em carboidratos e as oxidativas de ligninas (Cantarel et al., 2009). Vários coquetéis enzimáticos comerciais incluem as principais, celulasas, além de hemicelulasas e pectinases (Ekwe et al., 2013).

- **Celulasas**

Celulasas são enzimas capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. São biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em produtos com maior valor agregado (Zhang et al. 2006).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas. Sua classificação, de acordo com o local de atuação no substrato com critérios estabelecidos pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBM) é dividida em três grandes grupos: endoglucanases (clivam ligações internas da fibra celulósica); exoglucanases (atuam na região externa da celulose) e  $\beta$ -glucosidases

(hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose) (Bayer et al., 1998). E quando estas 3 classes de enzimas atuam conjuntamente, apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, efeito conhecido como sinergia (Kumar e Wyman, 2009). A Figura 9 ilustra o mecanismo de sinergia da ação cooperativa das três classes de enzimas do complexo celulolítico.



**Figura 9:** Mecanismo de ação sinérgico do complexo celulolítico (Martins, 2005).

Endoglucanase, classificada com o EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucano-hidrolase, segundo a IUBMB, sendo também conhecida por carboximetilcelulase (CMCase). As endoglucanases são classificadas nas famílias GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51 e 61, e são responsáveis por iniciar a hidrólise (Cantarel et al., 2009). Hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, quebram as ligações dentro da cadeia de celulose, liberando glicose, celobiose e celodextrinas, criando extremidades não redutoras para subsequente ação das exoenzimas. A endoglucanase é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (Lynd et al. 2002).

As GHs 61 são enzimas oxirredutases que tem recebido grande atenção em estudos de hidrólise enzimática por ter como alvo a celulose cristalina e assim aumentar a acessibilidade das celobiohidrolases (CBHs), pois clivam as ligações glicosídicas por via oxidativa no C1 e C4 da celulose cristalina liberando como produto ácido glucônico e ácido celobiônico que podem ser dosados por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Atualmente, este grupo de enzimas foram reclassificadas no Cazy como atividades auxiliares (AA) da família 9 (Morgenstern et al., 2014). Trabalhos com as AA9 dos fungos *Thermoascus auranticus* e *Neurospora Crassa* mostram que essas enzimas podem causar a quebra da cadeia de celulose pela oxidação das moléculas de anidroglicopiranosose nos carbonos C1 ou C4, formando assim novos terminais para ação das CBHs (Horn et al., 2012). O mecanismo catalítico ainda é um assunto de intensa pesquisa e especulação, contudo sabe-se que a ação dessas enzimas é dependente da presença de íons cobre, oxigênio e um doador externo de elétrons (Horn et al., 2012). Portanto, no caso da biodegradação de materiais lignocelulósicos as AA9 podem obter elétrons devido à degradação da lignina. Uma das preparações comerciais mais conhecidas Celic Ctec 2 produzida pela empresa Novozymes contém quantidades extras de AA9 que contribuem para o melhor desempenho do produto em comparação com as preparações antecessoras (Morgenstern et al., 2014).

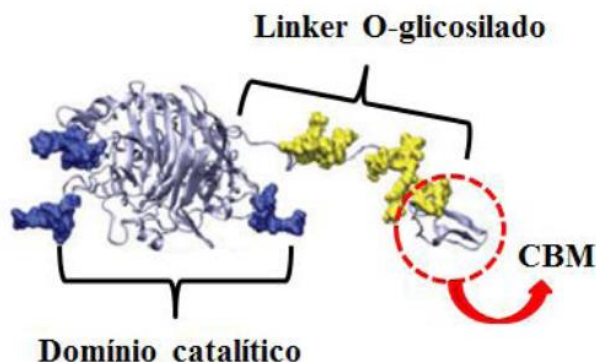
As exoglucanases, também conhecidas por avicelases, têm maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produto. O grupo das exoglucanases é constituído principalmente por celobiohidrolase (CBH). A CBH (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4-β-D-glucanacelobio-hidrolase e hidrolisa os terminais redutores (CBH I) e não redutores (CBH II) da molécula, pertencentes às famílias GH 7 e 6, respectivamente. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (Zhang e Lynd, 2004). As CBHs, quando presentes na mistura, representam muitas vezes, de 50% a 70% de todas as enzimas. A CBH I, em particular, aparece como sendo a enzima mais importante para indústria na conversão da celulose, sendo considerada enzima chave-chave no processo de hidrólise, pois é capaz de hidrolisar a celulose cristalina extensivamente, sendo predominante excretada pela maioria dos micro-organismos produtores de celulases (Beckham et al., 2010).

As exoglucanases não atuam sobre celulosas solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes (Martins, 2005), atuando sobre

celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Deste modo, ensaios de atividade sobre Avicel e papel de filtro caracterizam as exoglucanases, enquanto que para a atividade de endoglucanases usa-se CMC tornando possível a diferenciação entre essas enzimas (Dashtban et al., 2010)

O terceiro grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a  $\beta$ -glucosidase (BGL), com nome sistemático de  $\beta$ -glucosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21), a qual tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Assim como a celobio-hidrolase, sofre inibição por seu produto de hidrólise (Lynd et al., 2002). Por sua vez são classificadas nas famílias GH 1, 3, 30, 43 e 116 (Martinez et al., 2008).

Uma característica essencial da maioria das celulases é ser composta por dois domínios distintos: um pequeno módulo chamado de ligação de celulose (CBM) que é conectado por um “*linker*” (sequência de aminoácidos altamente glicosilados), ao domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo como mostra a Figura 10. O domínio catalítico é a maior parte da enzima que tem como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose pelo sítio ativo e cada classe das enzimas possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato. O CBM tem a função de se ligar na fibra servindo como âncora para a enzima mantendo-o fortemente adsorvida no substrato, permitindo o aumento da concentração das celulases na superfície da celulose através de interações não covalentes (Beckham et al., 2011).

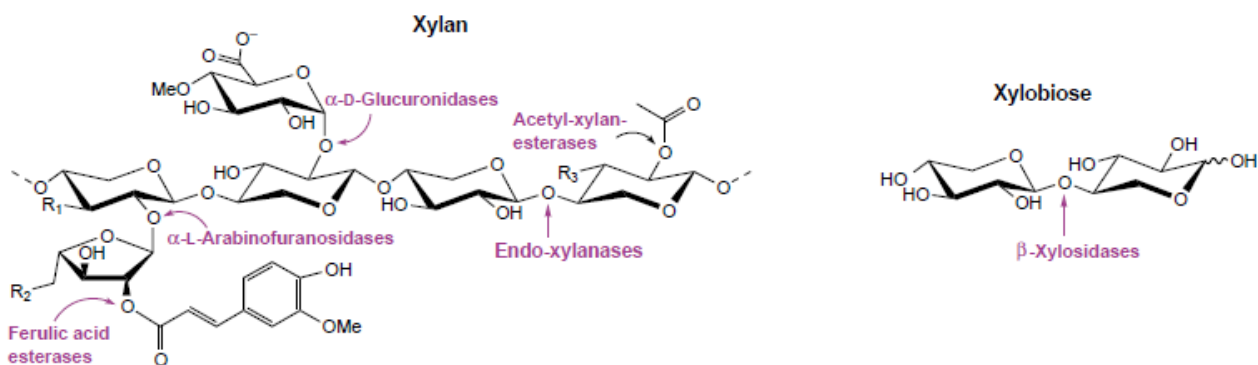


**Figura 10:** Estrutura da enzima CBH I, demonstrando o domínio catalítico, linker e CBM de *Trichoderma* sp. (Adaptado Beckham et al., 2011).

- **Hemicelulases**

As enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal e enzimas que degradam as cadeias laterais. Assim, a hidrólise da hemicelulose produz heteroxilo-oligossacarídeos lineares e ramificados contendo cadeias laterais de arabinofuranosidase, ácido glicurônico ou ácido-O-metil-glicurônico (Shallom e Shoham, 2003).

Devido à complexa estrutura da hemicelulose, diferentes tipos de enzimas são necessárias para sua hidrólise. Um sistema enzimático incluindo endo e exo-xilanase, mananases,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -glicuronidase,  $\alpha$ -arabinofuronosidase torna-se necessário para a hidrólise completa. Sendo as  $\beta$ -1,4- endoxilanase e as  $\beta$ -D-xilosidases as principais enzimas envolvidas (Girio et al, 2010). A Figura 11 ilustra a estrutura da xilana e as hemicelulases responsáveis por sua degradação.



**Figura 11:** Estrutura da xilana e as hemicelulases responsáveis por sua degradação (Shallom e Shoham, 2003).

A enzima  $\beta$ -1,4-endoxilanase (1,4- $\beta$ -D-xilana-xilohidrolase, E.C. 3.2.1.8) provoca a quebra das ligações glicosídicas do esqueleto heteroxilana resultando na diminuição do grau de polimerização do substrato e pertencem às famílias de GH 5,8,10,11 e 43. O ataque ao substrato não é feito ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato como, por exemplo, o comprimento e o grau de ramificação do composto e a presença de substituintes, sendo que os principais compostos formados no

início da hidrólise da xilana são os xilo-oligossacarídeos que serão clivados pela exo-1,4- $\beta$ -D-xilanase (Shallom e Shoham, 2003).

As  $\beta$ -xilosidases ( $\beta$ -1,4-D-xilosídeo-xilo-hidrolase; EC 3.2.1.37) hidrolisam xilo-oligossacarídeos e xilobiose, a partir da extremidade não redutora, liberando resíduos xilopiranosil. Esta enzima sozinha não hidrolisa a xilana e tem maior afinidade pela xilobiose. Sua afinidade aos xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização (Girio et al., 2010). Essas enzimas são capazes de clivar substratos sintéticos como *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNPx). As  $\beta$ -xilosidases estão classificadas nas famílias de GH 3,39,43,52 e 54)

As  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) liberam monômeros terminais de arabinose a partir de oligo e polissacarídeos e são ativas sob *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (pNPaf) e estão classificadas nas famílias GH 3,43,51,54 e 62 (Numan & Bhosle, 2006; Seiboth e Metz, 2011). Já as  $\alpha$ -Glucuronidases (EC 3.2.1.139) hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose na glucuronoxilana e pertencem à família de GH 67 e 115 (Seiboth e Metz, 2011).

- **Pectinases**

As pectinases de origem microbiana apresentam grande importância comercial, correspondendo a 25% do mercado global de enzimas na indústria de alimentos. Estas formam um grupo heterogêneo de enzimas que degradam substâncias pécnicas (Santi et al., 2014).

A classificação das enzimas pécnicas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, principalmente pela preferência de substrato (pectina, ácido pécnico ou protopectina). Existem basicamente três tipos de pectinases: pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) que remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécnicas e, as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (Alkorta et al 1998; Hoondal et al., 2002).

Pectina esterases (EC 3.1.11.1) catalisam a desesterificação de grupos metoxil de galacturonato formando ácido pécnico. Polimetilgalacturonases (PMG) catalisam a clivagem hidrolítica de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas e a ação pode ser endo (preferencial

em pectinas altamente esterificadas) ou exo (em terminações não-redutoras da cadeia de pectina) (Hoondal et al., 2002; Javani et al., 2005).

Poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas em ácido pectínico. As endo-poligalacturonases hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  internas, causando a despolimerização da molécula e liberando oligossacarídeos de ácido poligalacturônico, enquanto que as exo-poligalacturonases removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico (Hoondal et al., 2002; Javani et al., 2005).

Por outro lado, há as polimetilgalacturonato liases (PGML), que catalisam a quebra da pectina com ação endo (catalisando a clivagem randômica de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas) ou exo (com clivagem seqüencial das referidas ligações). Poligalacturonato liases clivam ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas no ácido pectínico por trans-eliminação, por ação endo (catalisando a clivagem randômica das ligações) ou exo (clivagem seqüencial das ligações). (Alkorta et al 1998; Hoondal et al., 2002).

Por fim, as protopectinases solubilizam protopectina formando moléculas de pectina altamente polimerizadas e solúveis (Alkorta et al 1998).

### ***1.1.3. Produção de enzimas microbianas***

As enzimas microbianas podem ser obtidas por cultivo em substratos sólidos, também conhecida por fermentação semi-sólida (FSS) ou em estado sólido (FES), em que se pode utilizar diversos substratos como suportes ou podem ser obtidas por fermentação submersa (FS), cuja definição é de que o meio de cultura, apresenta alto teor de água. Portanto, as principais diferenças entre a FES e FS é que a primeira ocorre com a quantidade de água mínima para o desenvolvimento microbiano e a FS a água pode constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material (Singhania et al., 2010).

Tanto o processo de FES quanto o de FS apresentam características importantes, as quais devem ser levadas em consideração no momento da escolha, sendo necessário avaliar as vantagens e desvantagens em cada processo fermentativo, considerando o tipo de produto desejado, e principalmente, o grupo de micro-organismo a ser utilizado.

A FES é muito atrativa porque simula as condições de vida dos fungos filamentosos, ou seja, os meios sólidos se assemelham aos meios naturais como os solos onde esses fungos se desenvolvem (Brijwani e Vadlani, 2011). No entanto, a FES apresenta desvantagens no processo como dificuldade no controle dos parâmetros da fermentação: pH, temperatura, umidade e crescimento celular (Pandey et al 2000).

Por isso, a FS é o processo mais utilizado industrialmente e apresenta diversas vantagens frente à FES: facilidade de controles dos parâmetros físico-químicos como controle de temperatura devido ao alto teor de água; melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e ainda redução da possibilidade de degradação do produto, principalmente enzimas com baixa termoestabilidade (Brijwani e Vadlani, 2011).

Nos processos submersos as fermentações são conduzidas em biorreatores agitados e aerados mecanicamente podendo ter grandes volumes. Existem muitos tipos de biorreatores disponíveis para a FS, mas a produção de enzimas comerciais é feita predominantemente em sistemas de mistura por agitadores mecânicos internos, dentro de um recipiente cilíndrico fechado constituído de aço inoxidável e contendo um eixo interno com pás para agitação e o controle é feito por dispositivos acoplados (Said e Pietro 2002).

Os processos com cultivo submerso apresentam variações na forma de condução, podendo operar de forma contínua, semi-contínua ou descontínua. No regime contínuo o meio é adicionado de forma contínua e os produtos de fermentação também são continuamente removidos. Já os processos descontínuos podem ser realizados na forma de batelada, isto é quantidades únicas de substrato são fornecidas ao micro-organismo no início do cultivo (*batch*); e de forma batelada alimentada (*fed batch*), em que ocorre a alimentação durante o processo. No processo semi-contínuo a adição de substrato e retirada de produto são efetuadas intermitentemente (Schimidell e Facciotti, 2001).

O processo de fermentação em *fed batch* envolve uma adição lenta de meios com nutrientes, assim pode permitir níveis de nutrientes baixos para minimizar a repressão por metabólitos (Schimidell e Facciotti, 2001). Estudos têm mostrado que essa forma de fermentação diminuem os problemas associados à aeração, agitação, formação de espuma e incrementam a produção das enzimas (Esterbauer et al., 2001).

Portanto, o cultivo submerso de fungos é considerado um processo multicomponente, onde o crescimento celular e a formação de produto são influenciados pelos parâmetros operacionais que envolvem a fermentação: composição de meio de



cultura, temperatura, pH do meio, força de cisalhamento, morfologia do fungo, natureza e concentração do substrato, disponibilidade de nutrientes, presença de indutores, agitação do meio reacional, configuração dos impelidores, quantidade de oxigênio dissolvido, entre outros. E a produção em larga escala de enzimas requer o adequado conhecimento acerca desses parâmetros.

#### **1.1.4. *Trichoderma harzianum***

O gênero *Trichoderma* foi descrito em 1794 por Persoon e Gray, para quatro espécies de fungos e, em 1969, foi realizada a primeira revisão taxonômica e reclassificado por Rifai. A partir daí, um maior número de espécies foi agregado ao gênero, chegando à atualidade com cerca de 83 taxons (espécies, formas e variedades), incluindo *Trichoderma* e *Hypocrea* (Samuels, 2006). No entanto, A taxonomia do grupo mostra-se bastante complexa e artificial, devido à falta de parâmetros mais consistentes na interpretação dos limites interespecíficos. Os caracteres morfológicos tradicionais se apresentam insuficientes para uma descrição estrita e objetiva das espécies incluídas no gênero, análises complementares vêm sendo utilizadas para esclarecer estas questões. Trabalhos apontam para a viabilidade de métodos moleculares, especificamente a utilização de marcadores do tipo RAPD, seqüências específicas do genoma (ITS) e de sistemas enzimáticos (isoenzimas) na análise de relações filogenéticas entre os diferentes agrupamentos ou ‘agregados’, conforme designação de Rifai (1969) (Corabi-Adell, 2004).

*Hypocrea* é o gênero que constitui uma das duas fases, denominada de teleomórfica. Nesta fase, o gênero *Hypocrea* é classificado como ascomiceto da ordem Hypocreales, onde predomina uma etapa sexual. Muitas espécies de *Hypocrea* produzem uma forma anamórfica típica de *Trichoderma* em cultura, enquanto outras espécies produzem anamorfos com padrões de dicotomização de conidióforos mais irregulares não se enquadrando exatamente como *Trichoderma*, mas sim caracterizados diversas vezes como *Gliocladium corda*; *Verticillium nees*, ou *Acremonium* (Bisset, 1991).

A segunda fase, denominada anamórfica, prevalece uma etapa assexual, que parece ser independente da fase teleomórfica, seja em nível de indivíduo ou de população que tendem a produzir dois ou mais tipos de esporos, um dos quais podem ser meióticos, sexuais, chamados de ascósporos. (Harman et al., 2004).

Fungos do gênero anamórfico *Trichoderma* são simbioses endofíticos de plantas, amplamente utilizados como biocontrole de fitopatógenos e como auxiliares no crescimento e rendimento de plantas (Mastouri et al., 2010). O potencial das espécies de *Trichoderma* como bioagente de controle de doenças de plantas foi conhecido em 1930, e, em anos subsequentes, a capacidade para o controle de muitos fitopatógenos foi sendo descoberta (Howell, 2003).

Em termos ecológicos poucos estudos vêm sendo realizados sobretudo em relação à diversidade da espécie, biologia (ciclo vital) e de seu papel na microbiota dos diversos ecossistemas onde sua ocorrência tem sido registrada. Num aspecto geral caracteriza-se por ser um fungo de solo, tipicamente sapróbio, embora também possa ser encontrado parasitando outros fungos (micoparasitismo), denotando, portanto, grande capacidade adaptativa. Utiliza um amplo espectro de compostos como fonte única de carbono e nitrogênio e, normalmente, coloniza solos ácidos, embora também ocorra em solos úmidos e levemente básicos.

As interações parasitárias ou inibitórias que ocorrem entre *Trichoderma* e diversos fungos fitopatogênicos têm sido largamente estudadas e demonstram que vários isolados têm a capacidade de excretar enzimas hidrolíticas como quitinases e  $\beta$ -1,3-glicanases em meios suplementados com laminarina ou quitina (Elad et al., 1982).

A espécie *T. harzianum* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) é um eficiente antagonista de fungos e bactérias, além de produzir esporos e clamidósporos, que podem ser utilizados para o preparo de formulações comerciais (Corabi-Adell, 2004). Apresenta crescimento rápido, sendo vantajosa a sua utilização como agente de biocontrole em larga escala (Ferrigo et al., 2014).

Em meio de cultura, as suas colônias crescem rapidamente, apresentando, inicialmente, superfície lisa e quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas e compactas. A coloração da colônia em vários tons de verde é, normalmente, devido à pigmentação dos conídios e à quantidade de conídios produzidos, podendo ainda ser influenciada pelo pH (potencial hidrogeniônico) do meio de cultura. O micélio é composto por hifas hialinas, muito ramificadas e de parede lisa. Um pigmento amarelo pode ser secretado no ágar, especialmente no meio PDA (Potato Dextrose Agar). Quando cultivado estaticamente o aspecto observado é verde brilhante como mostrado na Figura 12.



**Figura 2:** Crescimento fúngico do fungo *Trichoderma harzianum* em placa de Petri.

Para sobreviver e proliferar dispõe de uma série de mecanismos, além do ataque a outros fungos, como a degradação de carboidratos complexos. Como quitina e  $\beta$ -1,3-glicanas são os principais componentes estruturais das paredes celulares dos fungos, foi sugerido que as hidrolases produzidas pelo *Trichoderma* estão envolvidas na degradação das células de fungos patogênicos, através da alteração nos componentes da parede (Sivan; Chet, 1986). Estudos confirmaram através de bioensaios que as enzimas quitinolíticas endoquitinase e quitobiosidase, extraídas de *T. harzianum*, apresentam atividade anti-fúngica, verificadas pela inibição da germinação de esporos e do alongamento do tubo germinativo (Lorito et al., 1993). Além de mecanismos bioquímicos foi demonstrado por Chang et al. (1997) que genes de plantas relacionados à patogênese podem ser afetados pela presença de seu extrato micelial.

Porém, o uso para degradação de biomassa lignocelulósica ainda é pouco explorado, e são poucos trabalhos que abordam a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* (Castro et al., 2010; Colussi et al., 2011; Delabona et al., 2012; Rubeena et al., 2013; Horta et al., 2014), sendo que a principal espécie utilizada com este propósito é a *Trichoderma reesei*. Interessantemente, Saddler e colaboradores em 1985 já havia comparado os sobrenadantes de culturas de *T. harzianum* E58 e de *T. reesei* Rut C30, que é um hipercelulolítico mutante, encontrando atividade celulolítica ligeiramente mais alta em *T. harzianum*.

O fungo *T. harzianum* P49P11 foi isolado no solo da Floresta Amazônica em 2009 entre 110 espécies de fungos e demonstrou crescimento apenas em celulose microcristalina, se tornando um forte candidato para produção de enzimas degradantes da celulose (Delabona et al. 2012)

A enzima celobiohidrolase I de *T. harzianum* IOC-3844 foi caracterizada bioquímica e biofisicamente por Colussi et al. (2011) e revelou um potencial para aplicações biotecnológicas, mostrando alta atividade contra Avicel. Generoso e colaboradores (2012) clonaram uma endoglucanase III (EGIII) de *T.harzianum* IOC-3844 em *Pichia pastoris* para expressão heteróloga da enzima, e obtiveram altas concentrações de enzima expressas, além de características apropriadas para uso em coquetéis enzimáticos. Horta et al. (2014) delineou o perfil transcriptômico de *T. harzianum* IOC-3844 quando crescido em diferentes substratos (lactose, avicel e bagaço de cana delignificado), permitindo a identificação de sequências de genes com potencial aplicação à hidrólise enzimática. Mello e Polikarpov (2014) clonou CBH1 de *Trichoderma harzianum* e verificou aumento da hidrólise da celulose quando suplementada em coquetel comercial.

Dessa forma, o fungo *Trichoderma harzianum* tem mostrado habilidade de produzir enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal, quando cultivado em materiais lignocelulósicos. Apesar disto ainda faltam estudos que maximizem a excreção dessas proteínas para aumentar a produtividade e diminuir o custo destas enzimas na hidrólise de polissacarídeos que é um dos objetivos deste projeto.

## 1.2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de enzimas envolvidas na degradação da biomassa pelo fungo *Trichoderma harzianum* P49P11 com foco no melhoramento dos processos fermentativos submersos e no uso de ferramentas de biologia molecular para o melhoramento da linhagem fúngica. Para atingir esse objetivo as seguintes etapas foram realizadas:

- 1) Estudo de fontes de carbono indutoras para produção de celulases utilizando frascos agitados;
- 2) Avaliação da influência do pH em cultivo utilizando biorreator e a melhor fonte de carbono para indução obtida em 1);
- 3) Otimização da produção de celulases baseada em diferentes componentes do meio de cultura indutor em biorreator utilizando como ferramenta estatística o planejamento de experimento “mixture design”;
- 4) Estudo do proteoma do sobrenadante de *T. harzianum* P49P11 visando um entendimento das enzimas produzidas.
- 5) Suplementação do coquetel enzimático de *T. harzianum* com enzimas acessórias na hidrólise do bagaço de cana utilizando para compor um coquetel ideal;
- 6) Estudo da melhor fonte de carbono “crescedora” objetivando maior secreção de proteínas para obtenção de um pré-inóculo com maior massa fúngica;
- 7) Avaliação de diferentes estratégias de indução de celulases utilizando diferentes concentrações de pré-inóculo e diferentes concentrações de material celulósico na etapa de indução e posterior confirmação da melhor estratégia utilizando biorreator;
- 8) Estudo de marcadores moleculares para montagem dos cassetes de super expressão dos genes responsáveis pela indução de celulases e xilanses (*xyl1* e *lae1*) e construção dos vetores;
- 9) Estudo de protocolos de transformação para *Trichoderma harzianum* P49P11;

10) *Screening* dos transformantes positivos de *xyl 1* em micro fermentação utilizando bagaço de cana e avaliação do potencial de produção de FPase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase e CMCase;

11) *Screening* dos transformantes positivos de *lae1* em micro fermentação utilizando celulose microcristalina (Celufloc<sup>®</sup>) e avaliação do potencial de produção de FPase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase e CMCase.



## Capítulo II

### **“Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production”**

**Artigo publicado na Revista Bioresource Technology, volume 107, páginas 517–521, ano 2012.**

Neste trabalho foram realizadas diferentes estratégias de indução de enzimas degradantes da biomassa celulósica (celulases, xilanases e  $\beta$ -glicosidase) utilizando diferentes fontes de carbono pela linhagem de *Trichoderma harzianum* P49P11 recentemente isolada da Floresta Amazônica, em frascos agitados. Após seleção da melhor fonte de carbono indutora foi utilizado biorreator para mitigar a influencia do pH e confirmar os resultados de *shaker*. O caldo enzimático obtido na melhor condição em biorreator foi utilizado para avaliar o potencial de hidrólise enzimática em comparação com um sobrenadante fúngico do hipercelulolítico *Trichoderma reesei* Rut C30. Os resultados obtidos nesta etapa se referem aos objetivos 1 e 2 apresentado no item 1.2.1. Os resultados mostraram que a nova linhagem de *T. harzianum* recém isolada tem um grande potencial para produção de celulases “on site”.





## Short Communication

Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase productionPriscila da Silva Delabona<sup>a</sup>, Cristiane Sanchez Farinas<sup>b</sup>, Mateus Ribeiro da Silva<sup>a</sup>, Sindelia Freitas Azzoni<sup>a</sup>, José Geraldo da Cruz Pradella<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Industrial Program, Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory – CTBE, Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, Pólo II de Alta Tecnologia, Caixa Postal 6192, CEP 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil<sup>b</sup> Embrapa Instrumentation, Rua XV de Novembro 1452, CEP 13560-970 São Carlos, São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 October 2011

Received in revised form 8 December 2011

Accepted 9 December 2011

Available online 17 December 2011

## Keywords:

On-site enzyme production

*Trichoderma harzianum*

Cellulase

Submerged fermentation

Sugar cane bagasse

## ABSTRACT

The on-site production of cellulases is an important strategy for the development of sustainable second-generation ethanol production processes. This study concerns the use of a specific cellulolytic enzyme complex for hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. Glycosyl hydrolases (FPase, xylanase, and  $\beta$ -glucosidase) were produced using a new strain of *Trichoderma harzianum*, isolated from the Amazon rainforest and cultivated under different conditions. The influence of the carbon source was first investigated using shake-flask cultures. Selected carbon sources were then further studied under different pH conditions using a stirred tank bioreactor. Enzymatic activities up to 121 FPU/g, 8000 IU/g, and 1730 IU/g of delignified steam-exploded bagasse + sucrose were achieved for cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase, respectively. This enzymatic complex was used to hydrolyze pretreated sugar cane bagasse. A comparative evaluation, using an enzymatic extract from *Trichoderma reesei* RUTC30, indicated similar performance of the *T. harzianum* enzyme complex, being a potential candidate for on-site production of enzymes.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cellulases are glycosyl hydrolases (GH) that play an important role in the bioconversion of cellulosic materials into biofuels. The major bottleneck for a wider application of cellulases in second-generation ethanol production is their cost, especially because large quantities of the enzymes are required (Zhang et al., 2006). Despite the reduction in costs of commercial enzymes (claimed by the industry), the production know-how remains a strategic issue to be considered during the development of a sustainable process for ethanol production from biomass. Besides, the effectiveness of the enzymatic mixture for hydrolysis is highly dependent on the feedstock and the pretreatment that it has received. It is therefore logical to try to produce, on-site, tailor-made enzymatic mixtures that are optimized for the specific pretreated feedstock to be processed. Furthermore, the use of the same material for enzyme production and hydrolysis could reduce the production costs of second-generation ethanol, since both processes could be co-located and share infrastructure and utilities. Moreover, cultivation of the microorganisms using the same lignocellulosic material that is intended to be hydrolyzed could be a way of

selecting for the production of enzymes that are optimal for the hydrolysis of that specific material (Jorgensen and Olsson, 2006; Sorensen et al., 2011).

For on-site cellulase production, the selection of fungal strains possessing high expression capacities and a diversity of cellulolytic enzymes with high specific activity is essential in order to obtain enzyme complexes able to hydrolyze plant biomass at reduced cost (Lynd et al., 2002). In addition to the selection of fungal strain, the level of expression of cellulases is determined by the composition of the medium and the growth conditions. The metabolic processes of the microorganisms are influenced to a great extent by changes of temperature, pH, substrate and aeration, as well as by the inoculum concentration, and optimal culture conditions vary widely between species of the same organism.

The objective of the present work was to develop a procedure for on-site production of a highly effective cellulolytic enzyme complex to be used in the hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. The production of glycosyl hydrolases (FPase, xylanase, and  $\beta$ -glucosidase) was studied using a new strain of *Trichoderma harzianum*, isolated from the Amazon rainforest and cultivated under different process conditions. The influence of the type of carbon source was investigated using shake flask cultures, after which the selected substrates were studied further under different pH conditions using a stirred tank bioreactor. The enzymatic complex was then used to hydrolyze pretreated sugar cane bagasse.

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 3518 3124; fax: +55 19 3518 3104.

E-mail address: [jpradella@bioetanol.org.br](mailto:jpradella@bioetanol.org.br) (J.G.C. Pradella).

**Table 1**  
Influence of different carbon sources and their combinations on the production of FPase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase and total protein by *T. harzianum* P49P11 during submerged fermentation in flasks. The optimum cultivation times are indicated.

Substrate	FPase (FPU/mL h)	Xylanase (IU/mL h)	$\beta$ -Glucosidase (IU/mL h)	Total protein (mg/mL h)
SB	0.78–96	36.96–96	9.18–96	0.56–120
DSB	0.50–72	5.69–96	1.21–72	0.53–96
Sucrose	0.42–96	22.24–72	5.48–120	0.55–72
Glycerol	0.12–120	4.34–96	1.25–120	0.27–120
Lactose	0.22–72	23.47–72	1.73–120	0.29–120
FOS	0.43–96	23.27–72	4.11–72	0.65–72
SB + sucrose	0.85–72	33.13–96	7.37–72	0.50–96
SB + glycerol	0.22–48	5.32–120	0.38–72	0.26–96
SB + lactose	0.35–72	17.92–96	4.84–120	0.45–120
SB + FOS	0.69–48	24.02–72	0.44–72	0.31–120
DSB + sucrose	0.46–96	15.02–72	1.50–96	0.27–96
DSB + glycerol	0.32–96	7.22–96	0.50–72	0.29–120
DSB + lactose	0.48–72	14.20–72	1.09–72	0.32–120
DSB + FOS	0.60–72	17.53–72	0.88–96	0.27–96

SB: steam-pretreated bagasse; DSB: bagasse pretreated using steam followed by delignification with NaOH; FOS: fructooligosaccharide.

**Table 2**  
Production of FPase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase and total protein by *T. harzianum* P49P11 using submerged fermentation in a bioreactor. The pH was fixed (at 5.0 or 6.0) or allowed to fluctuate.

Substrate/pH	FPase (FPU/mL)	Xylanase (IU/mL)	$\beta$ -Glucosidase (IU/mL)	Total protein (mg/mL)
SB				
pH 5.0	0.73	29.69	5.22	0.45
pH 6.0	0.80	63.41	10.21	0.43
LTF	0.57	20.82	4.82	0.52
DSB				
pH 5.0	0.80	58.00	15.65	0.59
pH 6.0	0.95	51.00	11.33	0.54
LTF	0.98	12.49	9.42	0.74
SB + sucrose				
pH 5.0	0.82	34.72	10.09	0.57
pH 6.0	0.84	83.00	15.56	0.52
LTF	0.89	36.73	8.45	0.64
DSB + sucrose				
pH 5.0	1.21	80.00	17.32	0.83
pH 6.0	1.01	86.00	16.83	0.71
LTF	1.02	30.11	15.04	0.76

LTF: "left to float" fluctuating pH procedure; SB: steam-pretreated bagasse; DSB: bagasse pretreated using steam followed by delignification with NaOH.

## 2. Methods

### 2.1. Microorganisms

The *T. harzianum* strain (P49P11) was isolated by screening 100 soil and decomposed wood samples from the Amazon forest reserve of Embrapa (Belém, PA – Brazil) using crystalline cellulose (Avicel) (Sigma, St. Louis, USA) as the only source of carbon. The *Trichoderma reesei* RUT C30 strain utilized was from the American Type Culture Collection. Stock cultures were stored at 4 °C on potato dextrose agar (PDA) (Difco™, Detroit, USA) slants. The fungi were grown on PDA plates (90 × 15 mm) at 29 °C for 7 days.

### 2.2. Pre-culture and production media

The composition of the pre-culture medium was adapted from Mandels and Weber (1969) using 10 g/L of glucose as carbon source. The pH was adjusted to 5.0 and the culture medium was sterilized at 121 °C for 20 min. The composition of the production medium was the same as that of the pre-culture medium, except for the type of carbon source. Two different insoluble carbon sources were evaluated: sugar cane bagasse pretreated using steam (designated here as SB) and delignified

sugar cane bagasse (designated as DSB), which were prepared and characterized according to Rocha et al. (2012). The sugar cane bagasse was from a local mill (Usina Vale do Rosário, Orlandia, SP, Brazil). The compositions of the materials in terms of cellulose, hemicellulose and lignin were, respectively,  $51.7 \pm 0.6$ ,  $8.9 \pm 0.1$ , and  $34.3 \pm 0.3$  for SB and  $89.5 \pm 1.6$ ,  $3.4 \pm 0.3$ , and  $5.5 \pm 0.2$  for DSB. The two types of pretreated bagasse were combined with the following soluble carbon sources: sucrose, lactose, glycerol, and a fructooligosaccharide (FOS) (Nutraflora®, Corn Products, Brazil). All other chemicals used were of at least analytical grade.

### 2.3. Shake flask cultures

A conidia suspension, prepared by adding 20 mL of sterilized distilled water and Tween 80 to the grown PDA plates, was transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 mL of pre-culture medium and incubated for 72 h at 29 °C on a rotary shaker at 250 rpm. A volume of 20 mL of this pre-culture was transferred to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of the production medium. Two sets of experiments were performed. The carbon sources (SB, DSB, sucrose, glycerol, lactose, and FOS) were first used individually, after which a second set of experiments were carried out using mixtures of SB or DSB with either

sucrose, glycerol, lactose and FOS in the ratio 3:1 (w/w), selected in a preliminary study (data not shown). The flasks were incubated at 29 °C for 120 h on a rotary shaker at 250 rpm. Samples were removed for determination of enzyme activities, as well as protein content, as described below.

#### 2.4. Stirred tank bioreactor cultures

A 3.0 L BioFlo 115 Fermenter (New Brunswick Scientific Co., USA), equipped with automatic control of temperature, pH, agitation rate and aeration rate, was inoculated with 10% (v/v) inoculum from the pre-culture. The carbon sources selected in the shake flask culture tests were used for the fermentation experiments carried out in the bioreactor. The working volume of enzyme solution was 1.5 L and the temperature was maintained at 29 °C. The aeration rate was adjusted so as to not let the dissolved O<sub>2</sub> level in the culture medium drop below 30% of air saturation. The pH was controlled at pre-set values using either 0.4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or aqueous NH<sub>4</sub>OH solution (1:3). Foaming was controlled by using polypropylene glycol antifoaming agent (P2000, Dow Chemical, Brazil), at initial concentration of 1 mL/L. Samples were periodically removed, centrifuged at 10,000g for 20 min (at 10 °C) and measurements made of the enzyme activities, as well as protein content, as described below.

#### 2.5. Analytical measurements

The filter paper activity (FPase) was determined as described by Ghose (1987), with modifications to diminish the scale of the procedure by a factor of ten. Xylanase activity was determined by the method described by Bailey and Poutanen (1989). Reducing sugar was measured by the DNS method (Miller, 1959). The activity of  $\beta$ -glucosidase was measured using *p*-nitrophenol- $\beta$ -D-glucoside (Sigma-Aldrich, USA), according to Zhang et al. (2009). Total protein was measured in micro plates using Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, USA), using a procedure based on the Bradford method (Bradford, 1976). Bovine serum albumin was used as standard.

#### 2.6. Enzymatic hydrolysis

The pretreated sugar cane bagasse (SB and DSB) was subjected to enzymatic saccharification using an enzymatic cocktail from *T. harzianum* that contained 0.69 FPU/mL of cellulase, 47.2 IU/mL of xylanase, and 9.71 IU/mL of  $\beta$ -glucosidase, obtained by bioreactor fermentation using DSB and sucrose (3:1) as substrate. A comparison was made with the enzymatic cocktail from *T. reesei* RUT C30, which contained 0.82 FPU/mL of cellulase, 42.7 IU/mL of xylanase and 5.81 IU/mL of  $\beta$ -glucosidase, obtained by bioreactor fermentation using DSB as substrate (the extract obtained by *T. reesei* RUT C30 fermentation using DSB and sucrose did not show any significant cellulase activity). The enzymatic hydrolysis experiments were performed at 50 °C and 250 rpm in 50 mL conical shake flasks, with 1.0 g of either SB or DSB suspended in 20 mL of 50 mM sodium citrate buffer (at pH 4.8) containing 1.0 mg of sodium azide. For both enzyme preparations, the enzyme/pretreated biomass loading ratio was equivalent to 10 FPU/g. In the case of *T. harzianum* this was equivalent to 6.8 mg protein/g-glucan and for *T. reesei* RUT C30 this was equivalent to 5.0 mg protein/g-glucan. During the experiments, samples were periodically withdrawn and centrifuged at 10,000g for 20 min at 10 °C. Carbohydrate concentrations were determined by HPLC, as described by Rocha et al. (2012). The yields of glucose and xylose were calculated from the theoretical carbohydrate contents of SB and DSB. Hydrolysis

experiments were carried out in triplicate, and the data were calculated as means  $\pm$  standard deviation.

### 3. Results and discussion

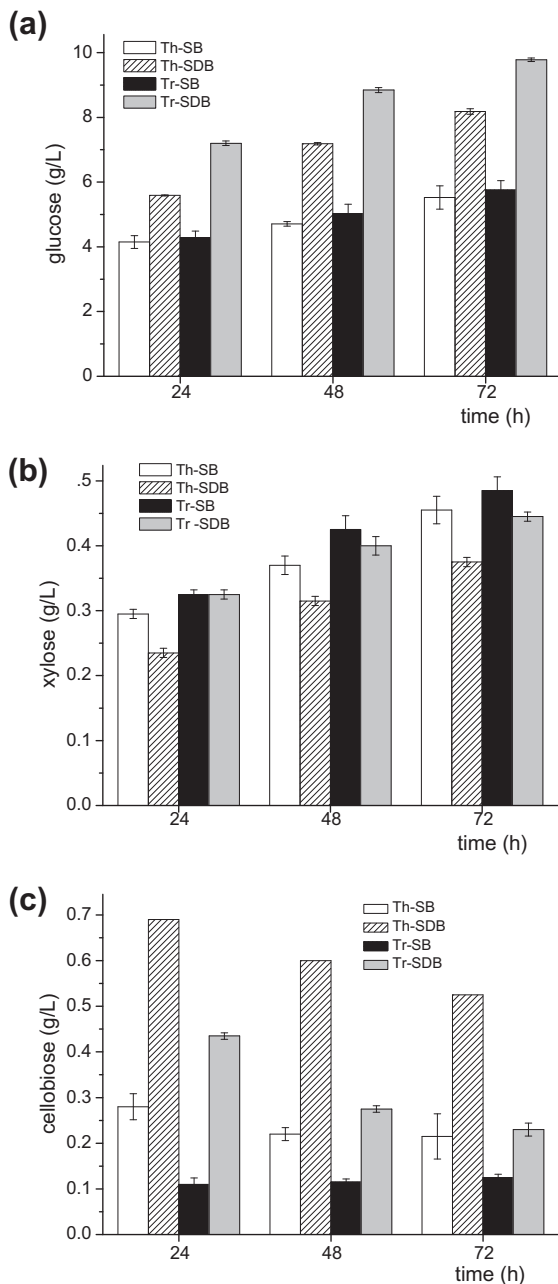
#### 3.1. Effect of carbon source on cellulase production in shake flask cultures

*T. harzianum* was initially grown in shake flasks in order to evaluate the influence of the carbon source on enzyme production. Insoluble carbon sources (SB and DSB), soluble carbon sources (FOS, sucrose, lactose, and glycerol) and their binary combinations were used at concentrations of 1% (w/v). Table 1 shows the maximum FPase,  $\beta$ -glucosidase, and xylanase activities achieved for *T. harzianum* cultivated in shake flasks for 120 h using different carbon sources.

Individual evaluation of the carbon sources (SB, DSB, sucrose, lactose, glycerol, and FOS) revealed that use of sugar cane bagasse pretreated by steam explosion (SB) resulted in the highest production of FPase (0.78 FPU/mL), xylanase (36.96 IU/mL) and  $\beta$ -glucosidase (9.18 IU/mL) after 96 h of cultivation (Table 1). The enzyme production efficiency was greater for pretreated bagasse type SB than for type DSB, contrary to expectations. It has previously been found that delignification can improve yields during hydrolysis, probably because it reduces the adsorption of cellulolytic enzymes onto the lignin fraction of the biomass (Berlin et al., 2005). This would also be expected for enzyme production, since the large amount of lignin in SB, equivalent to around 34% of the dry weight of the material, could irreversibly adsorb the enzymes produced during fungal cultivation. The use of soluble substances (sucrose, lactose, glycerol or FOS) as sole carbon sources resulted in lower FPase, xylanase, and  $\beta$ -glucosidase activities, compared to the use of SB or DSB (Table 1). Nevertheless, cultivation using sucrose and FOS appeared to induce cellulase biosynthesis (Table 1). Lactose, which is known to be a good inducer of cellulase biosynthesis in *T. reesei*, did not improve production of this enzyme by *T. harzianum* P49P11, with activity values lower than 0.2 FPU/mL. However, lactose was able to induce xylanase activity at levels similar to those obtained using sucrose and FOS (Table 1). Growth on glycerol, resulted in negligible GH activities.

A separate set of experiments were carried out in order to evaluate the effect of combining the soluble carbon sources with SB or DSB (Table 1). Sucrose was the soluble carbon source supplement that had the most significant positive effect on GH biosynthesis. A combination of sucrose with SB reduced the time required to achieve maximum FPase activity (ca. 0.8 FPU/mL) from 96 to 72 h. The presence of FOS together with SB in the culture medium also showed a positive effect on FPase activity. Combination of DSB with sucrose, lactose, and FOS increased xylanase activity from less than 6 IU/mL, when DSB was used alone, to more than 15 IU/mL for the mixtures.

In addition to the type of carbon source, GH biosynthesis is tightly regulated by the pH of the environment. Ahmed et al. (2009) found that a pH of 5.5 maximized the cellulase activity of *T. harzianum*. Differences in the pH profiles during the experiments with SB and DSB could have influenced the results. The pH of the culture medium was adjusted to 5.0 after sterilization, however during the experiments the DSB culture medium showed a pH profile (in the range 4.0–5.5) that was more acidic than that obtained using SB (pH 5.0–5.5). The higher acidity using DSB could therefore have contributed to the lower GH activity. Tangnu et al. (1981) demonstrated that cellulase production decreased at pH values below 5.0, while control of pH at 6.0 benefitted  $\beta$ -glucosidase activity. The experiments conducted using the bioreactor appeared to corroborate these findings, as discussed below (Section 3.2).



**Fig. 1.** Hydrolysis of 5% (w/v) steam-pretreated bagasse (SB) and bagasse pretreated by steam followed by delignification with NaOH (DSB), at pH 4.8 and 50 °C, using enzyme cocktails produced by *T. harzianum* P49P11 and *T. reesei* RUT C30: (a) glucose concentration; (b) xylose concentration; (c) cellobiose concentration.

### 3.2. Effect of pH and sucrose addition using a stirred tank bioreactor

In order to further investigate the previous results in a more controlled environment, a set of experiments were run using 3 L laboratory-scale bioreactors. The effect of pH on enzyme production was evaluated using three different conditions: pH fixed at 5.0; pH fixed at 6.0; and pH allowed to fluctuate in the range 5.0–6.0. Table 2 summarizes the results obtained, showing the maximum enzymatic activities for FPase,  $\beta$ -glucosidase, and xylanase, as well as the total protein concentrations. Enzyme activities and protein concentrations generally reached maximum values after 72 h of cultivation. In contrast to the findings of the shake flask experiments, DSB performed better than SB as cellulase inducer. As mentioned before, in the shake flask experiments the pH

profile was more acidic for DSB than for SB, which contributed to the poorer performance of the former carbon source. In the bioreactor experiments, however, the best results were achieved with DSB instead of SB, probably due to control of the pH. A pH of between 5 and 6 appeared to be favorable for enzyme production, as observed previously using both shake flasks (Sternberg, 1976) and a controlled-pH bioreactor (Tangnu et al., 1981).

It is also important to mention that the fluctuating pH procedure (Table 2) did not significantly improve GH biosynthesis for this *T. harzianum* strain, in contrast to results obtained for bioreactor cultivation of *T. reesei* (Kadam, 1996; Tangnu et al., 1981), where a pH fluctuating above 5.0 benefitted enzyme production. In the present system, there was no significant difference in enzyme production using pH controlled at fixed values of either 5.0 or 6.0. Operating the culture at pH 5.0 is preferred to 6.0 because it helps to prevent microbial contamination.

Calculated cellulase productivities and carbon source-cellulase yield factors at pH 5.0 were 11.1 FPU/L h and 80 FPU/g, respectively, using DSB. The values obtained using SB were 10.1 FPU/L h and 73 FPU/g, respectively. Increases in protein synthesis and enzyme activities were obtained when DSB and SB were supplemented with sucrose at a 3:1 ratio of pretreated bagasse to sucrose (Table 2). Calculated cellulase productivities and carbon source-cellulase yield factors were 16.8 FPU/L h and 121 FPU/g, respectively (DSB + sucrose), and 11.4 FPU/L h and 82 FPU/g, respectively (SB + sucrose). The results obtained in the bioreactor experiments appeared to support the findings of the shake flask cultivations. For most of the bioreactor cultivations, supplementation with sucrose improved almost all of the measured parameters, either increasing the maximum attainable GH values or increasing the rate of GH biosynthesis, showing that sucrose addition can be used to enhance GH activity in *T. harzianum*.

### 3.3. Hydrolysis experiments

Fig. 1 presents the temporal profiles of the concentrations of glucose, cellobiose, and xylose, using the *T. harzianum* and *T. reesei* RUT C30 enzyme preparations with the pretreated SB and DSB substrates. The amounts of glucose released were very similar for both enzyme extracts. In 72 h of saccharification, the *T. harzianum* extract was able to release 5.5 g/L of glucose from SB and 8.18 g/L from DSB, while the enzymatic extract produced by *T. reesei* RUT C30 released 5.8 and 9.7 g/L of glucose from SB and DSB, respectively (Fig. 1a). The released glucose concentrations were higher for DSB than for SB, however in terms of the glucose yield after 72 h of hydrolysis, calculated from the cellulose contents of SB and DSB, the values were not very different. The yields obtained using SB and DSB were 19.4% and 16.6%, respectively (*T. harzianum*), and 20.6% and 19.9%, respectively (*T. reesei* RUT C30).

The xylanase activities of both cocktails were very similar, at 47.2 and 42.7 IU/mL for *T. harzianum* and *T. reesei* RUT C30, respectively, resulting in profiles of xylose liberation from DSB and SB that were almost identical for the two fungi (Fig. 1b). However, the xylose yield after 72 h of hydrolysis, calculated from the fraction of hemicellulose remaining in the pretreated material, was much higher for DSB than for SB, for both of the enzymatic cocktails, showing that the delignification procedure favored the release of xylose. The yields using DSB and SB were 20.0% and 9.3%, respectively (*T. harzianum*), and 24.0% and 9.8%, respectively (*T. reesei* RUT C30). It is well known that the removal of lignin from biomass enhances enzymatic hydrolysis (Berlin et al., 2005). This was probably the main reason why the xylose yield was higher for DSB. However, this was not the case for glucose.

There was a higher accumulation of cellobiose using *T. harzianum* than using *T. reesei* RUT C30, for both types of biomass (Fig. 1c), despite the fact that the  $\beta$ -glucosidase/FPase ratio for

the former (14.1 IU/FPU) was two times higher than for *T. reesei* RUT C30 (7.1 IU/FPU). It is conceivable that there may be a difference in the kinetic behavior and/or stability of  $\beta$ -glucosidase between the two fungal species. Overall, the results of the hydrolysis experiments indicated that the enzymatic cocktail produced by *T. harzianum* compared very favorably with the enzymes produced by *T. reesei* RUT C30.

#### 4. Conclusions

This new strain of *T. harzianum* isolated from the Amazon rain-forest appeared to be a potential candidate for enzyme production using sugar cane bagasse and sucrose as carbon sources. Both of these materials are in ready supply in a bioethanol production plant. This new strain showed an interesting ability of producing cellulase when grown on sucrose, suggesting that it might be less prone to carbohydrate repression than other *Trichoderma* strains. The use of a low value intermediate of the biofuel production process as carbon source for microbial growth was shown to be an effective strategy, offering an alternative option for on-site production of enzymes.

#### Acknowledgements

The authors thank Embrapa (São Carlos, Brazil) and the technical staff of the National Laboratory of Science and Technology of Bioethanol (CTBE).

#### References

Ahmed, S., Bashir, A., Saleem, H., Saadia, M., Jamil, A., 2009. Production and purification of cellulose degrading enzymes from a filamentous fungus *T. harzianum*. Pak. J. Bot. 41, 1411–1419.

- Bailey, M.J., Poutanen, K., 1989. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 5–10.
- 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. Enzyme Microb. Technol. 37, 175–184.
- Bradford, M.M., 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.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulose activities. Pure Appl. Chem. 59, 257–268.
- Jorgensen, H., Olsson, L., 2006. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 – effect of substrate on hydrolytic performance. Enzyme Microb. Technol. 38, 381–390.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 506–577.
- Kadam, K., 1996. Cellulase production. In: Wyman, C. (Ed.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor and Francis Publisher, pp. 231–252.
- Mandels, M., Weber, J., 1969. The production of cellulases. Adv. Chem. Ser. 95, 391–414.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426–428.
- Rocha, G.J.M., Gonçalves, A.R., Oliveira, B.R., Olivares, E.G., Rossell, C.E.V., 2012. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugar cane bagasse for bioethanol production. Ind. Crops. Prod. 35, 274–279.
- Sorensen, A., Teller, P.J., Lubeck, P.S., Ahring, B.K., 2011. Onsite enzyme production during bioethanol production from biomass: screening for suitable fungal strains. Appl. Biochem. Biotechnol. 164, 1058–1070.
- Sternberg, D., 1976.  $\beta$ -glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. Appl. Environ. Microbiol. 31, 648–654.
- Tangnu, S.K., Blanch, H.W., Wilke, C.R., 1981. Enhanced production of cellulase, hemicellulase and  $\beta$ -glucosidase by *Trichoderma reesei* (RUT C-30). Biotechnol. Bioeng. 23, 1837–1849.
- Zhang, Y.-H.P., Hong, J., Ye, X., 2009. Cellulase assays. Method Mol. Biol. 581, 213–231.
- Zhang, Y.-H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnol. Adv. 24, 452–481.

## Capítulo III

### **Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation**

**Artigo publicado na Revista Bioresource Technology, volume 132, páginas 401–405, ano 2013.**

Os resultados obtidos neste trabalho referem – se ao objetivo 3 do item 1.2.1. Nesta etapa do trabalho foi avaliada a influência de diferentes componentes do meio de cultivo (bagaço de cana explodido e deslignificado, sacarose e farelo de soja) na biossíntese de glico-hidrolases por *Trichoderma harzianum* P49P11 usando como ferramenta estatística o planejamento experimental de misturas “mixture design”. A partir do melhor meio encontrado no planejamento foi estudado o efeito do aumento da concentração da fonte de carbono e sua influência no aumento da produção de enzimas.





Short Communication

## Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation

Priscila da Silva Delabona<sup>a</sup>, Cristiane Sanchez Farinas<sup>b</sup>, Deise Juliana da Silva Lima<sup>a</sup>, José Geraldo da Cruz Pradella<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory – CTBE, Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, Pólo II de Alta Tecnologia, Caixa Postal 6192, CEP 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup>Embrapa Instrumentation, Rua XV de Novembro 1452, CEP 13560-970 São Carlos, São Paulo, Brazil

### H I G H L I G H T S

- ▶ Glycosyl hydrolases (GH) play a vital role in the conversion of biomass into biofuels.
- ▶ Experimental mixture design is a powerful tool in bioprocess development.
- ▶ Growth conditions can significantly influence GH biosynthesis.
- ▶ The Amazon rainforest *T. harzianum* strain is a useful candidate for GH production.

### A R T I C L E I N F O

**Article history:**

Received 31 August 2012  
 Received in revised form 19 November 2012  
 Accepted 20 November 2012  
 Available online 29 November 2012

**Keywords:**

Glycosyl hidrolase  
 Cellulases  
 Xylanases  
 Biofuels  
 Bioreactor

### A B S T R A C T

This work investigates the glycosyl hydrolase (GH) profile of a new *Trichoderma harzianum* strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation. The influence of different medium components (delignified steam-exploded sugarcane bagasse, sucrose, and soybean flour) on GH biosynthesis was assessed using experimental mixture design (EMD). Additionally, the effect of increased component concentrations in culture media selected from the EMD was studied. It was found that a mixed culture medium could significantly maximize GH biosynthesis rate, especially for xylanase enzymes which achieved a 2-fold increment. Overall, it was demonstrated that *T. harzianum* P49P11 enzymes have a great potential to be used in the deconstruction of biomass.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Glycosyl hydrolases (GH) play a vital role in the conversion of biomass into small chemical building blocks, which can be used to produce biofuels and other important intermediary molecules (Sheehan and Himmel, 1999). GH comprise a pool of enzymes that include cellulases, hemicellulases, and other accessory enzymes that are required for efficient biomass hydrolysis (Gottschalk et al., 2010). Filamentous fungi of the genera *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus*, amongst others, have been cultivated for GH production (Singhania et al., 2010). It has been previously re-

ported that GH expression in filamentous fungi generally requires induction (Aro et al., 2005). Lignocellulosic materials may be used as the carbon source component of culture media, for either growth or induction of cellulase/hemicellulase enzyme complexes in filamentous fungi. This is a potential strategy for so-called on-site enzyme production, and can decrease the cost of enzyme production (Delabona et al., 2012a; Sorensen et al., 2011).

It has also been suggested that use of the enzymes secreted from filamentous fungi grown on lignocellulosic material could be a possible means of modulating the enzyme complex produced using a variety of agricultural residues (Delabona et al., 2012b; Sukumaran et al., 2009). However, due to the intricate regulation of fungal cellulolytic enzyme systems, and the complex nature of residual lignocellulosic materials, the physiological responses of fungi, in terms of type of secreted enzyme, enzyme titers, rate of biosynthesis, and so on, are quite variable. Appropriate studies

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 35183124; fax: +55 19 35183104.  
 E-mail address: [jpradella@bioetanol.org.br](mailto:jpradella@bioetanol.org.br) (J.G. da Cruz Pradella).

of this behavior, using complex lignocellulosic materials such as agricultural residues, must therefore be undertaken for the different filamentous fungi strains used for GH biosynthesis. Experimental mixture design (EMD) is a convenient statistical technique for bioprocess development such as studies of culture media selection (Rispoli and Shah, 2007) and optimization of enzyme mixture for biomass enzymatic hydrolysis (Suwannarangsee et al., 2012). The methodology is attractive because it can be molded to study the proportion of the components in a given culture medium, and can aid identification of the relationships amongst these components during GH production.

The present work investigated the GH kinetic profile of a new *T. harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation. The influence of components (delignified steam-exploded sugarcane bagasse, sucrose, and soybean flour) on GH biosynthesis was assessed using experimental mixture design. Additionally, the effect of increased component concentrations in culture media selected by EMD was studied, with the objective to improve GH production by *T. harzianum* P49P11 cultivated under submerged fermentation.

## 2. Methods

### 2.1. Microorganism

The *T. harzianum* P49P11 strain was isolated as reported previously (Delabona et al., 2012b). Stock cultures were stored at 4 °C on potato dextrose agar (PDA) slants. The fungus was grown in PDA plates at 29 °C for 7 days.

### 2.2. Lignocellulosic materials

Pretreated sugarcane bagasse (DEB) was prepared by the steam explosion technique followed by delignification with NaOH, using a solid–liquid ratio of 1:10 (*w/v*) (Rocha et al., 2012). The suspension was filtered, thoroughly washed with water until neutral pH was attained, dried at room temperature, milled, and classified (using a 35 mesh sieve). DEB composition was assessed according to Rocha et al. (2012), and was as follows (% of dry weight): cellulose 77.89 ± 0.23%; hemicellulose 7.09 ± 0.11%; lignin 16.22 ± 0.02%; ash 4.91 ± 0.08%. The composition of soybean flour (SF) (Agricola, São Carlos, Brazil) has been estimated by (Rodriguez-Zuniga et al., 2011) as follows (% of dry weight): protein 43.22%; cellulose 34.59%; hemicellulose 18.13%; lignin 9.78%.

### 2.3. Submerged cultivation conditions

All cultivations were carried out in a Bioflo 115 bioreactor (New Brunswick Scientific, CT, USA) with a working volume of 1.2 L, at 29 °C and pH 5.0 (controlled using 0.4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and aqueous NH<sub>4</sub>OH solution, in a 1:4 ratio), and with a dissolved oxygen concentration above 30% of air saturation. The bioreactor was equipped with a Rushton impeller with three flat blades, and the aeration rate was fixed at 0.6 L/min. A conidia suspension was prepared by adding 20 mL of sterilized distilled water and Tween 80 to a 7 day culture grown on PDA plate, and transferred to 50 mL of MM culture media adapted from (Mandels and Weber, 1969). The inoculum was prepared with MM supplemented with 10 g/L each of glucose and Celufloc microcrystalline cellulose (Celuflok Ind. Com., Brazil). The Erlenmeyer flasks were incubated for 72 h at 200 rpm and 29 °C. A volume equal to 10% of the inoculum was transferred to previously sterilized culture medium in a lab-scale bioreactor containing MM with various amounts of the components studied (delignified steam-exploded bagasse (DEB), sucrose (SUC), and soybean flour (SF)). During the experiments,

samples were withdrawn, centrifuged (10,000g, 20 min, 10 °C), and the supernatant was analyzed in terms of its cellulase (FPase), xylanase, and β-glucosidase activities, and protein content, as described below.

### 2.4. Effect of component presence in the culture media

Assessment was made of the effects of the presence of the three test components in the culture media. The components studied were delignified steam-exploded bagasse (DEB), sucrose (SUC), and soybean flour (SF), and their concentrations in the culture media were established using experimental mixture design (EMD). EMD was set up as a simplex centroid design for three components at a fixed total concentration of 10 g/L. The design comprised 10 experiments, including 3 center point experiments. The randomized design table for these experiments is presented in Table 1. The remaining MM culture medium components were always the same, and the culture conditions were as described above. All the EMD design and analysis was performed with Minitab (Release 14) statistical software (Minitab Inc., USA).

### 2.5. Effect of concentration increment

The effect of incrementing the component concentrations was investigated by performing cultivations using the initial concentrations of the culture medium components (DEB, SUC, and SF) as well as concentrations that were increased 2, 3, and 4-fold. Experiments using the culture medium with DEB = 10 g/L (run 5, Table 1) were labeled 1% DEB, and the subsequent experiments using 2 to 4-fold increase in concentration of this component were labeled 2–4% DEB. Experiments based on the mixed composition of run 10 (Table 1) were labeled 1% MIX, and the subsequent experiments using 2 to 4-fold increase in concentration of these components were labeled 2–4% MIX. The remaining MM culture medium components were always the same, and the culture conditions were as described previously.

### 2.6. Analytical methods

Filter paper activity (FPase) was determined as described by Ghose (1987), with modifications to diminish the scale of the procedure by a factor of 10. Xylanase activity was determined by the method described by Bailey and Poutanen (1989). Reducing sugar was measured by the DNS method (Miller, 1959). The activity of β-glucosidase was measured using *p*-nitrophenol-β-D-glucoside (Sigma–Aldrich, USA), according to (Zhang et al., 2009). Total protein was measured in micro plates using Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, USA), using a procedure based on the Bradford method (Bradford, 1976). Bovine serum albumin was used as standard.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effect of carbon source on GH production

Table 1 summarizes the different combinations of DEB, SUC, and SF concentrations used for the *T. harzianum* cultivations, and the maximum activities that resulted from the use of EMD, in terms of FPase, xylanase, and β-glucosidase activities. Maximum FPase values obtained in the experiments ranged from 0.17 (run 1) to 0.86 FPU/mL (run 10), maximum xylanase values ranged from 44.7 (run 9) to 96.09 IU/mL (run 5), and maximum β-glucosidase values ranged from 4.15 (run 1) to 19.61 IU/mL (run 5) (Table 1). A preliminary analysis of this data revealed the significance of the lignocellulosic materials as inducers for GH biosynthesis, since



**Table 1**

Summary of FPase, xylanase, and  $\beta$ -glucosidase maximum values for the *T. harzianum* Mixture Design Experiment, using the culture medium components delignified steam-exploded bagasse (DEB), sucrose (SUC), and soybean flour (SF). Batch experiments were run using submerged bioreactor fermentation, at an initial concentration of 1% (w/v).

Run number	DEB (g/L)	SUC (g/L)	SF (g/L)	FPase (FPU/mL)	Xylanase (IU/mL)	$\beta$ -Glucosidase (IU/mL)
<b>1</b>	<b>0.0</b>	<b>10.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.17</b>	<b>44.90</b>	<b>4.15</b>
2	3.3	3.3	3.3	0.47	67.15	7.53
3	5.0	5.0	0.0	0.56	60.40	6.87
4	0.0	0.0	10.0	0.36	65.70	4.87
<b>5</b>	<b>10.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.78</b>	<b>96.09</b>	<b>19.61</b>
6	3.3	3.3	3.3	0.52	70.50	7.53
7	1.7	1.7	6.7	0.31	61.48	6.16
8	3.3	3.3	3.3	0.67	73.28	8.25
9	0.0	5.0	5.0	0.19	44.71	7.18
<b>10</b>	<b>6.7</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>0.86</b>	<b>76.75</b>	<b>10.91</b>
11	5.0	0.0	5.0	0.63	84.40	8.33
12	1.7	6.7	1.7	0.25	44.90	5.09

the least favorable condition for GH biosynthesis was that where sucrose alone was used as carbon source (run 1). Nevertheless, a more complete analysis of the influence of medium composition on GH biosynthesis could be achieved by estimating the statistical significance of the effect of each component. In terms of FPase activity, all three components (DEB, SUC, and SF) showed a statistically significant positive influence on FPase activity titers, since  $p$ -values were smaller than 0.05 for each of these components. However, interactions between the components (DEB\*SUC, DEB\*SF, and SUC\*SF) were not significant, with  $p > 0.05$ . The statistical analysis enabled the definition of a linear model to estimate the FPase titer in terms of the concentrations of the components DEB, SUC, and SF in the cultivation medium, as described by Eq. (1):

$$\text{FPase (FPU/mL)} = 0.0815 * \text{DEB} + 0.01337 * \text{SUC} + 0.0316 * \text{SF} \quad (1)$$

The EMD results indicated that the most significant effect on FPase activity was the concentration of DEB, followed by the SF and SUC concentrations, as revealed by Eq. (1). The positive influence of SF on FPase might be explained by its high content of protein (43.22% of the dry weight of SF), used as a nitrogen source during fungal growth. Interestingly, sucrose also exerted a positive influence on FPase activity, corroborating our previously reported data (Delabona et al., 2012a). In the same way, maximum xylanase activity could be related to the concentrations of the culture medium components, as described by Eq. (2):

$$\text{Xylanase (IU/mL)} = 9.448 * \text{DEB} + 4.286 * \text{SUC} + 6.411 * \text{SF} \quad (2)$$

As found for FPase activity, Eq. (2) demonstrates that all components of the culture medium exerted a positive influence on the final titer of xylanase, with an order of importance DEB > SF > SUC. It was found that the culture medium with DEB = 5 g/L and SF = 5 g/L (run 11, Table 1) performed almost as well as DEB = 10 g/L (run 5, Table 1). In terms of xylanase activity, the maximum values attained were 84.40 and 96.09 IU/mL, respectively. Based on the compositions of DEB and SF, the cellulose and hemicellulose concentrations for the DEB assay (run 5) were 7.8 and 0.7 g/L, respectively, and for the DEB + SF assay (run 11) were 1.7 and 0.9 g/L, respectively, so that the hemicellulose concentrations were almost equal in both assays. The literature provides evidence that xylanase and cellulase are expressed in a coordinated way, and that xylanase may be induced by xylan and xylo-oligomers, as well as by cellulose (Aro et al., 2005). It can therefore be hypothesized that greater xylanase induction using the DEB culture medium in run 5 was due to the higher cellulose concentration.

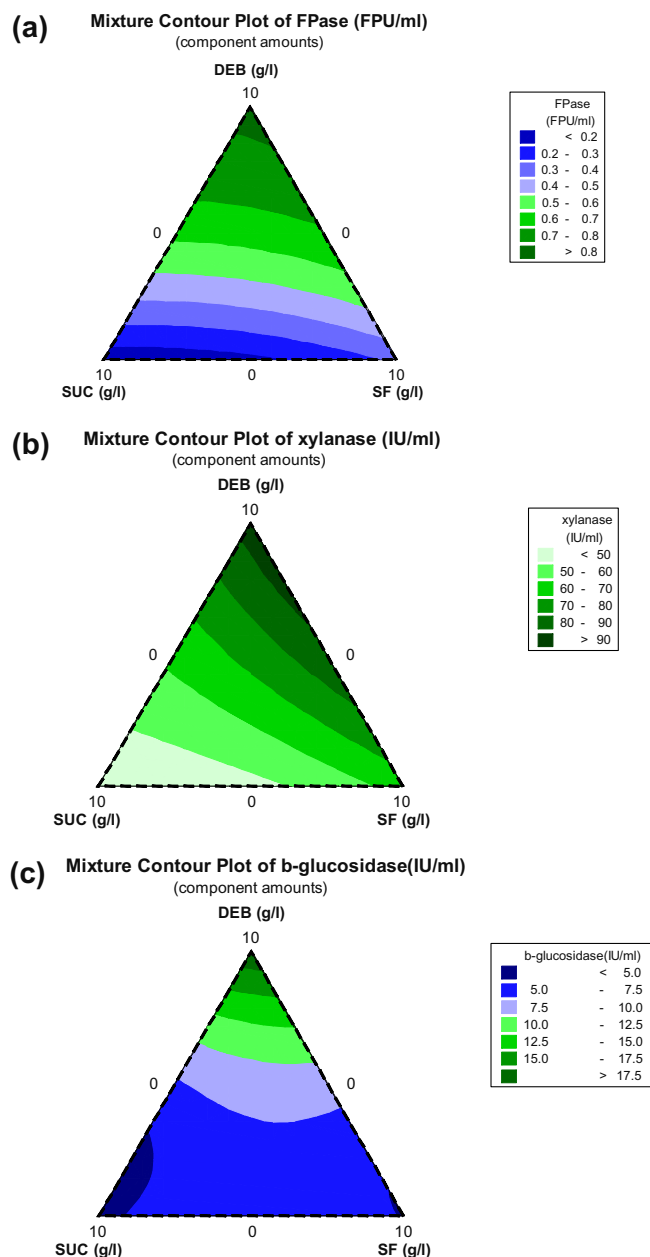
Statistical analysis of  $\beta$ -glucosidase activity resulted in a second-order relationship for the components DEB, SUC, and SF, as described in Eq. (3):

$$\begin{aligned} \beta\text{-glucosidase (IU/mL)} = & 1.9454 * \text{DEB} + 0.3918 * \text{SUC} + 0.4731 * \text{SF} \\ & - 0.1815 * \text{DEB} * \text{SUC} - 0.1356 * \text{DEB} * \text{SF} \\ & + 0.1260 * \text{SUC} * \text{SF} \quad (3) \end{aligned}$$

Similarly to xylanase and FPase, Eq. (3) indicates that the order of importance of the culture medium components was DEB > SF > SUC, although here the second-order term SUC\*SF also had a positive effect on  $\beta$ -glucosidase activity. The models used to describe the effects of each component (DEB, SUC, and SF) on FPase (Eq. (1)), xylanase (Eq. (2)), and  $\beta$ -glucosidase (Eq. (3)) were used to generate the contour plots shown in Fig. 1a–c, respectively. Although all three components had significant effects on the maximum attainable value of GH biosynthesis, it can be seen from Fig. 1 that the DEB component maximized the three measured enzyme activities (FPase, xylanase, and  $\beta$ -glucosidase), with highest activities obtained using a 10 g/L concentration of DEB. For this condition, Eqs. (1)–(3) returned the following values: FPase = 0.815 FPU/mL; xylanase = 94.48 IU/mL;  $\beta$ -glucosidase = 19.45 IU/mL. Comparison with the data shown in Table 1 for run 5 (FPase = 0.78 FPU/mL; xylanase = 96.06 IU/mL;  $\beta$ -glucosidase = 19.61 IU/mL) confirms the condition for optimization of the three enzyme activities. It can be seen from Fig. 1a and b that higher values of FPase and xylanase can also be obtained with the partial substitution of DEB by SF and SUC. In the experiment performed using DEB = 6.67 g/L, SUC = 1.67 g/L, and SF = 1.67 g/L (Table 1, run 10), the values obtained for FPase, xylanase, and  $\beta$ -glucosidase were 0.86 FPU/mL, 76.75 IU/mL, and 10.91 IU/mL, respectively. These values were very similar to those obtained in run 5 (DEB = 10 g/L), at least with respect to filter paper activity. Taken together, these findings reinforce our previous observations of the positive roles of sucrose and soybean flour in cellulase biosynthesis by *T. harzianum*.

### 3.2. Effect of component concentration increments

In order to evaluate the effect of component concentration on GH biosynthesis by *T. harzianum*, a set of batch bioreactor experiments were performed based on the two best conditions selected from the EMD cultivations (Runs 5 and 10, Table 1). In the first set of these experiments, the concentration of DEB in the medium used under the conditions of run 5 (Table 1) was increased 2, 3, and 4-fold, from 10 g/L to 40 g/L. In the next set of experiments, the initial concentration values used for the components in run 10 (Table 1) were increased 2, 3, and 4-fold. For simplicity, these assays are labeled as MIX experiments. The maximum values of enzymatic activity and production rate achieved during a 120 h cultivation period are summarized in Table 2. The FPase activity improved with up to 3-fold increase in the DEB concentration, although the enzyme activity increment was not proportional to the concentration increment. After 72 h of cultivation, the FPase titer was



**Fig. 1.** Contour plots of FPase (a), xylanase (b), and  $\beta$ -glucosidase (c) responses for the *T. harzianum* Mixture Design Experiment, using the culture medium components (g/L) delignified steam-exploded bagasse (DEB), sucrose (SUC), and soybean flour (SF).

0.8 FPU/mL using DEB at 10 g/L, while for DEB at 20 g/L the FPase activity rose to 1.2 FPU/mL. A further increase of FPase activity, to 1.3 FPU/mL, was observed when the initial concentration of DEB was raised to 30 g/L; however, the 4-fold increment had no

positive effect on FPase activity. In contrast to the beneficial effect observed for DEB increment, up to 4-fold increase in the MIX culture medium components only slightly influenced the FPase titer during *T. harzianum* cultivation. There was a small increase in the maximum FPase titer, from 0.7 to 0.9 FPU/mL, when the component concentrations in the MIX culture medium were increased by a factor of 3. Although the FPase titer for the DEB medium was superior to that for the MIX medium, the maximum FPase activity titer occurred earlier in the case of the MIX culture medium, compared to the DEB formulation. As a consequence, the calculated rates of FPase biosynthesis ( $r_{FPase}$ ) were practically the same for both culture media, with a plateau at around 18 FPU/L h when component concentrations exceeding 20 g/L were used. Cellulose is recognized as one of the best induction factors for cellulase biosynthesis in *Trichoderma* and other filamentous fungi, which is consistent with the positive effect of an increased initial cellulose concentration (due to the increment of DEB) on the rate of FPase biosynthesis. Nevertheless, it appeared that the FPase rate increment was also assisted by the presence of sucrose in the culture medium. Xylanase activity was affected differently by the component concentration. Up to 4-fold increase of the original DEB concentration in the medium (DEB = 10 g/L) had no influence on the xylanase titer during *T. harzianum* bioreactor cultivation (Table 2). Nevertheless, the xylanase activity was benefited by increasing the initial component concentrations by up to 4 times the original concentrations in the MIX culture medium. After 72 h of cultivation, the xylanase activity value achieved using MIX at 10 g/L was 68.5 IU/mL, while for MIX at 40 g/L, enzyme activity increased up to 150.8 IU/mL, a 2-fold increment. The effect was even more pronounced in terms of the rate of xylanase biosynthesis ( $r_{Xyl}$ ). While for the MIX formulation there was a steady increase in  $r_{Xyl}$  with component concentration, from 951 IU/L h at 10 g/L to 2095 IU/L h at 40 g/L, for the DEB formulation the value of  $r_{Xyl}$  remained rather constant (Table 2). It is already established that xylan and xylo-oligomers induce xylanase in filamentous fungi (Aro et al., 2005). The composition of the MIX culture medium included soybean flour, which has a hemicellulose content of almost 20%. Hence, it seems plausible that the MIX culture medium positively influenced the biosynthesis of xylanase by *T. harzianum* because the MIX formulation contained a readily-available hemicellulose component.  $\beta$ -glucosidase activity was positively affected by the initial MIX concentration (Table 2). A rise in maximum titer from 7.5 IU/mL to 22.1 IU/mL was observed when the initial culture medium composition was increased from 10 to 40 g/L. In addition, the peak in  $\beta$ -glucosidase activity was advanced to 48 h of fermentation time. In the case of the DEB culture medium, the peak in  $\beta$ -glucosidase activity occurred much later than for the MIX culture medium, approximately after 96 h of cultivation. In the DEB experiments, the calculated maximum  $\beta$ -glucosidase production rate ( $r_{\beta\text{-gluc}}$ ) values ranged from 204 IU/L h (DEB 10 g/L) to 259 IU/L h (DEB 40 g/L). On the other hand, in the MIX experiments, a  $\beta$ -glucosidase production rate of over 560 IU/L h was achieved. As discussed previously, EMD indicated that the largest positive influence on  $\beta$ -glucosidase activity was exerted by DEB,

**Table 2**

Influence of DEB and MIX concentration in the maximum values of enzyme activity and production rate on *T. harzianum* cultivation using bioreactor.

Maximum enzymatic activity and production rate	DEB (g/L)				MIX (g/L)			
	10	20	30	40	10	20	30	40
FPase (FPU/mL)	0.8	1.2	1.3	1.3	0.7	0.5	0.9	0.8
Xylanase (IU/mL)	87.4	71.8	75.7	83.6	68.5	75.4	123.4	150.8
$\beta$ -glucosidase (IU/mL)	19.6	19.9	23.6	24.8	7.5	21.1	26.9	22.1
$r_{FPase}$ (FPU/L h)	11	16	18	18	16	18	14	17
$r_{Xyl}$ (IU/L h)	910	748	788	870	951	1047	1714	2095
$r_{\beta\text{-gluc}}$ (IU/L h)	204	207	246	259	157	439	561	461

followed by SF and SUC, although the second-order term SUC\*SF also had a positive effect on  $\beta$ -glucosidase activity. Accordingly, this is probably the reason why the increment of both SUC and SF components increased  $r\beta$ -gluc using the MIX formulation, despite the presence of less cellulose (compared to DEB).

The influence of cellulose concentration on cellulase and hemicellulase production has already been assessed using *Trichoderma reesei*. An initial cellulose concentration of up to 3% benefited cellulase production in *T. reesei* RUT C30, while a higher concentration decreased the enzyme production rate (Hendy et al., 1982). Similarly, the present results show that a cellulose concentration of up to 3% (w/v) also increased the final titer of GH, but jeopardized the GH enzyme titer above this value. The rise in the concentration of insoluble substrate in the bioreactor could hinder the mass transfer of substrates to the growing mycelial biomass, as well as the removal of inhibitory products. It is also possible that local glucose concentrations in highly viscous broth (due to an increased solid substrate concentration) might lead to down-regulation of cellulase biosynthesis due to a catabolite repression mechanism. As far as we know, this is the first report on this subject using *T. harzianum*. Previously, it was shown that bioreactor cultivation of *T. harzianum* P49P11 strain on DEB + sucrose culture media (using 7 g/L and 3 g/L initial concentration, respectively) attained maximum cellulase productivity of 17 FPU/L h (Delabona et al., 2012a). In the present work, we corroborated that data as the maximum cellulase productivity value was 18 FPU/L h (Table 2). On the other hand, xylanase and  $\beta$ -glucosidase maximum values increased from 80 IU/mL and 17 IU/mL (Delabona et al., 2012a) to 150 IU/mL and 25 IU/mL, respectively. In addition it must be pointed out that the present results for GH production by *T. harzianum* cultivated under submerged fermentation are superior to the values reported in the literature (Ahmed et al., 2009; Delabona et al., 2012a).

#### 4. Conclusions

A systematic experimental design approach was used to improve GH production by *T. harzianum* P49P11 in submerged fermentation. The results demonstrated that (of the components tested) delignified steam-pretreated bagasse was the most important component of the culture medium for maximization of GH activity. It was found that the MIX culture medium maximized xylanase and  $\beta$ -glucosidase biosynthesis rate. It was also observed that sucrose played an important role in FPase, xylanase, and  $\beta$ -glucosidase biosynthesis. Overall, it has been shown that *T. harzianum* P49P11 is a potentially valuable organism for the production of cellulolytic enzymes to be used for biomass deconstruction.

#### Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agencies CNPq and FAPESP for financial support, and the technical staff of CTBE, in special

Dr. George J.M. Rocha for providing the pretreated sugarcane bagasse.

#### 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.
- Aro, N., Pakula, T., Penttila, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiol. Rev. 29, 719–739.
- Bailey, M.J., Poutanen, K., 1989. Production of xylanolytic enzymes by strains of aspergillus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 5–10.
- Bradford, M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Delabona, P.S., Farinas, C.S., da Silva, M.R., Azzoni, S.F., Pradella, J.G.C., 2012a. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. Bioresour. Technol. 107, 517–521.
- Delabona, P.S., Pirota, R.D.P.B., Codima, C.A., Tremacoldi, C.R., Rodrigues, A., Farinas, C.S., 2012b. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. Biomass Bioenergy 37, 243–250.
- Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 59, 257–268.
- Gottschalk, L.M.F., Oliveira, R.A., Bon, E.P.D., 2010. Cellulases, xylanases, beta-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. Biochem. Eng. J. 51, 72–78.
- Hendy, N., Wilke, C., Blanch, H., 1982. Enhanced cellulase production using solka floc in a fed-batch fermentation. Biotechnol. Lett. 4, 785–788.
- Mandels, M., Weber, J., 1969. Production of cellulases. Adv. Chem. Ser. 95, 391–414.
- Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426–428.
- Rispoli, F.J., Shah, V., 2007. Mixture design as a first step for optimization of fermentation medium for cutinase production from *Colletotrichum lindemuthianum*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34, 349–355.
- Rocha, G.J.M., Gonçalves, A.R., Oliveira, B.R., Olivares, E.G., Rossell, C.E.V., 2012. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. Ind. Crops Prod. 35, 274–279.
- Rodriguez-Zuniga, U.F., Farinas, C.S., Neto, V.B., Couri, S., Crestana, S., 2011. *Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation. Pesq. Agropec. Bras. 46, 912–919.
- Sheehan, J., Himmel, M., 1999. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US department of energy's research and development activities for bioethanol. Biotechnol. Prog. 15, 817–827.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme Microb. Technol. 46, 541–549.
- Sorensen, A., Teller, P.J., Lubeck, P.S., Ahring, B.K., 2011. Onsite enzyme production during bioethanol production from biomass: screening for suitable fungal strains. Appl. Biochem. Biotechnol. 164, 1058–1070.
- 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. Renew. Energy 34, 421–424.
- Suwannarangsee, S., Bunternngsook, B., Arnthong, J., Paemane, A., Thamchaipenet, A., Eurwilaichitr, L., Laosiripojana, N., Champreda, V., 2012. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. Bioresour. Technol. 119, 252–261.
- Zhang, Y.H.P., Hong, J., Ye, X., 2009. Cellulase assays. Methods Mol. Biol. 581, 213–261.

## Capítulo IV

### **Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and $\alpha$ -L-arabinofuranosidase**

**Artigo publicado na Revista Bioresource Technology, volume 131, páginas 500–507, ano 2013.**

Os resultados obtidos neste trabalho referem – se aos objetivos 4 e 5 do item 1.2.1. Nesta etapa do trabalho foi realizado um “painel de atividades” contra substratos celulósicos e não celulósicos para verificar as enzimas secretadas por *Trichoderma harzianum* P49P11. O resultado do painel foi comparado com os resultados obtidos pelos sobrenadantes fúngicos do hipercelulolítico *T. reesei* Rut C30 e do mutante *Penicillium echinulatum* S1M29, e dos extratos comerciais Cellic Ctec 2 (Novozymes) e celulases de *Trichoderma viride* (C9422, Sigma–Aldrich). O resultado do painel enzimático de *T. harzianum* foi corroborado com o estudo de proteôma. Os resultados mostraram que duas enzimas não eram secretadas pelo fungo estudado. Em ensaio de suplementação dessas enzimas na hidrólise enzimática do bagaço de cana ficou evidente o aumento do rendimento, mostrando que enzimas acessórias são essenciais para o aumento da conversão de celulose em glicose.



# Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and $\alpha$ -L-arabinofuranosidase



Priscila da Silva Delabona<sup>a,\*</sup>, Júnio Cota<sup>a</sup>, Zaira Bruna Hoffmam<sup>a</sup>, Douglas Antonio Alvaredo Paixão<sup>a</sup>, Cristiane Sanchez Farinas<sup>b</sup>, João Paulo Lourenço Franco Cairo<sup>a</sup>, Deise Juliana Lima<sup>a</sup>, Fábio Marcio Squina<sup>a</sup>, Roberto Ruller<sup>a</sup>, José Geraldo da Cruz Pradella<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory – CTBE, Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, Pólo II de Alta Tecnologia, Caixa Postal 6192, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Embrapa Instrumentation, Rua XV de Novembro 1452, CEP 13560-970, São Carlos, São Paulo, Brazil

## HIGHLIGHTS

- ▶ The Amazon rainforest *Trichoderma harzianum* is a potential candidate for saccharification of plant biomass.
- ▶ Important roles for pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase in the enzymatic synergies.
- ▶ Sugarcane bagasse hydrolysis is more effective and competitive for second generation ethanol.

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 30 July 2012

Received in revised form 27 November 2012

Accepted 14 December 2012

Available online 22 December 2012

### Keywords:

Accessory enzymes

*Trichoderma harzianum*

Pectinase

$\alpha$ -L-arabinofuranosidase

Enzymatic hydrolysis

## ABSTRACT

Supplementation of cellulase cocktails with accessory enzymes can contribute to a higher hydrolytic capacity in releasing fermentable sugars from plant biomass. This study investigated which enzymes were complementary to the enzyme set of *Trichoderma harzianum* in the degradation of sugarcane bagasse. Specific activities of *T. harzianum* extract on different substrates were compared with the extracts of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei*, and two commercial cellulase preparations. Complementary analysis of the secretome of *T. harzianum* was also used to identify which enzymes were produced during growth on pretreated sugarcane bagasse. These analyses enabled the selection of the enzymes pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AF) to be further investigated as supplements to the *T. harzianum* extract. The effect of enzyme supplementation on the efficiency of sugarcane bagasse saccharification was evaluated using response surface methodology. The supplementation of *T. harzianum* enzymatic extract with pectinase and AF increased the efficiency of hydrolysis by up to 116%.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The conversion of lignocellulosic biomass into fuels and other chemicals can be achieved using a multi-enzyme system acting in synergy. An enzymatic cocktail containing different enzymes involved in the hydrolysis of each part of the lignocellulosic structure is crucial to increase enzymatic hydrolysis (EH) yields (Alvira et al., 2011; Berlin et al., 2007; Gao et al., 2011). In addition, the viable bioconversion of biomass requires not only that the cost of the enzymes be reduced, but also that improvements be made in the effectiveness of the enzymatic extracts used in the hydrolysis mixture. These aspects are highly dependent on both the raw material

and the pretreatment employed (Delabona et al., 2012a; Jorgensen and Olsson, 2006; Sorensen et al., 2011; Sukumaran et al., 2009). On-site production of enzymes can help to reduce enzyme costs since there is less need to stabilize the enzyme preparations, avoiding costs associated with transport and storage for long periods. Furthermore, the use of the same lignocellulosic biomass for enzyme production and hydrolysis could reduce the production costs of bioethanol, since both process could be co-located and share infrastructure and utilities (Delabona et al., 2012a). The on-site enzyme production using a split stream from the bioethanol process as part of the fermentation medium could be an attractive alternative (Kovacs et al., 2009; Sorensen et al., 2011). Moreover, the production of enzymes using as carbon source the same lignocellulosic material that will be used in the hydrolysis has shown that these enzyme preparations can present better performance (Delabona et al., 2012a; Jorgensen and Olsson, 2006).

\* Corresponding author. Tel.: +55 (19) 3518 3154; fax: +55 (19) 3518 3104.

E-mail address: [priscila.delabona@bioetanol.org.br](mailto:priscila.delabona@bioetanol.org.br) (P.S. Delabona).



Efficient degradation of cellulose requires the cooperation of at least three types of enzymes: cellobiohydrolases, endoglucanases, and  $\beta$ -glucosidases. The organism *Trichoderma reesei* has typically been used for industrial cellulase production, due to its ability to produce extracellular protein in high amounts. However, the amount of  $\beta$ -glucosidase secreted by *T. reesei* is insufficient for an efficient saccharification (Berlin et al., 2007; Jorgensen and Olsson, 2006). A strain of the fungus *Trichoderma harzianum* P49P11, recently isolated from the Amazon rainforest, has shown relatively high  $\beta$ -glucosidase and xylanase activities when cultivated in a culture medium consisting of pretreated sugarcane bagasse and sucrose, using submerged fermentation in a bioreactor (Delabona et al., 2012a). Previous studies demonstrated that supplementation of cellulase preparations with endoxylanase,  $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glucuronidase, acetyl xylan esterase, ferulic acid esterase and other accessory enzymes can positively affect EH of different lignocellulosic biomasses such as corn stover, wheat straw and soft wood (Alvira et al., 2011; Berlin et al., 2007; Gao et al., 2011; Kovacs et al., 2009; Kumar and Wyman, 2009). The addition of a recently identified lytic polysaccharide monooxygenase, classified as GH61, has enabled a 2-fold reduction in the total protein required to hydrolyze pretreated corn stover (Harris et al., 2010). However, only few studies investigated the use of accessory enzymes to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse (Kovacs et al., 2009). Addition of accessory enzymes could result in a synergistic effect by increasing accessibility of cellulases to the substrate, improving the EH process and enabling the use of reduced enzyme dosages (Gao et al., 2011).

A recent study by de Souza et al. (2012) on the composition and structure of sugarcane cell wall revealed that cellulose accounts for ~30% of cell wall, hemicellulose ~50% and pectins ~10%. In this same study, it has been proposed that an enzyme set containing pectinases, endo- $\beta$ -xylanase, arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase, and ferulic acid esterase would be needed in order to make cellulose accessible to cellulases (de Souza et al., 2012). Steam explosion followed by alkaline delignification has been considered a potential pretreatment technology for sugarcane bagasse (Rocha et al., 2012). However, understanding the enzymes that are necessary for the complete hydrolysis of delignified steam-pretreated sugarcane bagasse (DSB) is still a challenge.

The present study was developed in order to find out which enzymes could enhance the hydrolytic efficiency of the enzymatic extract obtained from a newly-isolated strain of *T. harzianum*, cultivated using pretreated sugarcane bagasse as substrate. Initially, the performance of the enzymatic extract from *T. harzianum* was characterized in terms of its saccharification efficiency during hydrolysis of pretreated bagasse, and the results were compared to those obtained for enzymatic extracts from *T. reesei* and *Penicillium echinulatum*, cultivated under the same conditions, as well as two commercial preparations. The specific activities of these five enzymatic extracts were compared using a panel of different substrates. In addition, the secretome of *T. harzianum* grown on pretreated sugarcane bagasse was analyzed using tandem mass spectrometry (MS/MS). Finally, experimental design methodology was used to evaluate the influence on the effectiveness of pretreated sugarcane bagasse hydrolysis of supplementation of the *T. harzianum* enzymatic extract with two selected accessory enzymes (pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase).

## 2. Methods

### 2.1. Microorganisms and cultivation conditions

Stock cultures of *T. harzianum* P49P11 were isolated from the Amazon rainforest as previously described by Delabona et al.

(2012b), and identified by internal transcribed spacer (ITS) analysis (see supplementary data). This strain was deposited at the Embrapa Food Technology microorganism collection (Rio de Janeiro, Brazil) by the strain number BRMCTAA 115. *T. reesei* Rut 30, from the American Type Culture Collection, and *P. echinulatum* strain 9A02S1-DSM18942 (Dillon et al., 2006) were stored at 4 °C on slants of potato dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, USA). The strains were grown on PDA plates (90 × 15 mm) at 29 °C for 7 days. A conidia suspension, prepared by adding 20 mL of sterilized distilled water and Tween 80 to the grown PDA plates, was transferred to Erlenmeyer flasks containing 180 mL of pre-culture medium adapted from (Mandels and Weber, 1969). The composition of the medium was as follows: 1 mL Tween 80; 0.3 g L<sup>-1</sup> urea; 2.0 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.4 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.4 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.3 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1.0 g L<sup>-1</sup> proteose peptone; 5.0 mg L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1.6 mg L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; 1.4 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 2.0 mg L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 10 g L<sup>-1</sup> glucose (carbon source). The medium (pH 5.0) was incubated for 72 h at 29 °C on a rotary shaker at 200 rpm. A 100 mL volume of this pre-culture was transferred to a BioFlo 115 fermenter (New Brunswick Scientific Co., USA) equipped with automatic control of temperature, pH, agitation rate (Rushton impeller), and aeration rate. The working volume of the fermenter was 1.0 L, and the temperature was maintained at 29 °C. The medium used was the same as that employed for the pre-culture, except that the carbon source was delignified steam-exploded sugarcane bagasse (DSB), for all microorganisms. The aeration rate was adjusted so that the dissolved O<sub>2</sub> level in the culture medium did not drop below 30% of air saturation. The pH was controlled at pre-set values using either 0.4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or aqueous NH<sub>4</sub>OH solution (1:3). Foaming was controlled by the manual addition of previously sterilized polypropylene glycol antifoaming agent (P2000, Dow Chemical, Brazil). The antifoaming agent was added in a proportion of 1 mL per liter at the beginning of each cultivation.

### 2.2. Enzymatic hydrolysis (EH)

Enzymatic hydrolysis experiments were carried out using 2 mL Eppendorf tubes with 50 mM citrate buffer at pH 5, in a Thermomixer microplate incubator (Eppendorf, Germany) operated at an agitation speed of 1000 rpm and temperature of 50 °C. The pretreated sugarcane bagasse (DSB) was applied at a concentration of 5% (w/w) of substrate total solids (TS). The working volume was 1.0 mL, and all experiments were performed in triplicate. The same conditions were used in the synergy studies with DSB, employing  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and pectinase combined with cellulases from *T. harzianum* (2.8 mg/mL) and the commercial NS 50010  $\beta$ -glucosidase preparation (81.69 mg/mL) (Novozymes, Denmark). The resulting dosages were 0.75 FPU/g cellulose and 75 IU  $\beta$ -glucosidase/g cellulose. Supernatants were withdrawn after 24 h, the hydrolysis was stopped by boiling for 5 min, and the samples were then centrifuged (11,900g) at room temperature for 15 min. The EH was measured by quantification of the reducing sugars released (with glucose as standard) according to the DNS method (Miller, 1959). The sugarcane bagasse was pretreated by steam explosion followed by delignification, as described by Rocha et al. (2012), and its composition was as follows (% dry weight): 89.5 ± 1.6 (cellulose), 3.4 ± 0.3 (hemicellulose), and 5.5 ± 0.2 (lignin). The materials were thoroughly washed with water, dried at room temperature, milled, and classified using a 35 mesh sieve.

### 2.3. Characterization of enzymatic extracts

A “panel of enzymatic activity” was performed to characterize the activity profiles of the supernatants produced by the *T. harzianum*, *T. reesei* Rut C30, and *P. echinulatum* cultures. Cellulase from *Trichoderma viride* (C9422, Sigma-Aldrich, USA) and the cellulase

preparation CellicCtec 2 (Novozymes, Denmark) were used as references for the panel enzymatic activities. A commercial preparation of pectinase from *Aspergillus niger* (Pectinex 3XL, Sigma–Aldrich, USA) containing mainly polygalacturonase activity (983.5 IU/mL) and trace amounts of xylanase (15 IU/mL) and  $\beta$ -glucosidase (0.5 IU/mL) and a recombinant GH51  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AF) from *Bacillus subtilis* were used to evaluate synergistic effects. The enzymatic cocktail produced by *T. harzianum* presents considerable  $\beta$ -glucosidase activity; however, an extra supplementation of  $\beta$ -glucosidase (NS 50010, Novozymes) was added to ensure complete conversion of cellobiose to glucose. Total protein was measured in micro plates using Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, USA). This is a procedure based on the Bradford method (BRADFORD, 1976). Bovine serum albumin was used as standard.

#### 2.4. Enzymatic assays

Filter paper activity (FPase) was determined as described by Ghose (1987), with modifications to reduce the scale of the procedure by a factor of ten. Reducing sugars were measured by the DNS method, using glucose as standard. The activity of  $\beta$ -glucosidase was measured at pH 4.8 using p-nitrophenol- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) (Sigma–Aldrich, USA). The assay was carried out using 20  $\mu$ L of diluted centrifugation supernatant and 80  $\mu$ L of 12 mM pNPG, diluted in 50 mM citrate buffer (pH 4.8), and the mixture was incubated for 10 min at 50 °C. The reaction was stopped by adding 100  $\mu$ L of 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , and the absorbance was measured at 400 nm. All the polysaccharide substrates (purchased from the best available sources, Sigma–Aldrich and Megazyme) were assayed at 5 mg/mL (0.5%), using a reaction time of 15 min, and the lignocellulosic substrates were assayed using a reaction time of 60 min. All assays employed the epMotion 5075 automated pipetting system (Eppendorf). The enzymatic activity was determined from the amount of reducing sugars released from different polysaccharide substrates, using the DNS method.

#### 2.5. Mass spectrometric analysis of the *T. harzianum* secretome

A volume of supernatant containing 100  $\mu$ g of total proteins (quantified by Bradford's method) was obtained from a cultivation of *T. harzianum* using DSB as the carbon source after 72 h, as described in Section 2.1. The 72 h cultivation period corresponded to the cultivation time in which maximum values of enzymatic activity were achieved. This sample was denatured in 8 M urea (1:1), reduced in 5 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min at 56 °C, and alkylated in 14 mM iodoacetamide (IAA) for 30 min in darkness at room temperature. Another addition of 5 mM DTT for 15 min was used to quench any unreacted IAA. The urea concentration was reduced to a final concentration of 1.6 M by adding water, and 1 mM  $\text{CaCl}_2$  was added to serve as trypsin co-factor. Proteins were digested overnight using 50  $\mu$ L of trypsin (20  $\mu$ g/ $\mu$ L, Promega), at 37 °C. The reaction was stopped by adjusting the pH to 2 with trifluoroacetic acid, and the sample was then centrifuged for 10 min at 2500g. The peptide mixtures were de-salted using a Sep-Pak C18 cartridge (Waters), according to the manufacturer's instructions, and dried in a Speed-Vac apparatus. Each sample was resuspended in 12  $\mu$ L of 0.1% formic acid, and an aliquot (4.5  $\mu$ L) of the resulting peptide mixture was separated using a C18 (100  $\mu$ m  $\times$  100 mm) RP-nanoUPLC column (nanoAcquity, Waters), coupled to a Q-ToF Ultima mass spectrometer (Waters) fitted with a nano-electrospray source operated at a flow rate of 0.6  $\mu$ L/min. The gradient was 2–90% acetonitrile in 0.1% formic acid over 60 min. The instrument was operated in 'top three' mode, in which one MS spectrum is acquired followed by MS/MS of the three most intense peaks detected. The spectra were acquired

using MassLynx v.4.1 software, and the raw data files were converted into a peak list format (mgf), without summing the scans, using Mascot Distiller v.2.3.2.0 2009 software (Matrix Science Ltd.). Searches were conducted against the NCBI database (11346708 sequences; 3868708671 residues; version 2010; fungi taxonomy: 678749 sequences) using the Mascot v.2.3.01 search engine (Matrix Science Ltd.), with carbamidomethylation as fixed modification, oxidation of methionine as variable modification, one trypsin missed cleavage, and a tolerance of 0.1 Da for both precursors and fragment ions. The false discovery (FDR) rate was also evaluated.

#### 2.6. Response surface methodology: fungal cocktail supplementation

The effect of supplementation with the two selected accessory enzymes (pectinase and AF) on biomass hydrolysis using the *T. harzianum* enzymatic extract was investigated by response surface methodology. The response was expressed in terms of the concentration of reducing sugars released (g/L). A  $2^2$  central composite design (CCD) was performed, with 3 central points, totaling 11 runs (Table 1). All the assays were conducted at fixed concentrations of the *T. harzianum* extract (2.8 mg/mL) and the commercial  $\beta$ -glucosidase (81.69 mg/mL). The two variables ( $k = 2$ ) employed in the optimization design were the concentrations ( $\mu$ g/mL) of AF ( $X_1$ ) and pectinase ( $X_2$ ) used to supplement the standard fungal cocktail. A second-order polynomial regression model (Eq. (1)) was constructed from analysis of the experimental data ( $\alpha = 0.05$ ), and was applied to generate response surface and contour plots:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_{11}X_1^2 + b_2X_2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (1)$$

where, Y is the predicted response (reducing sugars concentration),  $X_1$  and  $X_2$  are the coded forms of the input variables (AF and pectinase, respectively),  $b_0$  is a constant,  $b_1$  and  $b_2$  are the linear coefficients,  $b_{11}$  and  $b_{22}$  are the quadratic coefficients, and  $b_{12}$  is a cross-product coefficient. An analysis of variance (ANOVA) was performed to validate the statistical model. Statistica v. 8 software (Statsoft) was used for the regression and graphical analyses.

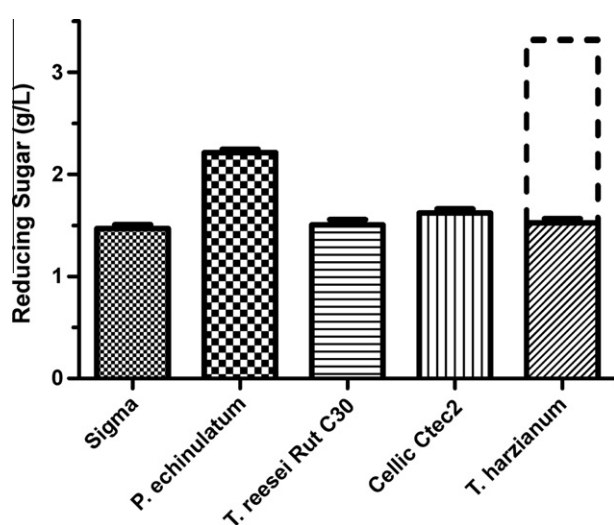
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterization of enzymatic extracts

An initial characterization of the crude enzymatic extract from *T. harzianum* was performed in terms of its saccharification efficiency during the hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse (DSB). The results were compared with the enzymatic extracts obtained from *T. reesei* Rut C30 and *P. echinulatum*, cultivated under the same conditions, as well as with two commercial cellulase preparations (C9422/Sigma and Cellic Ctec2/Novozymes) (Fig. 1). This comparative EH study showed that the enzymatic extract produced by *P. echinulatum* performed better than the other enzymatic extracts, including the commercial preparations (Fig. 1). The EH carried out with the supernatant from *P. echinulatum* resulted in a release of reducing sugars of 2.2 g/L, while the amount of reducing sugars released using the *T. harzianum* cocktail was 32% less (1.5 g/L). The substantially better EH performance of the enzymatic extract produced by *P. echinulatum* indicated the need to identify those enzymes present in this extract that could have contributed to its higher performance during DSB hydrolysis. Therefore, a characterization of the crude enzymatic extracts produced by different fungi, as well as the two commercial cellulase preparations, was made using a wide selection of substrates including p-nitrophenol (p-NP) derivatives, and cellulosic and non-cellulosic materials (Table 2). This characterization of the enzymatic

**Table 1**Central composite design (CCD) for pectinase and AF concentrations added to the *T. harzianum* enzymatic extract.

Run	AF ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pectinase ( $\mu\text{g/mL}$ )	Reducing sugar (g/L)	Predicted (g/L)	Relative error (%)
1	6.2 (−1)	663 (−1)	2.01	1.90	5.46
2	36.8 (+1)	663 (−1)	1.81	1.90	−5.09
3	6.2 (−1)	3897 (+1)	2.63	2.71	−3.04
4	36.8 (+1)	3897 (+1)	2.67	2.71	−1.52
5	0.0 (−1.41)	2280 (0)	2.39	2.44	−2.12
6	43.0 (+1.41)	2280 (0)	2.54	2.44	4.13
7	21.5 (0)	0 (−1.41)	1.59	1.60	−0.60
8	21.5 (0)	4560 (+1.41)	2.83	2.74	3.23
9	21.5 (0)	2280 (0)	2.20	2.17	1.48
10	21.5 (0)	2280 (0)	2.15	2.17	−1.03
11	21.5 (0)	2280 (0)	2.13	2.17	−1.93



**Fig. 1.** Reducing sugar (g/L) production during 24-h hydrolysis of 5% (w/v) bagasse pretreated by steam followed by delignification with NaOH, at pH 4.8 and 50 °C, using enzyme cocktails produced by *P. echinulatum*, *T. reesei* Rut C30, and *T. harzianum*, and commercial enzyme cocktails (Sigma and Cellic Ctec 2). The dotted line displays a projection of saccharification using *T. harzianum* with AF and pectinase supplementation (see Section 3.3).

preparations was performed in terms of the specific activity (U/mg of total protein).

It was observed that the extract produced by *P. echinulatum* showed superior specific activities for pectinase (0.72 U/mg) and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (0.34 U/mg), compared to the other enzymatic preparations. On the other hand, the *T. harzianum* extract was highly active in hydrolyzing both linear and branched forms of glucose-containing polysaccharides such as laminarin (7.29 U/mg), lichenan (5.46 U/mg), CMC (0.52 U/mg), microcrystalline cellulose (0.36 U/mg), and avicel (0.19 U/mg). The *T. harzianum* extract was also efficient in hydrolyzing hemicellulosic substrates such as beech wood xylan, wheat arabinoxylan,  $\beta$ -glucan, glucomannan, xyloglucan, and both pretreated sugarcane bagasse (DSB) and *in natura* sugarcane bagasse, as shown in Table 2.

It is interesting to note that the enzymatic extract of the fungus *T. reesei* generally showed less activity than the extract of the wild-type *T. harzianum*, for all enzyme activities evaluated. The *T. reesei* extract presented high activities for the substrates glucomannan, 1,4- $\beta$ -D-mannan, and locust bean gum. In the case of the commercial cellulase preparations, high  $\beta$ -glucosidase activities (12.53 U/mg) were detected in the preparations using Cellic Ctec2. Use of the substrates chitosan, larch arabinogalactan, and sugar beet resulted in very low or zero activity detected using any fungal enzymatic extract or commercial cellulase preparation.

In this study of the specific activities of the enzymatic preparations against a panel of model cellulosic and hemicellulosic

substrates, it is important to highlight the activities toward the substrates containing arabinoxylan structures, since it has been reported that there is a considerable amount of arabinosylated xylan backbone in sugarcane cell wall (de Souza et al., 2012). (Bian et al., 2012) studied seven hemicellulosic fractions extracted from sugarcane bagasse and showed that the hemicellulosic polymers from sugarcane bagasse were mainly composed of arabinoxylan structures. The arabinose residues in the xylose backbone may hinder the action of endoxylanases in catalyzing internal breakdown of the xylan chain.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases remove arabinose residues, contributing to xylan degradation and to disrupt lignin–carbohydrate binding, since arabinose residues may also take part in lignin–hemicelluloses ether bonds (Sun et al., 2005).

Besides the predominance of a hemicellulosic fraction (~50%), pectins account for approximately 10% of sugarcane cell wall (de Souza et al., 2012). These pectins were homogalacturonan, rhamnogalacturonan I probably branched with arabinogalactans as the main components of the most easily extractable pectins. However, a sub-population of pectin linked to cell wall phenolics and/or lignin and pectin tightly associated with cellulose was also observed during fractionation of sugarcane (de Souza et al., 2012). In order to disrupt these structures, the presence of pectinases in the enzymatic cocktail could have a beneficial effect on EH of sugarcane. Pectinases are a heterogeneous group of related enzymes that hydrolyze the pectic substances present typically in plants. These enzymes may be divided in three broader groups: (a) Protopectinases, which degrade the insoluble protopectin and give rise to highly polymerized soluble pectin; (b) Esterases, which catalyze the de-esterification of pectin by the removal of methoxy esters; (c) Depolymerases, which catalyze the hydrolytic cleavage of the  $\alpha$ -(1–4)-glycosidic bonds in the D-galacturonic acid moieties of the pectic substances (Jayani et al., 2005). Commercial pectinase preparations usually contain a mixture of these groups of enzymes. Pretreatment technologies such as steam explosion may extract some of the more soluble polymers. However, as mentioned before, a sub-population of pectin and hemicellulose fraction remains attached to the solid pretreated material (de Souza et al., 2012).

The overall analysis of these results suggested that the pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase enzymes might be good candidates for enhancing the cellulolytic enzyme complex produced by the *T. harzianum* fungus. In order to support this hypothesis, a complementary tandem mass spectrometric (MS/MS) analysis of the secretome of *T. harzianum* grown using pretreated sugarcane bagasse was employed in an attempt to identify the enzymes that could be missing.

### 3.2. *T. harzianum* secretome grown on pretreated sugarcane bagasse

Characterization studies of the recently-isolated *T. harzianum* strain have demonstrated that cellulase and hemicellulase production is dependent on cultivation conditions (Delabona et al.,



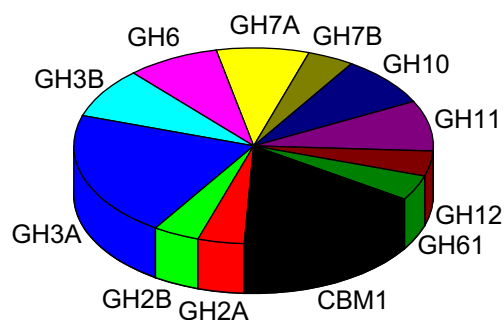
**Table 2**  
Specific activities ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) for different enzymatic cocktails using several substrates. An absence of activity is indicated by n.d. (not determined).

Substrate	Specific activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )				
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. reesei</i>	<i>P. echinulatum</i>	Sigma	Cellic
<i><math>\rho</math>-Nitrophenol substrates</i>					
pNPG	3.26 $\pm$ 0.05	n.d.	0.31 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	12.53 $\pm$ 0.16
pNPC	0.48 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.00	0.32 $\pm$ 0.00	4.46 $\pm$ 0.06	4.86 $\pm$ 0.19
pNPM	n.d.	n.d.	n.d.	0.31 $\pm$ 0.08	1.09 $\pm$ 0.06
pNPX	0.41 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.00	1.52 $\pm$ 0.00	9.03 $\pm$ 0.00
<i>Cellulosic substrates</i>					
Avicel	0.19 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
Microcrystalline cellulose	0.36 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02
CMC	0.52 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01
In natura bagasse	0.23 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.00
Pre-treated bagasse	1.06 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.00	0.35 $\pm$ 0.04
<i>Non-cellulosic substrates</i>					
Sugar beet	n.d.	n.d.	0.11 $\pm$ 0.01	n.d.	n.d.
Larch arabinogalactan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Linear arabinan	n.d.	n.d.	0.34 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Pectin	0.10 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.06	n.d.	n.d.
Chitosan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Wheat arabinoxylan	4.03 $\pm$ 0.06	1.54 $\pm$ 0.06	2.10 $\pm$ 0.59	0.40 $\pm$ 0.14	1.75 $\pm$ 0.14
Beech wood xylan	6.59 $\pm$ 0.05	4.86 $\pm$ 0.44	4.56 $\pm$ 0.34	1.25 $\pm$ 0.08	3.43 $\pm$ 0.28
1,4- $\beta$ -D-mannan	1.94 $\pm$ 0.11	2.59 $\pm$ 0.18	2.37 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.15
Glucomannan (Konjac)	4.63 $\pm$ 0.15	5.58 $\pm$ 0.59	5.90 $\pm$ 0.26	1.31 $\pm$ 0.11	1.52 $\pm$ 0.14
Locust bean gum	2.10 $\pm$ 0.13	3.09 $\pm$ 0.18	3.40 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.07
Potato starch	3.10 $\pm$ 0.14	0.70 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.05
Laminarin	7.29 $\pm$ 0.06	3.09 $\pm$ 0.29	0.74 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.00	2.29 $\pm$ 0.09
Lichenan	5.46 $\pm$ 0.09	2.93 $\pm$ 0.19	3.32 $\pm$ 0.02	1.12 $\pm$ 0.13	3.12 $\pm$ 0.26
Xyloglucan	3.66 $\pm$ 0.09	2.80 $\pm$ 0.27	2.27 $\pm$ 0.25	1.00 $\pm$ 0.11	1.82 $\pm$ 0.33
$\beta$ -Glucan	5.72 $\pm$ 0.13	4.72 $\pm$ 0.38	5.76 $\pm$ 0.48	1.64 $\pm$ 0.09	4.19 $\pm$ 0.37

2012a). A proteomic study of *T. harzianum* was therefore performed in order to identify the enzymes secreted by this fungus when it was grown using DSB as the carbon source. The cultivation of *T. harzianum* during 72 h using DSB as the carbon source achieved maximum FPase activity (0.96 FPU/mL) and maximum protein content (0.94 mg/mL) (Supplementary data). Since there is very little genomic sequence data available for *T. harzianum*, the LC-MS/MS spectra were analyzed with Mascot Ions Search software (Matrix Science, UK) for protein identification, using a database containing all non-redundant proteins derived from the 2011 NCBI fungi database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

The spectra acquisition using a strict cut-off (>40; significant at  $p < 0.05$ ) allowed the unambiguous assignment of 730 total peptides, which 69 were unique peptides distributed by 32 protein hits. The total unknown peptides were 622, representing about 44% of total peptide matches. The false discovery ratio (FDR) calculated for peptide matches above the identity threshold was 0.63%, indicating the high confidence level. This strategy enabled the identification of 24 different glycoside hydrolases and four CBM proteins, within 12 different CAZy families, that were present in the extract from *T. harzianum* grown on DSB (Fig. 2). The total number of peptides and number of different unique peptides, as well as their classification in different GH or CBM families and peptide sequences, are described in detail in Table 4.

Our previous observation of the ability of *T. harzianum* to hydrolyze pNP-G and pNP-C (Table 2) indicated the presence of  $\beta$ -glucosidases and cellobiohydrolases, which was confirmed by identification of protein members of families GH3A for  $\beta$ -glucosidase activity and GH6 and GH7 for exocellobiosidase activity. Results from the secretome analysis of peptide matches to CBM1 (3.42%), GH2A (2.16%), GH6A and B (4.16%), GH7A and B (8.33%), GH12 (4.16%), and GH61 (4.16%), totaling 28%, were corroborated by the activities of the *T. harzianum* secretome in hydrolyzing CMC, microcrystalline cellulose, pNP-C, sugarcane bagasse, and other cellulosic carbon sources (Table 2). CBM 1 is often coupled to a GH6 and GH7 catalytic domain, contributing to high



**Fig. 2.** Distribution of protein with similarity to the CAZy families. Tandem mass spectrometry (MS/MS) analyses of the supernatant from *T. harzianum* grown for 72 h on delignified steam-exploded sugarcane bagasse revealed the presence of 24 different proteins, which were distributed in 12 different CAZy families.

**Table 3**

ANOVA of the model predicted for glucose equivalent release from biomass hydrolysis, supplementing the *Trichoderma harzianum* cellulolytic enzyme complex with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (X1) and pectinase (X2).

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F-test <sup>a</sup>
Regression	1.422	2	0.711	106.72
Residual	0.053	8	0.007	
Total	1.476	10		

Coefficient of determination ( $R^2$ ) = 0.96.

<sup>a</sup>  $F_{0.05; 2; 8} = 4.46$ .

cellobiohydrolase and exocellobiohydrolase activity, which has not been previously reported in the literature for these genera.

Based on the total number of peptides identified, the majority of components found in the *T. harzianum* secretome were from the GH3 family ( $\beta$ -glucosidases and  $\beta$ -xylosidases classified as GH3A

**Table 4**Mass spectrometric identification of proteins in supernatants from *T. harzianum* grown for 72 h on delignified steam-exploded sugarcane bagasse (DSB).

Best Match Accession	Cazy ID	Protein ID [Organism]	Peptide sequence (amount)	m/z, charge	Total Number of Peptides	Number of different Unique peptides	Protein Score
gi  74619305	CBM_1	Xyloglucanase [ <i>T. reesei</i> ]	GATWSFTNLFPK (3) LGGGGGFVPGIIFHPK (3) LAVDPANSNIIFYGAR (2)	684.8272, 2+ 776.9115, 2+ 860.9272, 2+	8	2	306
gi  31747158	CBM_1	Cip1 [ <i>T. reesei</i> ]	IGGQSQVLDYNR (4) LQTALGSNHVTFIIMPDTAQGGK (9) LQTALGSNHVTFIIMPDTAQGGK (2)	675.3044, 2+ 800.3913, 3+ 1200.0975, 2+	15	2	691
gi  31747154	CBM_1	Cip2 [ <i>T. reesei</i> ]	QAEMSELIQR (3) VIDALELVPGAR (5) LNDLFTMFNGDKVTTK (2) WCCGPGADHCGEIDFK (2)	602.7738, 2+ 626.8302, 2+ 615.3081, 2+ 636.8992, 2+	10	3	380
gi  8052455	CBM_1	Swollenin [ <i>T. reesei</i> ]	YGSWVPIQSGSPFNLPVGIR (9) YGSWVPIQSGSPFNLPVGIR (8) GSVTASWTDPMGLGATCDAECTAYPLLCK (3)	1072.5203, 2+ 767.6740, 2+ 1547.1776, 2+	22	4	804
gi  121794	GH2 A	Endoglucanase EG-II [ <i>T. reesei</i> ]	LPVGWQYLVNNNLGGNLDSTSISK (5) LPVGWQYLVNNNLGGNLDSTSISK (10) WNGGIQGGPTNAQFTSLWSQLASK (6) WNGGIQGGPTNAQFTSLWSQLASK (4) YLDSDNSGTHAECTTNNIDGAFSPLATWLR (6)	1295.1200, 2+ 863.7575, 3+ 1359.6526, 2+ 906.7743, 3+ 1109.4735, 3+	31	3	2237
gi  506848	GH2B	$\beta$ -mannase [ <i>T. reesei</i> ]	VWGFNDVNTQPSPGQIWFQK (2)	1174.5569, 2+	4	2	134
gi  70990956	GH3A	$\beta$ -glucosidase [ <i>A. fumigatus</i> ]	LSATGSTINTGADGLQTLDYVVSQAEQHNLK (2) HFDKR (1) SHSQIIR (1) IFLAPGEQK (1) CVGQTGSVPR (1) VNDFVNVQR (4) GIQDAGVIATAK (3) IPPNFSSWTR (5) GVDILLGPAAGPLGK (4) AVEIVSQMTLAEK (13) HYILNEQEHR (2) AGGAPGGNPTLYQDLVR (3) TMHELYLWPFADAVR (5) LGINWGLCGQDPSPLGIR (23) DLANWDVEAQDWVITK (28) FSDLNSAFPAGTINVAATWDK (5) VGVLGEDAGSNPWGANGCPCR (1) AMGEEFBDKGV DILLGPAAGPLGK (8) IWEGFSPDPALTVLFAETIR (14)	351.6940, 2+ 420.7373, 2+ 501.7596, 2+ 530.7298, 2+ 545.7422, 2+ 572.2980, 2+ 602.7640, 2+ 689.3679, 2+ 709.8741, 2+ 743.3159, 2+ 843.3888, 2+ 924.9318, 2+ 928.4282, 2+ 951.9573, 2+ 1056.2110, 2+ 1064.4467, 2+ 800.3818, 3+ 1160.0617, 2+	108	18	4173
gi  119496635	GH3 A	$\beta$ -glucosidase [ <i>N. fischeri</i> ]	ISYPSLCLQDGPLGVR (4)	887.9135, 2+	14	1	4127
gi  227874	GH3 A	$\beta$ -glucosidase [ <i>T. reesei</i> ]	ISYPSLCLQDGPLGVR (4)	887.9135, 2+	4	1	310
gi  1352079	GH3 A	$\beta$ -glucosidase [ <i>A. aculeatus</i> ]	HYILNEQEHR (1)	743.3159, 2+	2	1	112
gi  259481308	GH3 A	$\beta$ -glucosidase [ <i>A. nidulans</i> ]	HYILNEQEHR (1)	495.9025, 3+	2	1	218
gi  169595060	GH3B	$\beta$ -xylosidase [ <i>P. nodorum</i> ]	TMHELYLWPFAGVVR (6)	743.3159, 2+ 495.9025, 2+	6	1	53
gi  2791278	GH3 B	$\beta$ -xylosidase [ <i>T. reesei</i> ]	LSIPIVSALAR (1)	924.9319, 2+	4	2	
gi  121855	GH6 A	Exocellobiohydrolase II [ <i>P. nodorum</i> ]	TLLVIEPDSLNLVTLNLGTPK (12)	618.8775, 2+	12	1	3268
gi  52547947	GH6 B	Cellobiohydrolase II [ <i>T. parceramosum</i> ]	TILVIEPDSLNLVTLNLGTPK (4) TILVIEPDSLNLVTLNLGTPK (8)	726.3460, 2+ 1104.5925, 2+ 726.3426, 3+	12	1	3268
gi  42741023	GH7 A	Cellobiohydrolase I [ <i>T. asperellum</i> ]	CTSGGCTTQSGKVVLDANWR (26)	1142.4909, 2+	26	1	19
gi  809286	GH7 A	Cellobiohydrolase I [ <i>T. reesei</i> ]	VTFESNIK (2) GGLTQFKK (1) YPTNTAGAK (3) LTVVTQFETSGAINR (68) KLTVVTFETSGAINR (89) YGGTCDPDGCDWNPYR (3) CSSGGTCTQQTGSVVLDANWR (28) NCCLDGAAYASTYGVTTSGNSLSIGFVTQSAQK (55)	404.7087, 2+ 439.7151, 2+ 461.7188, 2+ 808.4088, 2+ 882.4585, 2+ 966.8201, 2+ 1142.4909, 2+ 1143.5105, 3+	242	7	12000
gi  121788	GH7 B	Endoglucanase EG-1 [ <i>T. reesei</i> ]	SYYPGPDVTDTSK (3) LYLLSDGEYVMLK (19) SGGCVAQDTSVVDWNYR (21)	695.2718, 2+ 829.8926, 2+ 1013.9591, 2+	43	3	1904
gi  67900828	GH10	Xylanase [ <i>A. nidulans</i> ]	GDVIADLADANGQYLR (4)	845.8782, 2+	4	1	222
gi  560649	GH10	Xylanase [ <i>N. patriciarum</i> ]	LFYNDYNAEGVYAK (4)	833.8454, 2+	6	1	
gi  455907	GH11	Endoxylanase II [ <i>T. reesei</i> ]	LGEVTS DGSVYDIYR (71)	837.3587, 2+	71	1	4070
gi  549460	GH11	Endo-1,4- $\beta$ -xylanase [ <i>T. reesei</i> ]	VNEPSIQGTATFNQYISVR (40)	1062.5211, 2+	40	1	1752

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Best Match Accession	Cazy ID	Protein ID [Organism]	Peptide sequence (amount)	m/z, charge	Total Number of Peptides	Number of different Unique peptides	Protein Score
gi  2116583	GH12	Endo-1,4- $\beta$ -glucanase [ <i>T. reesei</i> ]	SYQNSQIAIPQKR (2) SYQNSQIAIPQKR (2) TVNSISSMPTTASWSYSGSNIR (5)	766.8639, 2+ 511.5941, 3+ 1173.5120, 2+	9	2	748
gi  21263647	GH61	Endo-1,4- $\beta$ -glucanase [ <i>T. reesei</i> ]	IPDNLAPGNYVLR (2)	721.3456, 2+	2	1	78
gi  67900828	–	Hypothetical protein AN7401.2[ <i>A. nidulans</i> ]	GDVIADLADANGQYLR (4)	845.8782, 2+	4	1	222
gi  238594994	–	Hypothetical protein MPER_06595 [M. perniciosus]	QSQLEQTPDSLR (7)	701.3579, 2+	7	1	77
gi  169595060	–	Hypothetical protein SNOG_00263[ <i>P. nodorum</i> ]	TMHELYLWFAEGVR (6)	924.9318, 2+	6	1	53
gi  171682848	–	Hypothetical protein [P. Anserina]	IGGQNSILMFNR (4)	675.3044, 2+	4	1	44
gi  134055701	–	Unnamed protein product [A. niger]	SHSPEKR (2)	420.7373, 2+	1	1	41
gi  26567188	–	Hypothetical protein PAAG_01497 [P. brasiliensis]	SHSPVASR (2)	420.7373, 2+	2	1	41
gi  266424824	–	Hypothetical protein [T. melanosporum]	IPDNLAPGNYVLR (2)	721.3456, 2+	2	1	36
gi  171682848	–	Hypothetical protein [P. Anserina]	KWAEYMQAENEMEAGGWR (7)	1143.0010, 2+	7	1	20

and GH3B are correlated with activities for pNP-G and pNP-X, respectively), which accounted for up to 21% of the protein matches. This family is known to include members with  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase activities (Cantarel et al., 2009).

Hemicellulosic enzymes, such as xylanolytic enzyme members of the GH10 and GH11 families, also counted as an important component, comprising 16.66% of the total peptides identified. The activities of these enzymes were detected using *in natura* bagasse, wheat arabinoxylan, and beech wood xylan substrates (Table 2). One  $\beta$ -mannase, contributing 2% of total peptides, was also identified in the *T. harzianum* secretome, and was validated by activity against mannan ( $1.94 \pm 0.11$ ) in the substrate panel (Table 2).

A number of protein hits for polysaccharidases were found, at a low level of significance, which could be explained by the presence of enzymes that were insoluble and/or remained firmly bound to lignocelluloses, or by the unavailability of a representative genome, together with the possibility that proteins may be under-represented in the type of microenvironment studied. No GH families associated with enzymatic hydrolysis of polysaccharides such as larch arabinogalactan, linear arabinan, and pectin were identified, supporting the results of the panel activities (Table 2). These

results, together with those described previously, prompted the hypothesis that pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase enzymes might be good candidates for enhancing the cellulolytic enzyme complex produced by *T. harzianum*. A set of experiments was therefore performed in order to evaluate the effect of supplementation of the *T. harzianum* enzymatic complex with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and pectinase enzymes.

### 3.3. *T. harzianum* extract supplementation with $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and pectinase

The effects of AF and pectinase supplementation on the hydrolytic efficiency of *T. harzianum* were evaluated using a central composite design (CCD) at five different levels. Table 1 presents the experimental conditions and the responses for the concentration of reducing sugars (g/L). The analysis of variance (Table 3) showed that the correlation coefficient (0.96) and the F-value (106.72, which is 20-fold higher than the listed value at a 95% level of confidence) were very satisfactory for predicting the model used to describe the response surface plot for EH efficiency in terms of the reducing sugar concentration (Eq. (2)).

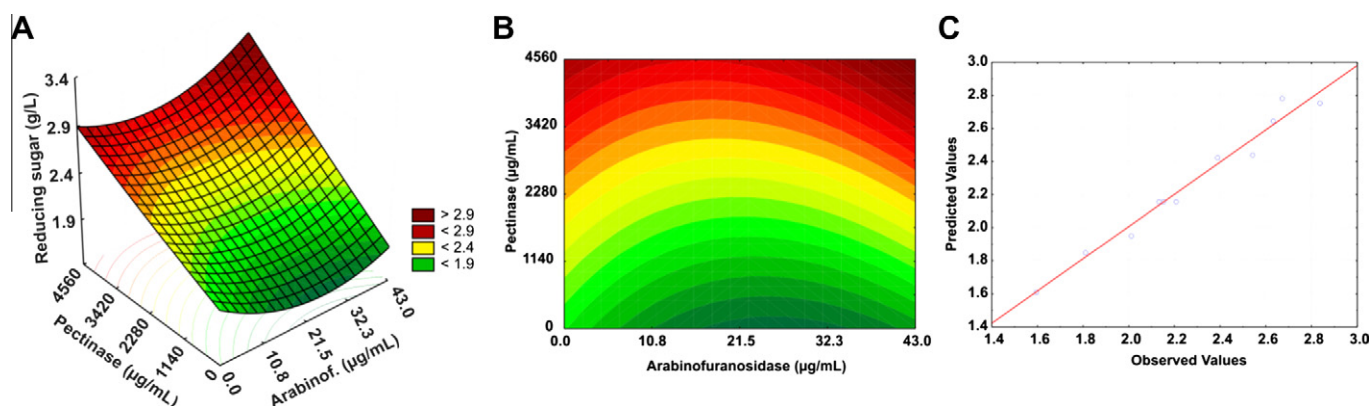


Fig. 3. Optimization of AF and pectinase supplementation in the *T. harzianum* cocktail used for sugarcane bagasse hydrolysis: (A) response surface, (B) contour plot, and (C) plot of experimental vs. predicted values for the release of reducing sugar (g/L) from sugarcane bagasse. The highest response values are indicated in the dark red area. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

$$Y_{\text{Glucose eq (g/L)}} = 2.17 + 0.13X_1^2 + 0.40X_2 \quad (2)$$

Eq. (2) includes only the significant terms, for which *p*-values were less than 0.05. As shown in Fig. 3, although both AF and pectinase enzymes showed a positive effect on EH efficiency, the pectinase enzyme had a greater positive effect than AF. The amount of reducing sugars obtained during EH using the *T. harzianum* extract without supplementation was 1.31 g/L (Fig. 1). Supplementation with pectinase and AF improved the amount of reducing sugars released by up to 116% (2.83 g/L was achieved during run 8).

The positive effect of AF on EH efficiency can be explained by the removal of arabinose residues from the xylan chain, which can further contribute to the action of endoxylanases. As mentioned before, a recent study on the composition of sugarcane cell wall revealed that cellulose accounts for ~30% of cell wall, hemicellulose ~50% and pectins ~10% and that the hemicellulose fraction contains a considerable amount of arabinoxylan (de Souza et al., 2012). A more effective degradation of the hemicellulosic fraction implies higher EH yields of cellulose (Alvira et al., 2011).

In the same way, the positive effect of pectinase on EH of sugarcane can be explained by the removal of the pectin fraction that remained on the pretreated material.

Hemicellulose, and possibly pectin, is thought to restrict the access of cellulases to their substrate in pretreated lignocellulose (Berlin et al., 2007). Positive effects on EH hydrolysis were observed here by supplementation of *T. harzianum* extracts with AF and pectinase enzymes.

Since the findings suggested that supplementation of the *T. harzianum* cocktail with additional enzymes could lead to an increase in saccharification, a projection was made based on the four saccharification assays. This found that the amount of reducing sugar was 51% higher (due to the increase from 1.5 to 3.3 g/L) for *T. harzianum* hydrolysis, compared to the best cocktail previously assayed for *P. echinulatum* (2.2 g/L) (Fig. 1). It is therefore clear that the addition of specific accessory enzymes to the enzymatic extract produced by a fungus such as *T. harzianum* can improve the saccharification of pretreated sugarcane bagasse, making the process more effective.

#### 4. Conclusions

A new strain of *T. harzianum* isolated from the Amazon rainforest was found to be a potential candidate for the formulation of optimized enzyme mixtures for the saccharification of plant biomass. Supplementation of the enzymatic cocktail produced by *T. harzianum* with pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase had a positive effect on the enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse. The activities of the two enzymes operated synergistically, and the supplementation resulted in greater sugar release. The data suggested important roles for pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase in the enzymatic synergies inherent in sugarcane bagasse hydrolysis, making the process more effective and competitive.

#### Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agencies CNPq and FAPESP for financial support, and the technical staff of the National Laboratory

of Science and Technology of Bioethanol (CTBE). We gratefully acknowledge the provision of time on the MAS facilities (LNBio) at the National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM).

#### References

- Alvira, P., Negro, M.J., Ballesteros, M., 2011. Effect of endoxylanase and alpha-L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 4552–4558.
- Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N., Saddler, J., 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 287–296.
- Bian, J., Peng, F., Peng, X.P., Xu, F., Sun, R.C., Kennedy, J.F., 2012. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: structure and properties. *Carbohydr. Polym.* 88, 638–645.
- Bradford, M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZY): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, 233–238.
- de Souza, A.P., Leite, D.C.C., Pattahil, S., Hahn, M.G., Buckeridge, M.S., 2012. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenerg. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-012-9268-1>.
- Delabona, P., Farinas, C., da Silva, M., Azzoni, S., Pradella, J., 2012a. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresour. Technol.* 107, 517–521.
- Delabona, P., Pirola, R., Codima, C., Tremacoldi, C., Rodrigues, A., Farinas, C., 2012b. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulosic enzymes. *Biomass Bioenergy* 37, 243–250.
- Dillon, A.J.P., Zorgi, C., Camassola, M., Henriques, J.A.P., 2006. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of penicillium echinulatum producing increased cellulase and beta-glucosidase activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (6), 740–746.
- Gao, D.H., Uppugundla, N., Chundawat, S.P.S., Yu, X.R., Hermanson, S., Gowda, K., Brumm, P., Mead, D., Balan, V., Dale, B.E., 2011. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnol. Biofuels* 4, 11.
- Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.
- Harris, P.V., Welner, D., McFarland, K.C., Re, E., Poulsen, J.C.N., Brown, K., Salbo, R., Ding, H.S., Vlasenko, E., Merino, S., Xu, F., Cherry, J., Larsen, S., Lo Leggio, L., 2010. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry* 49, 3305–3316.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.* 40, 2931–2944.
- Jorgensen, H., Olsson, L., 2006. Production of cellulases by penicillium brasilianum IBT 20888 – effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 381–390.
- Kovacs, K., Macrelli, S., Szakacs, G., Zacchi, G., 2009. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with trichoderma atroviride enzymes produced in-house. *Biotechnol. Biofuels* 2, 11.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100, 4203–4213.
- Mandels, M., Weber, J., 1969. Production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.* 95, 391–414.
- Rocha, G.J.M., Goncalves, A.R., Oliveira, B.R., Olivares, E.G., Rossell, C.E.V., 2012. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 35, 274–279.
- Sorensen, A., Teller, P.J., Lubeck, P.S., Ahring, B.K., 2011. Onsite enzyme production during bioethanol production from biomass: screening for suitable fungal strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1058–1070.
- 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* 34, 421–424.
- Sun, X.F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 860–870.



## Capítulo V

### **A novel strategy to enhance cellulase production by *Trichoderma harzianum* using glycerol followed by induction with a cellulosic material**

#### **Artigo Submetido na Revista Waste and Biomass Valorization**

Os resultados obtidos neste trabalho referem – se aos objetivos 6 e 7 do item 1.2.1. Nesta etapa do trabalho foi avaliada a influência de diversas fontes de carbono na fase de pré-cultura objetivando encontrar a melhor fonte de carbono “crescedora”, a qual foi analisada em termos de secreção da proteína total e morfologia fúngica. Na fase de indução foram propostas diferentes estratégias de alimentação em batelada e batelada alimentada e a melhor estratégia foi avaliada em biorreator.

**A novel strategy to enhance cellulase production by *Trichoderma harzianum* using glycerol followed by induction with a cellulosic material**

Priscila da Silva Delabona<sup>a,b\*</sup>, Deise Juliana Lima<sup>a</sup>, Diogo Robl<sup>a</sup>, Sarita Cândida Rabelo<sup>a</sup>, Cristiane Sanchez Farinas<sup>b,c</sup>, José Geraldo da Cruz Pradella<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory – CTBE, Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, Pólo II de Alta Tecnologia, Caixa Postal 6192, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup>Graduate Program of Biotechnology, Federal University of São Carlos, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

<sup>c</sup>Embrapa Instrumentation, Rua XV de Novembro 1452, CEP 13560-970, São Carlos, São Paulo, Brazil

\*Corresponding author. Phone: 55 (19) 3518-3154; Fax: 55 (19) 3518-3104

E-mail: priscila.delabona@bioetanol.org.br

**Abstract**

The use of glycerol derived as an intermediate of the biodiesel production process as carbon source for microbial growth is a potential alternative strategy for the production of enzymes and other high-value bioproducts. This work evaluates the production of cellulase enzymes by using glycerol for high cell density growth of *Trichoderma harzianum* followed by induction with a cellulosic material. Initially, the influence of the carbon source used in the pre-culture step was investigated in terms of total protein secretion and fungal morphology. After that, different cultivation strategies involving the type and concentration of carbon source as well as the feeding procedure (batch versus fed-batch) was studied in terms of the enzymatic production during cultivation. The best strategy for cellulase production was then further studied in a larger scale using a stirred tank bioreactor. The proposed strategy for cellulase production using glycerol for high cell density growth followed by induction with pretreated sugarcane bagasse achieved enzymatic activities up to  $2.27 \pm 0.37$  FPU/mL,  $106.40 \pm 8.87$  IU/mL,  $9.04 \pm 0.39$  IU/mL of cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase, respectively. These values are 2 times higher when compared to control. This novel strategy proved to be a promising approach for improving cellulolytic enzymes production and it can also potentially contribute to biomass valorization within the biofuels sector.

**Keywords:** Glycerol, *Trichoderma harzianum*, cellulases, pre-treated bagasse, bioethanol, biodiesel, enzymes



## 1. Introduction

A lot of research effort has been focused on developing more economical processes for the production of the enzymes needed for second generation ethanol production. Among the potential alternatives, the use of glycerol as a carbon source for microbial growth is being evaluated as a strategy for the production of enzymes [1] and other high-value bioproducts [2-6]. Such economic advantage is because large volumes of crude glycerol are generated as a co-product in the production of biodiesel, with 10 lbs of crude glycerol being generated for every 100 lbs of biodiesel produced [7]. According to Yang et al. [8] the global biodiesel market is estimated to reach 37 billion gallons by 2016 with an average annual growth of 42%, which means that about 4 billion gallons of raw glycerol will be produced. Glycerol stemming from biodiesel production flooding the market has led to a dramatic decrease in prices of glycerol [9]. Thus, the development of processes to convert this low-value glycerol into high-value products via biological or chemical routes is of great interest. Biological conversion can particularly offer the opportunity to synthesize a large array of products with diverse functionalities. Among such products, cellulase enzymes stand as an interesting alternative for the biological transformation of glycerol.

Cellulase is a group of enzymes mainly consisting of endoglucanases, cellobiohydrolases (exoglucanase), and  $\beta$ -glucosidase, which act synergistically in the conversion of cellulose into glucose [10]. The production efficiency of cellulases depends on the choice of microorganism (yield and productivity), the carbon and nitrogen sources (substrates), and the cultivation conditions (temperature, aeration, and pH-value, among others). It is generally conceived that glucose is a primary carbon source for filamentous fungi growth and that the protein secretion and biomass

production depends on the choice of carbon source. However, in cellulolytic fungi such as *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*, the use of glucose as carbon source leads to a strong repression of cellulase transcription genes toward a mechanism known as catabolite repression [11]. On the other hand, glycerol was found to be also a very assimilable carbon source for *Trichoderma* growth but instead did not promote cellulase repression [12].

In a previous work [13] we have reported on the cultivation of *Trichoderma harzianum* P49P11 using different insoluble carbon source (sugarcane bagasse) and soluble carbon sources (fructooligosaccharide, sucrose, lactose, and glycerol) and their binary combinations for cellulase production. Good yields of cellulase induction was achieved with all cellulosic insoluble carbon source tested. Instead, the use of glycerol and lactose as carbon source resulted in very low cellulase induction although the biomass growth has been very satisfactory for all of the carbon sources tried. Therefore, it seemed like a potential strategy to evaluate the use of glycerol only for the initial microbial biomass growth, which then could be followed by the addition of a more convenient cellulase inducer. The selection of a carbon source that is able to substantially enhance the fungal growth without leading to catabolite is highly desirable, since a high concentration of microbial biomass is desired in a cultivation process in order to maximize the volumetric productivity of the enzyme and to attain high titers. Therefore, the use of high-cell density cultivation would be required for improving cellulases production. To the best of our knowledge, there is no work on the evaluation of such strategy for improving cellulase production by *T. harzianum*.

In this paper, the influence of different substrates selected as “carbon source for growth” and “carbon source for induction” for *Trichoderma harzianum* biomass and

cellulase production was investigated. Larger scale cultivations in a stirred tank bioreactor were carried out for the selected conditions. The combined use of glycerol for high-cell density growth followed by cellulase induction using pretreated sugarcane bagasse is being proposed as a novel strategy for improving cellulase production.

## **2. Methods**

### **2.1. Microorganism**

The *Trichoderma harzianum* P49P11 strain used in this work is a wild-type strain isolated from the Amazon rainforest [14]. This strain is deposited at the Embrapa Food Technology microorganism collection (Rio de Janeiro, Brazil) and the strain number is BRMCTAA 115. It was stored at 4 °C on slants of potato dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, USA). The PDA plates were incubated at 29°C for 7 days.

### **2.2. Pretreated sugarcane bagasse**

Three different pretreated sugarcane bagasse were used, the steam explosion pretreatment (SB), the delignified steam-exploded (DSB), and the hydrothermally pretreated bagasse (HB). The steam-exploded bagasse was pretreated by steam explosion (200°C, 15 minutes) and the delignified steam-exploded was the same procedure followed by delignification (100 g/L pulp concentration 10 g/L NaOH, 30°C, 2 h), as described by Rocha et al. (2012). The hydrothermally pretreated bagasse was prepared using a solid/liquid ratio of 1:10 (w/w), in a 2 L high-pressure reactor (Parr 4848) at 190 °C for 12 min.

Chemical compositions of the pretreated bagasse were determined according to National Renewable Energy Laboratory (NREL) method [15]. Pretreated sample were hydrolyzed with 72% (w/w) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 1 h at 30°C in a thermostatic bath. Samples were

diluted to 4% (w/w) acid concentration, and then autoclaved at 121°C for 1 h in pressure glass tubes. After filtration, insoluble lignin content was determined gravimetrically, corrected by its ash content, while soluble lignin was determined, by ultraviolet absorbance in 280 nm, in the filtrate. Carbohydrates, organic acids and furanic aldehydes were determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

In addition, the dried and milled pretreated bagasses were combusted in a furnace at 575°C and the remaining ash was measured. The Table 1 summarizes the composition of cellulose, hemicelluloses, lignin and ash in percentage of the SB, DSB and HB.

**Table 1:** Composition of cellulose, hemicellulose, lignin and ash in percentage of the pretreated sugarcane bagasse.

<b>Bagasse</b>	<b>Cellulose</b> (%)	<b>Hemicellulose</b> (%)	<b>Lignin</b> (%)	<b>Ash</b> (%)
Steam-pretreated Bagasse (SB)	57.1±0.3	10.9±0.1	27.6±0.8	4.6±0.0
Delignified steam-exploded pretreated bagasse (DSB)	74.0±0.1	6.8±0.1	16.2±0.0	4.9±0.1
Hydrothermal pretreated bagasse (HB)	74.0±1.3	6.0±0.5	26.0±0.1	0.2±0.1

## 2.2 Enzyme production

In the present paper enzyme production was divided in two steps: a) a pre-culture in a carbon source followed by b) induction with pretreated sugarcane bagasse DSB.

### **a) Selection of pre-culture conditions**

A conidia suspension, prepared by adding 20 mL of sterilized distilled water and Tween 80 to the grown PDA plates, was transferred to Erlenmeyer flasks containing 180 mL of pre-culture medium (adapted from Mandels and Weber [16]). The composition of the medium was as follows: 1 mL Tween 80; 0.3 g/L urea; 2.0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1.4 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.4 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1.0 g/L proteose peptone; 5.0 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1.6 mg/L  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 1.4 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2.0 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and the carbon source, as shown below. Unless stated, 50 mM potassium phthalate buffer was employed in order to mitigate the effect of pH fluctuations on enzyme production. The initial pH was adjusted to 5.0 and the pre-culture medium was sterilized at 121 °C for 30 min and incubated for 96 hours at 29 °C on a rotary shaker at 200 rpm.

For evaluation of the best pre-culture by the maximum amount of total protein excreted [17] we used the following carbon sources: lactose (10 g/L), glycerol (10 g/L) as carbon source for growth; sucrose (10 g/L), 10, 40 and 80% (v/v) of the filtrate fractions obtained after hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse liquor, (10 g/L) fructooligosaccharide (FOS) (Nutraflora<sup>®</sup>, Corn Products, Brazil), as carbon source for both growth and induction, Celufloc<sup>™</sup> 200 (10 g/L) and three types of pretreated sugarcane bagasse at 10 g/L each (steam-exploded (SB), delignified steam-exploded (DSB) and hydrothermally pretreated bagasse (HB) as carbon source for induction.

### **b) Selection of the cellulase induction strategy**

After the 48 h period of pre-culture, a 10% (v/v) volume (prepared as described above) was inoculated into 200 mL of culture medium in 500 mL Erlenmeyer flasks. The

composition of the induction medium was the same as that of the pre-culture medium, except for the type of carbon source, which is specified below. The flasks were incubated at 29 °C on a rotary shaker at 200 rpm for a total period of 120 h. Besides the two control conditions, five different cultivation strategies were tested, as follows:

**Control experiment 1** - Pre-culture using 10g/L of glucose and 10g/L of Celufloc™ as carbon source followed batch induction with 10g/L DSB.

**Control experiment 2** - Pre-culture using 20g/L of glucose and 10g/L of Celufloc™ followed batch induction with 10g/L DSB.

**Strategy 1**- Pre-culture using 10g/L of glycerol and batch induction with 10g/L DSB

**Strategy 2**- Pre-culture using 10g/L of glycerol and fed-batch induction with an initial DSB concentration of 10 g/L, followed by two further DSB additions at 36 and 60 h of fermentation to give a total of 30 g/L.

**Strategy 3**- Pre-culture prepared using 20g/L of glycerol and batch cultivation with 10 g/L DSB.

**Strategy 4**- Pre-culture prepared using 10g/L of glycerol and fed-batch induction with an initial DSB concentration of 20 g/L, followed by two DSB further additions at 36 and 60 h of fermentation, to give a total of 30 g/L.

**Strategy 5**- Pre-culture prepared using 20g/L of glycerol and batch induction with 30g/L DSB.

The activities of cellulases, xylanases and  $\beta$ -glucosidases were measured at 24 h intervals according to the methodology described in Section 2.7. All cultivations were performed in duplicate.

## **2.5. Microscopic observations**

Microscopic observations of the fermentation broth were carried out using a Microscope Nikon Eclipse E100 (Tokyo, Japan) with DS-U3 Digital Camera Control and NIS Elements software. It was collected sterile 20  $\mu$ L from pre-culture sample using glucose and glycerol after 72 hours. The images were made using focus with the 40x/0.65 objective.

## **2.6. Cultivations in bioreactor using high-cell density**

A 110 mL volume of the pre-culture using glycerol 20g/L was transferred to a BioFlo 115 fermenter (New Brunswick Scientific Co., USA) equipped with automatic control of temperature, pH, agitation rate (Rushton impeller), and aeration rate. The working volume of the fermenter was 1.1 L, and the temperature was maintained at 29 °C. The medium used was the same as that employed for the pre-culture, except that the carbon source was delignified steam-exploded sugarcane bagasse (DSB) (30 g/L, Batch culture). The aeration rate was adjusted so that the dissolved O<sub>2</sub> level in the culture medium did not drop below 30% of air saturation. The pH was controlled at pre-set values using either 0.4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or aqueous NH<sub>4</sub>OH solution (1:3). Foaming was controlled by the manual addition of previously sterilized polypropylene glycol antifoaming agent (P2000, Dow Chemical, Brazil). The antifoaming agent was added in a proportion of 1 mL per liter at the beginning of each cultivation. Samples were periodically removed, centrifuged at 10,000 g for 20 min (at 4 °C), and measurements made of the enzyme activities (as described in Section 2.7).

## 2.7. Analytical Methods

Filter paper activity (FPase) was determined as described by Ghose [18], with modifications to reduce the scale of the procedure by a factor of ten. Reducing sugars were measured by the DNS method, using glucose as standard. The activity of  $\beta$ -glucosidase was measured at pH 4.8 using p-nitrophenol- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) (Sigma-Aldrich, USA). The assay was carried out using 20  $\mu$ L of diluted centrifugation supernatant and 80  $\mu$ L of 1 mM pNPG, diluted in 50 mM citrate buffer (pH 4.8), and the mixture was incubated for 10 minutes at 50 °C. The reaction was stopped by adding 100  $\mu$ L of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and the absorbance was measured at 400 nm. The xylanase activity was determined employing 50  $\mu$ L of 0.5% xylan birchwood, 40  $\mu$ L of 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8), and 10  $\mu$ L of enzyme extract (supernatant from the centrifuged culture). After 10 min of incubation at 50 °C, the reaction was stopped by adding 100  $\mu$ L of DNS reagent, the measurement was made at 540 nm, and the standard curve was constructed with xylose.

Total protein was measured on the centrifuged supernatant in micro plates using Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, USA), with a procedure based on the Bradford method [17]. Bovine serum albumin was used as standard.

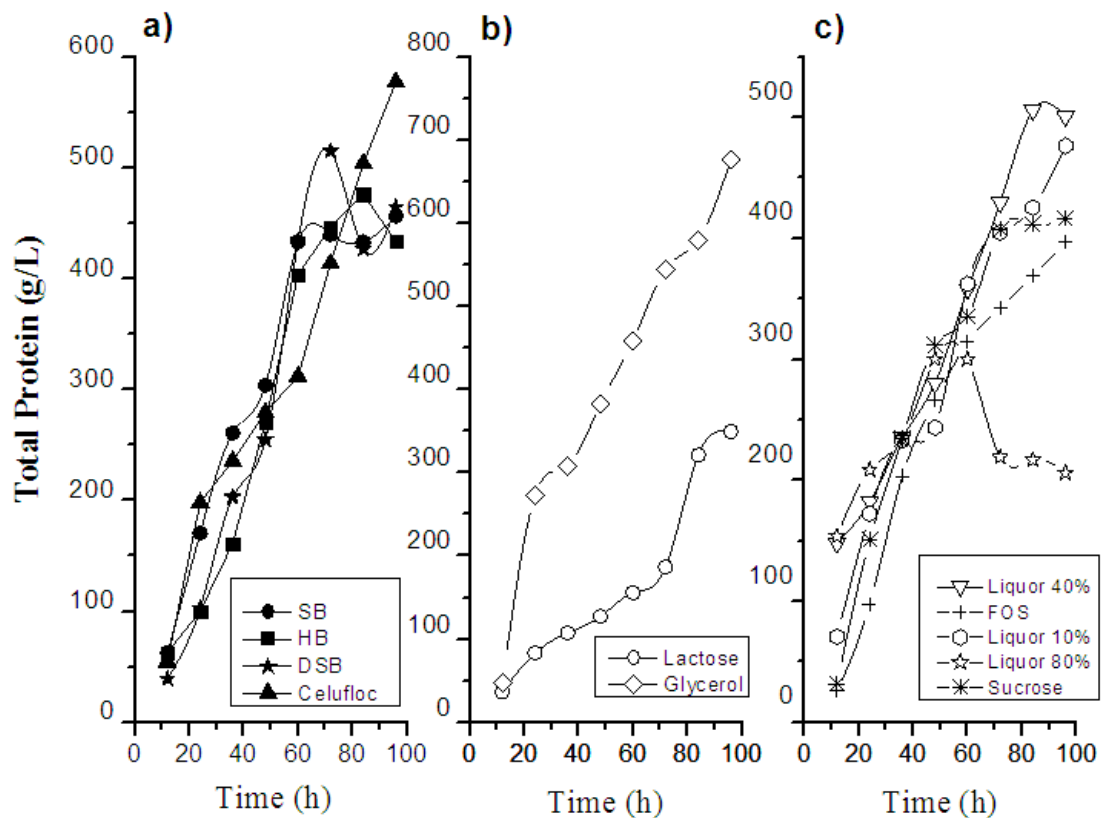
The biomass concentration in the pre-culture samples for bioreactor fermentation was determined employing 50 mL of culture medium, which was centrifuged in a 50-mL Falcon tube (10.000 rpm, 20 min, 10 °C), followed by removal of the supernatant using a pipette and the biomass was dried at 80 °C for overnight and weighed.



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Effect of the carbon source used in the pre-culture step

Figure 1 shows the effect of the carbon source used in the pre-culture step on the time course for the total amount of protein secreted by *T. harzianum*. At this set of cultivations, 11 different carbon sources were investigated in order to select the best carbon source to achieve a high microbial growth.



**Figure 1:** Effect of carbon source on *T. harzianum* pre-culture regarding total protein secretion using (a) steam-exploded (SB), delignified steam-exploded (DSB) hydrothermally pretreated bagasse (HB) and Celufloc<sup>TM</sup> 200 for induction (b) lactose and glycerol for growth and (c) sucrose, 10, 40 and 80% (v/v) hydrothermal

pretreatment of sugarcane bagasse liquor and fructooligosaccharide (FOS) for growth and induction. (Concentration of tested carbon source was 10 g/L excepted for the Liquor).

Fig. 1 (a) shows the effect on total protein secretion by *T. harzianum* when using carbon sources that are considered as cellulases inducers (SB, HB, DSB, and Celufloc™ 200) [13]. In this group, the best carbon source for total protein production was DSB (7.15 mg/L h of total protein) followed by Celufloc™ 200 (6.01 mg/L h). The use of pretreated bagasses SB and HB resulted in similar results, 4.75 mg/L h and 5.66 mg/L h, respectively.

In Fig. 1 (b) is shown the effects on total protein secretion when using glycerol and lactose as carbon source in this pre-culture step. The glycerol was the best carbon source for protein secretion considering improved rate (7.5 mg/L h at 72 h) and higher secretion (676.70 mg/L of total protein after 96 h of cultivation). Similar behavior was also reported when glycerol was used as carbon source for phytase production, an important industrial enzyme used as an animal feed additive in diets largely for swine, poultry and fish [1]. According to the results by these authors glycerol outperformed the glucose and methanol as carbon sources in terms of both protein expression and cell growth, corroborating with the results obtained in this study.

Lactose is known to be a carbon energy source for cellulases production and a fine inducer of protein synthesis in *T. reesei* but did not improve total protein secretion in *T. harzianum* P49P11 (3.64 mg/L h). This result corroborates with Delabona Pda et al. [19] (3.02 mg/L h) using lactose and the same strain on pre-culture using submerged fermentation.

Fig. 1 (c) presents the results of protein secretion for different carbon source for both growth and induction: sucrose, hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse liquor at 10, 40 and 80% (v/v) (Liquor) and fructooligosaccharide (FOS). For all of these soluble carbohydrates sources, the protein secretion did not vary much within the first 60 hours (Sucrose: 5.58 g/L h; Liquor 10%: 6.03 g/L h; Liquor 40%: 5.96 g/L h; Liquor 80%: 5.0 g/L h and FOS: 5.24 g/L h). The Liquor 80% was the carbon source that the total protein was reduced after 72 hours until the end of cultivation. This decrease on total protein was attained probably due to the inhibitors high contents such as acetic acid ( $1,47 \text{ g/L} \pm 0,18$ ), formic acid ( $0,23 \text{ g/L} \pm 0,10$ ), furfural ( $1,05 \text{ g/L} \pm 0,06$ ), and soluble lignin ( $3,15 \text{ g/L} \pm 0,49$ ). Michelin et al. [20] using *Aspergillus terricola* and *Aspergillus ochraceus* and corncob autohydrolysis liquor as the carbon source on microbial growth medium obtained the similar results. However, lower concentrations of Liquor (10 and 40% v/v) appeared to induce protein synthesis. The hemicelluloses are decomposed into soluble products, including xylooligomers and xylose that can be used as substrate for protein production such as xylanases. The liquor that was used in this study contains very high levels of xyloligosaccharides and free xylose (10 and 5 g/L, respectively). The pre-culture condition using the sucrose maintained the same protein secretion as the one mentioned above, 5.96 g/L h.

Microbial growth is normally associated with exponential increases in biomass when conditions are favorable for growth and when nutrients are not limited. In a recent work, protein secretion was correlated with FPase activity and maximum values of xylanase and  $\beta$ -glucosidase during *P. echinulatum* cultivation using either Celufloc and DSB as carbon source [21]. Therefore the relation between protein secretion and growth profile of the microorganism is key for increase enzymes production. Thus the carbon source

used in the growth medium could be one of the major factors affecting enzyme/protein production on fermentation process. According to the results, when glycerol was used on pre-culture for *Trichoderma harzianum* growth, protein secretion was favored, indicating that this could be a potential alternative to increase fungal biomass and consequently for enzymes production on fermentation.

### **3.2. Effect of carbon source over *T. harzianum*'s morphology**

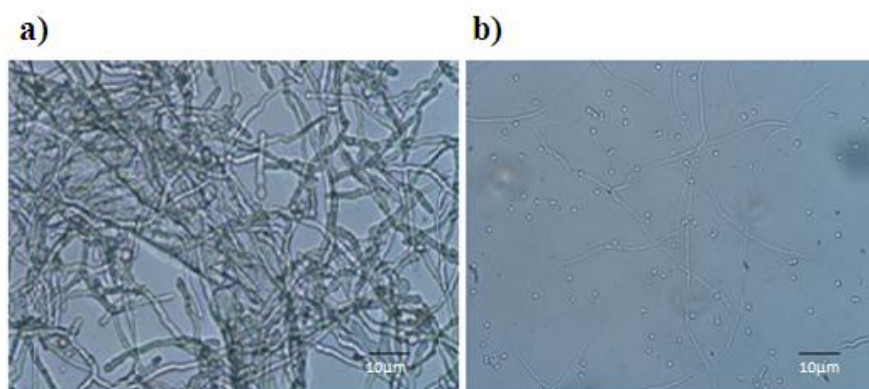
Filamentous fungi morphology plays an important role in enzymes and structural proteins being secreted. It has been reported that protein secretion in filamentous fungi mainly occurs at the tip of growing hyphae and those parameters that would increase the number of active tips would improve protein yield [22].

Fig. 2 shows the *T. harzianum*'s morphology when using 10g/L glycerol (A) and 10g/L glucose + 10 g/L Celufloc™ (1:1) (B) as the sole carbon source in the pre-culture step on minimal media. On glycerol medium resulted in a higher number of tips of the mycelia and long length hyphae, therefore higher protein secretion is expected from this type of morphology. Instead, the glucose and Celufloc™ medium resulted in a higher number of spores and a few hyphae tips of the mycelia as a consequence lower protein secretion was observed. This macroscopic morphology analysis correlates very well with the study obtained with effect of the carbon source used in the pre-culture step (Fig 1), which the glycerol was the best carbon source for protein secretion (676.70 g/L at 96 h). In the same figure is showed that the use of Celufloc™ to growth also results in a good protein secretion (577.39 g/L at 96 h), however the glucose addition on pre-culture stimulated the sporulation and produced of small amount of mycelium as a consequence protein secretion was inhibited.

Ahamed, Vermette [23] reported on how fungal morphology influences the volumetric cellulase productivity of *Trichoderma reesei* cultivated in media with lactose and lactobionic acid. Those authors associated the highest enzyme production with the numbers of tips per hypha. Similar results were obtained by Amanullah et al. [24] that correlated the hyphae tip activity with the specific amyloglucosidase productivity by *Aspergillus oryzae*.

Proteins are packaged within vesicles that are transported to the cell surface, where they fuse with the plasma membrane, liberating their contents to the periplasmic space; proteins may then remain within the periplasmic space, be retained at the mature cell wall, or pass through the cell wall into the medium [23]. With an increase in hyphae length, the number of vesicles produced is supposed to increase, explaining the relationship between hyphae growth rate and their length, whereas the excess vesicles are spent for the production of new branches, explaining the exponential increase of the number of tips at constant hyphae growth volume [22].

According to Wang et al. [25] several mathematical models describe fungi growth, and few simultaneously deal with the influence of morphology on product formation such as protein. In this study the microscopy showed that the growth in glycerol enlarged the cells size and proved to be interesting for increase the tips formation as a consequence protein secretion.



**Figure 2:** Effect of different carbon source on mycelial morphology. Mycelial morphology generated by growing *T. harzianum* in glycerol 10g/L (a) and 10g/L glucose + 10 g/L Celufloc™ (1:1) (b) at peak enzyme activity (72 h) on a rotary shaker (Temperature of 29°C, an agitation of 200 rpm and a culture pH of 5.0).

### 3.3. Cellulase induction strategies

Table 1 presents the maximum activity values of FPase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase achieved by *T. harzianum* using different cultivation strategies. According to the results presented in Table 1, it can be observed that the use of glycerol in the pre-culture step (Strategies 1 to 5) outperformed the control experiments using glucose (Control 1 and 2) in terms of all the enzymes activities measured, with values up to 2-folds higher.

When it was used 20g/L of glucose in the pre-culture step (Control\_2), the results were not different from the results obtained in Control\_1, using 10 g/L of glucose. Catabolite repression by glucose is one major mechanism to halt the synthesis of cellulase in filamentous fungi [26]. Ilmen et al. [12] show that glucose acts as a repressor of cellulase synthesis at the transcriptional level by *T. reesei* cultivations. On the other hand, it was found that glycerol is a ready available carbon source for growth of *T. reesei* being neutral in terms of cellulases biosynthesis, which does not promote and

does not inhibit it [12]. Therefore, strategies 1 to 5 performed with glycerol as carbon source in pre-culture step led to higher enzyme values probably because the unrepressed nature of this compound.

Increasing the glycerol concentration from 10 g/L (Strategy 1) to 20 g/L (Strategy 3) in the pre-culture step allowed greater enzymatic activity in comparison to the controls (Table 1). However, when compared to each other the FPase titer were not an exceptionally high,  $1.3 \pm 0.2$  FPU/mL (Strategy 1) and  $\sim 1.6 \pm 0.8$  FPU/mL (Strategy 3). For xylanase and  $\beta$ -glucosidase, an increase of glycerol concentration in the pre-culture step resulted in an increment in the xylanase and  $\beta$ -glucosidase titer ( $79.00 \pm 0.8$  IU/mL and  $7.13 \pm 0.4$  IU/mL respectively, in the Strategy 1 and  $103.00 \pm 0.1$  IU/mL and  $9.71 \pm 0.09$  IU/mL respectively in the Strategy 3). For applications such as in the sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis, the enzymatic cocktail from Strategy 3 would be more favorable as it has more xylanase and  $\beta$ -glucosidase.

When further additions of 10 g/L of DSB were done at 36 and 60 h using 10g/L and 20g/L of glycerol on pre-culture (Fed-batch strategy 2 and 4, respectively), the enzymes activities were increased. In the Strategy 5 using 20g/L of glycerol in pre-culture and batch induction with 30g/L of DSB the FPase and  $\beta$ -glucosidase activities improved with up to 2-fold increase ( $1.76 \pm 0.03$  FPU/mL and  $16.5 \pm 0.3$  IU/ mL, respectively) and although it was used a rotary shaker for the cultivations, the high cellulose concentration (30g/L) maybe is possible the adequate oxygen and mass transfer and then favorable to the growth and activity maintenance of cells.

Delabona Pda et al. [19] demonstrated that the FPase activity improved up to 3-fold by increasing from 2 to 3% the DSB concentration during *T. harzianum* P49P11

submerged cultivation using stirred tank bioreactor. Reis et al. (2013) studied the growth of *Penicillium echinulatum* and found higher  $\beta$ -glucosidase when a high cellulose concentration was employed (5.8 IU/mL at 168 h of cultivation using 60 g/L of cellulose). Maeda et al. [27] used different feeding strategies for enhance cellulase production using *T. reesei* RUT C30 and the cellulase activity was the highest (19.07 FPU/ml), using strategy with 50 g/L of initial cellulose concentration and feeding with a interval of 6 h (27.13 g for the first time with a progressive decreasing amount of 5 g).

**Table 2:** Peak of FPase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase activity using different batch cultures strategy by glycerol and control experiment (glucose) on a rotary *shaker* at 200 rpm, at 29 °C for a total period of 120 h.

Strategy	Pre-culture		Induction	Peack of activities		
	Carbon source		Carbon source	FPase (FPU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -glucosidase (IU/mL)
Control_1	1%	Glucose	1% DSB in Batch	0.75 $\pm$ 0.04	67.00 $\pm$ 0.6	6.84 $\pm$ 0.3
Control_2	2%	Glucose	1% DSB in Batch	0.8 $\pm$ 0.09	72.00 $\pm$ 0.4	6.93 $\pm$ 0.7
1	1%	Glycerol	1% DSB in Batch	1.3 $\pm$ 0.02	79.00 $\pm$ 0.8	7.13 $\pm$ 0.4
2 <sup>1</sup>	1%	Glycerol	3% DSB in Fed-batch	1.42 $\pm$ 0.07	88.00 $\pm$ 0.8	8.17 $\pm$ 0.08
3	2%	Glycerol	1% DSB in Batch	1.56 $\pm$ 0.08	103.00 $\pm$ 0.1	9.71 $\pm$ 0.09
4 <sup>2</sup>	1%	Glycerol	3% DSB in Fed-batch	1.6 $\pm$ 0.01	106.00 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 0.2
5	2%	Glycerol	3% DSB in Batch	1.76 $\pm$ 0.03	115.00 $\pm$ 0.2	16.5 $\pm$ 0.3

\* In the strategy 2 was used 10 g/L initial DSB concentration followed by two further DSB additions at 36 and 60 h of fermentation to give a total of 30 g/L

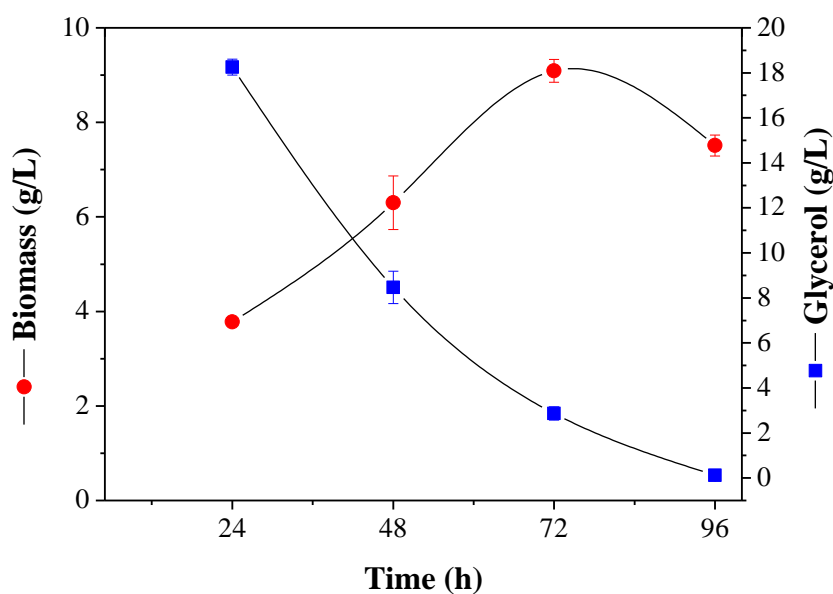
\*\* In the strategy 4 was used 20 g/L initial DSB concentration followed by two further DSB additions at 36 and 60 h of fermentation to give a total of 30 g/L

To address further the studies using the best strategy (Strategy 5: 20g/L of glycerol in pre-culture and batch induction with 30g/L of DSB) obtained in rotary shaker it was evaluated in large scale using bioreactor in order to validated the previous results and aimed at pilot scale.



### 3.4. Stirred tank bioreactor cultivations using high-cell density

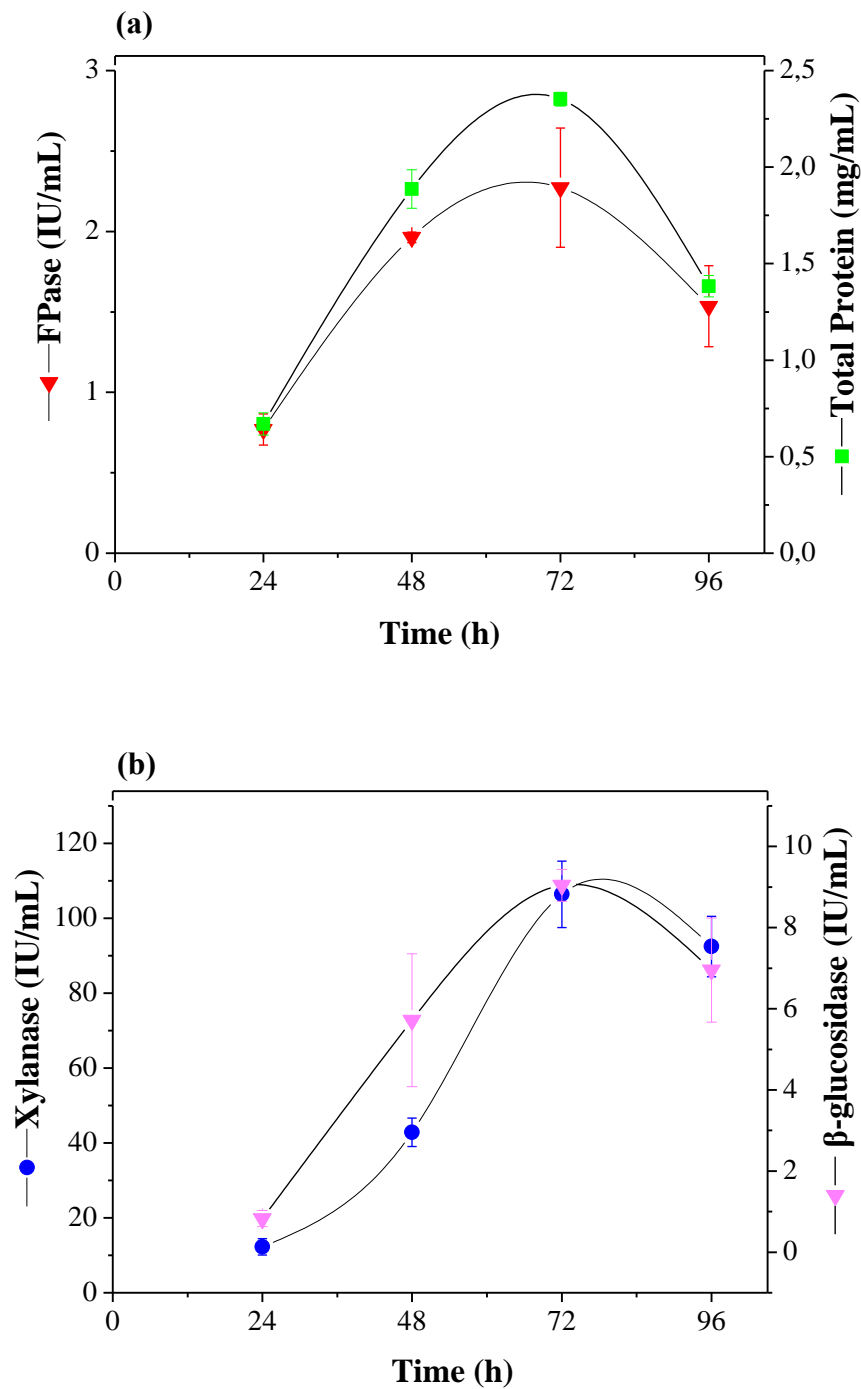
The selected conditions for the pre-culture step were used initially to identify the time required to consume total glycerol and the peak biomass concentration for inoculation of the bioreactor (Fig. 3).



**Figure 3:** Time course of glycerol and biomass concentration on *Trichoderma harzianum* pre-culture in shake flask, initial glycerol concentration was 20 g/L.

In these experiments initial glycerol concentration of 20 g/L was used and after 72 h glycerol concentration was almost exhausted (2.86 g/L). A maximum biomass concentration of 9.09 g/L was achieved at 72 h. In order to have a high cell concentration in the induction step, three shake flask of the pre-cultures using the above procedure were mixed after 72 h, resulting in a *T. harzianum* total cell mass of 5.46 g (dry basis). This biomass was transferred to a bioreactor containing 30.0 g/L of DSB (Batch culture) resulting in an initial biomass concentration of approximately 4.5 g/L.

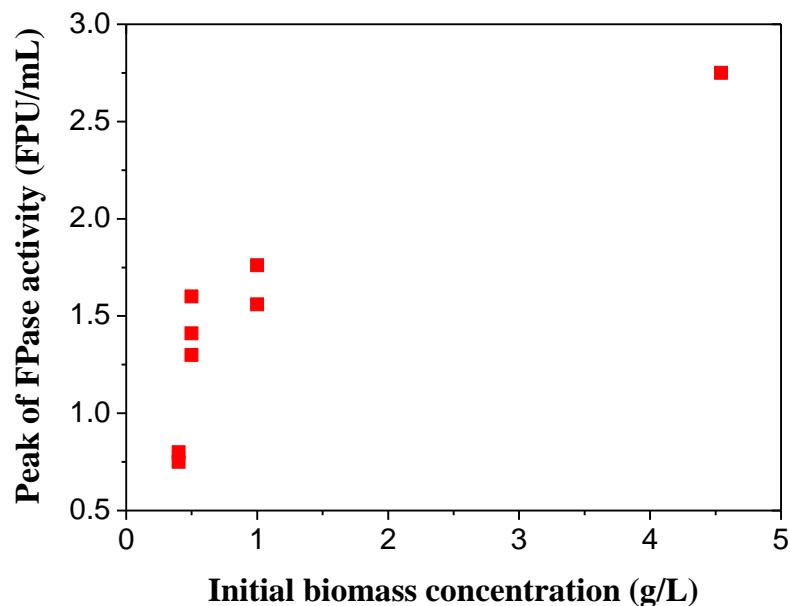
Glucosylase production time course during cultivation of *Trichoderma harzianum* in a stirred tank bioreactor using DSB for cellulase induction in terms of FPase activity and protein concentration, xylanase and  $\beta$ -glucosidase are shown, respectively, in Figures 4a and 4b.



**Figure 4:** FPase and Total Protein (a) and xylanase and  $\beta$ -glucosidase (b) activities during cultivation of *Trichoderma harzianum* in a stirred tank bioreactor using 5.47g of biomass and 30 g/L of inoculum media. The results are presented as averages and standard deviations (error bars) for cultivations carried out in duplicate.

Experiments revealed that use of glycerol as carbon source for growth and biomass initial concentration of *c.a* 4.5 g/L followed by induction with DSB resulted in the highest production of FPase ( $2.27 \pm 0.37$  FPU/mL). Figure 5 summarizes the results of the relationship between maximum FPase values and the amount of the initial fungal biomass inoculated in the cultivations carried out under all different strategies using either shake flasks or the bioreactor.

This is clearly demonstrated that the increment in initial biomass concentration lead to increasing values of FPase activity (Fig. 5).



**Figure 5:** Peak of FPase activity using *T. harzianum* P49P11 cultivation followed by cellulose induction with increasing initial biomass concentration using different strategies (see text for explanation).

Also other glucohydrolases activities were benefited with high-cell density protocol. Bioreactor cultivations attained peak enzyme activity of xylanase ( $106.40 \pm 8.87$  IU/mL) and  $\beta$ -glucosidase was ( $9.04 \pm 0.39$  FPU/mL) (Fig. 4 a and b). For control experiments using 20g/L of glucose and 20 g/L of Celufloc<sup>TM</sup> 200 instead glycerol as carbon source on pre-culture step it was obtained  $0.77 \pm 0.02$  FPU/mL and  $0.89 \pm 0.01$  mg/ mL of total protein. For other activities the results were also lower ( $78.77 \pm 5.35$  IU/mL of xylanase and  $8.04 \pm 1.01$  IU/mL of  $\beta$ -glucosidase).

High cell density culture system makes it possible to achieve high productivity of various metabolites. Maeda et al. [27] evaluated profile of cellulase production with different inoculums concentrations by *Penicillium funiculosum* using glucose and sugar

cane bagasse. The use of a higher pre-inoculum concentration resulted in increased enzyme titer and volumetric productivity, the percentage increases were 88.0 %, 84.0 % and 42.0 % for FPase, Avicelase and CMCase activities, respectively.

In short we seek a method for cellulases production that is possible more productivity offering an alternative option for on-site production of enzymes. According to Himmel et al. [29] and Pradella et al. [30] the cellulases production for the industrial process using cellulose as carbon source it should be 75 FPU/L h of productivity. In this study calculated FPase rate production was about 37.5 FPU/L h using glycerol on pre-culture followed by induction with pre-treated sugarcane (DSB).

This is almost the double attained earlier for *T. harzianum* P49P121 (16.8 FPU/L h) in batch reactor using DSB+sucrose culture media [13] and about 1.5 times higher than mutant *P. echinulatum* cultivated in fed-batch bioreactor using DSB as carbon source, 24.3 FPU/L h [21]. Bigelow, Wyman [31] reported 3.1 FPU/L h by *T. reesei* RUT-C30 grown on bagasse pretreated with hot water. Kovács et al. [32] described the production of cellulase by a mutant strain of *T. atroviride*, using willow pretreated as the carbon source in submerged fermentation performed in bioreactor, and achieved calculated values of 9.2 FPU/L h. Benoliel et al. [33] reported 15.4 FPU/L h by *T. harzianum* L04 strain using sugarcane bagasse in natura. Thus, compared to the values reported in the literature, the present results obtained for *T. harzianum* P49P11 grown on a glycerol followed by induction with pretreated sugarcane, the cellulase production are therefore very high in terms of cellulase productivity.

Glycerol is reported to be a neutral carbon source in *T. reesei* [12] and present data seems to point in this direction also for *T. harzianum*. High cell concentration used to cellulase production achieved higher enzyme title and rate of biosynthesis., this might

be happen due to a low glucose availability for cell population causing alleviation of catabolite repression and hence a high cellulase biosynthesis. This promise strategy enables us to propose a two-phase process cellulase production: the first phase is devoted to produce biomass at high-cell-density with a ready available carbon source with low catabolite repression impact followed by a second phase with an inductor.

#### **4. Conclusions**

These results demonstrate the importance of glycerol can be added to cultivation media for the production of biomass-degrading enzymes offering an alternative option for on-site enzymes production. This *Trichoderma* strain showed an interesting ability of producing cellulase when grown on glycerol followed induction by pretreated sugarcane, suggesting higher number of active tips of the mycelia and long length hyphae, therefore higher protein secretion capacity. This proposed strategy for cellulase production using glycerol for *Trichoderma harzianum* high cell density growth followed by induction with pretreated sugarcane bagasse appeared to be an interesting alternative to increase cellulases production and added value products using this by product of the biodiesel industry.

#### **Acknowledgements**

The authors would like to thank the technical staff of the National Laboratory of Science and Technology of Bioethanol (CTBE) and acknowledge the financial support from CNPq and Fapesp (all from Brazil).

## References

1. Tang, S., Boehme, L., Lam, H., Zhang, Z.: *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. *Biochemical Engineering Journal* **43**(2), 157-162 (2009).
2. Da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J.: Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances* **27**(1), 30-39 (2009).
3. Fan, X., Burton, R., Zhou, Y.: Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals—mini review. *Open Fuels Energy Sci J* **3**, 17-22 (2010).
4. Sarma, S.J., Brar, S.K., Sydney, E.B., Le Bihan, Y., Buelna, G., Soccol, C.R.: Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *international journal of hydrogen energy* **37**(8), 6473-6490 (2012).
5. Wu, H., Karanjikar, M., San, K.-Y.: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient free fatty acid production from glycerol. *Metabolic engineering* **25**, 82-91 (2014).
6. Li, C., Lesnik, K.L., Liu, H.: Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies* **6**(9), 4739-4768 (2013).
7. Chen, Y.-H., Walker, T.H.: Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnology letters* **33**(10), 1973-1983 (2011).
8. Yang, F., Hanna, M.A., Sun, R.: Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels* **5**(13), 1-10 (2012).
9. Naranjo, J.M., Posada, J.A., Higuera, J.C., Cardona, C.A.: Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource technology* **133**, 38-44 (2013).
10. Zhang, Y.-H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R.: Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances* **24**(5), 452-481 (2006).
11. Portnoy, T., Margeot, A., Linke, R., Atanasova, L., Fekete, E., Sándor, E., Hartl, L., Karaffa, L., Druzhinina, I.S., Seiboth, B.: The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC genomics* **12**(1), 269 (2011).
12. Ilmen, M., Saloheimo, A., Onnela, M.-L., Penttilä, M.E.: Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(4), 1298-1306 (1997).
13. Delabona Pda, S., Farinas, C.S., da Silva, M.R., Azzoni, S.F., Pradella, J.G.: Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource technology* **107**, 517-521 (2012). doi:10.1016/j.biortech.2011.12.048
14. Delabona, P.d.S., Pirola, R.D.P.B., Codima, C.A., Tremacoldi, C.R., Rodrigues, A., Farinas, C.S.: Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy* **37**(0), 243-250 (2012).
15. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D.: Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (2006).
16. Mandels M., J., W.: Production of cellulases. *Advances in Chemistry Series* **95**, 391- 414 (1969).

17. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**(1), 248-254 (1976).
18. Ghose, T.: Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry* **59**(2), 257-268 (1987).
19. Delabona Pda, S., Farinas, C.S., Lima, D.J., Pradella, J.G.: Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation. *Bioresource technology* **132**, 401-405 (2013). doi:10.1016/j.biortech.2012.11.087
20. Michelin, M., Polizeli Mde, L., Ruzene, D.S., Silva, D.P., Ruiz, H.A., Vicente, A.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Teixeira, J.A.: Production of xylanase and beta-xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. *Bioprocess Biosyst Eng* **35**(7), 1185-1192 (2012). doi:10.1007/s00449-012-0705-5
21. Pereira, B.M.P., Alvarez, T.M., da Silva Delabona, P., Dillon, A.J.P., Squina, F.M., da Cruz Pradella, J.G.: Cellulase On-Site Production from Sugar Cane Bagasse Using *Penicillium echinulatum*. *BioEnergy Research* **6**(3), 1052-1062 (2013).
22. Peberdy, J.F.: Protein secretion in filamentous fungi—trying to understand a highly productive black box. *Trends in biotechnology* **12**(2), 50-57 (1994).
23. Ahamed, A., Vermette, P.: Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource technology* **100**(23), 5979-5987 (2009).
24. Amanullah, A., Christensen, L., Hansen, K., Nienow, A., Thomas, C.: Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. *Biotechnology and bioengineering* **77**(7), 815-826 (2002).
25. Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M.: Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol Adv* **23**(2), 115-129 (2005). doi:10.1016/j.biotechadv.2004.11.001
26. Amore, A., Giacobbe, S., Faraco, V.: Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current genomics* **14**(4), 230-249 (2013).
27. Maeda, R.N., Barcelos, C.A., Santa Anna, L.M.M., Pereira, N.: Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of biotechnology* **163**(1), 38-44 (2013).
28. Oddou, J., Stentelaire, C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Ceccaldi, B.C.: Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**(1), 1-6 (1999).
29. Himmel, M.E., Ruth, M.F., Wyman, C.E.: Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Current Opinion in Biotechnology* **10**(4), 358-364 (1999).
30. Pradella, J.G.C., Rossell, C.E.V., Scandiffio, M.I.G., Cunha, M.P., Pinho, M.G.O., Bonomi, A.: Estudo preliminar do custo de produção in house de celulasas na biorrefinaria de etanol de segunda geração. *Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos* (2009).
31. Bigelow, M., Wyman, C.E.: Cellulase production on bagasse pretreated with hot water. *Applied biochemistry and biotechnology* **98**(1-9), 921-934 (2002).



32. Kovács, K., Szakacs, G., Zacchi, G.: Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresource technology* **100**(3), 1350-1357 (2009).
33. Benoliel, B., Torres, F.A.G., de Moraes, L.M.P.: A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. *SpringerPlus* **2**(1), 656 (2013).

## Capítulo VI

### “Melhoramento genético do fungo *Trichoderma harzianum* P49P11 utilizando ferramentas de biologia molecular”

#### **Artigo em fase de preparação**

Para a redução dos custos das enzimas celulolíticas, técnicas que envolvam a otimização dos processos de produção, e também técnicas de melhoramento genético são de fundamental importância. Este projeto pretendeu unificar o potencial científico do grupo de pesquisa do Brasil (EMBRAPA/CTBE) referência no melhoramento de bioprocessos e o grupo de pesquisa da Áustria (Vienna University of Technology) referência nas investigações de melhoramento molecular, para aumentar a produção de enzimas degradantes da biomassa vegetal da linhagem selvagem de *T. harzianum* P49P11. Os resultados obtidos neste trabalho referem – se ao objetivo 8, 9, 10 e 11 do item 1.2.1.

## 1. Introdução

As celulasas pertencem a um grupo de enzimas chamadas indutivas, cuja síntese é bastante aumentada quando o substrato da enzima está presente no meio de cultura. No caso das celulasas, entende-se perfeitamente a necessidade da célula em manter certo nível de síntese, pois um polímero de alta massa molecular como a celulose não consegue passar através da membrana celular, mas uma vez hidrolisado parcialmente a compostos de menor massa molecular, esta passagem se torna possível, ocorrendo então o efeito indutivo (Kubicek, 2012).

Independente da natureza do indutor de celulasas é consenso que a formação de celulasas é regulada no nível transcricional e acontece de forma coordenada. As celulasas são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose. Atualmente, sabe-se que, em *Trichoderma reesei*, o processo de indução tem início devido à existência de celulasas basais que são secretadas em baixas quantidades e localizam-se nas paredes de conídios e hifas. A ação destas enzimas na celulose insolúvel permite a liberação de celobiose e pequenos oligossacarídeos, que podem penetrar na célula e desencadear o processo de indução (Kubicek, 2012).

A análise de promotores dos genes de celulasas (principalmente *cbh1* e *cbh2*) mostrou que a expressão destes genes está sujeita a regulação tanto positiva quanto negativa (Kubcek et al., 2009). XYR1 é considerado o principal ativador de expressão dos genes da celulase e hemicelulase, uma vez que a supressão desse fator elimina a indução de celulase por todos os outros indutores, prejudicando também a indução de genes de hemicelulasas envolvidas na degradação de xilanas e arabinanas (Akel et al., 2009). Já a proteína nuclear LaeA é considerada um regulador mestre do metabolismo secundário em *Aspergilli*. Bok e Keller (2004) sugerem que a manipulação de LaeA em fungos filamentosos pode permitir o aumento da produção de produtos farmacêuticos ou a eliminação de toxinas fúngicas, fornecendo melhores linhagens e podem também contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares pelo qual são produzidos metabólitos secundários. Mutantes com deleção em LaeA de *Aspergillus fumigatus* resultou na diminuição da aspergilose em modelos murinos (Sugui et al., 2007). Em *Aspergillus fumigatus* LaeA controla a transcrição de mais de 10% dos genes, e a maior parte desses fazem parte do cluster de metabólitos secundários sendo que 7 desses

cluster são sub-telôméricos em região com alto grau de heterocromatina (Fox e Howlett, 2008).

Seiboth et al. (2012) estudando a expressão de *lae1* (Ortólogo de LaeA) em *Trichoderma reesei* observou que a proteína LAE1 controla a expressão de celulases. Seiboth et al. (2012) reportaram a obtenção de um mutante de *T. reesei* com deleção em *lae1* e observaram a completa perda da expressão de celulases, enzimas acessórias de degradação da celulose,  $\beta$ -glicosidasases e xilanases. E, de forma inversa, o aumento da expressão de *lae1* resultou em um aumento na produção de celulases.

Embora o papel exato do LaeA permaneça enigmático, sugere-se que pode controlar a acessibilidade dos fatores de ligação às regiões de heterocromatina e essas modificações podem ter efeitos profundos na transcrição de genes em diferentes organismos.

Outros fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes de celulases em *T. reesei* foram identificados por Zeilinger et al. (1998) avaliando extratos celulares de micélios, em condição de indução ou sem a presença de indutor. Os pesquisadores detectaram uma sequência de nucleotídeo 5' -ATTGGTAATA- 3' denominada de elemento de ativação de *cbh2* CAE. Versões mutantes em regiões específicas de CAE também demonstraram diminuição na expressão de proteína.

Outro aspecto bastante interessante que regula a expressão de genes de celulases é a repressão catabólica. A repressão catabólica é uma forma ubíqua de regulação que leva a diminuição da expressão de genes que codificam enzimas que estão envolvidas na utilização de fontes de carbono complexas quando os açúcares simples como a glicose estão disponíveis. O fator de transcrição CRE1 é o principal, atuando na repressão catabólica dos genes que codificam as enzimas celulolíticas quando em presença de glicose (Ilmén et al., 1997). O regulador XYR1 e regiões promotoras de *cbh1*, *cbh2*, *eg1* e *eg2* possuem sítios de ligação com a região dedo de zinco (estrutura tridimensional em forma de dedo apresentando sequência ordenada de resíduos de cisteína e histidina) de CRE1 indicando que a repressão catabólica pode ocorrer em duas vias, tanto pela inibição do principal ativador de celulases como pelas enzimas por ele induzidas.

Em levedura o produto do gene *snf1* (*sucrose non fermentation gene*) fosforila a proteína Mig1 aliviando assim o fungo de repressão catabólica. SNF1 é uma proteína

quinase que fosforila resíduos de serina e treonina e está envolvida na desrepressão de uma série de genes reprimidos por glicose. Cziferszky et al. 2002 avaliou se a proteína correspondente Cre1 em fungos filamentosos também é fosforilada por Snf1, ortólogo de SNF1. Os autores mostraram que CRE1 é uma fosfoproteína que possui um motivo de fosforilação Ser241, contendo uma região ácida como alvo de fosforilação. Portanto, quando CRE1 é fosforilada a sua ação de repressão é suprimida. O mecanismo é complexo, mas resumidamente ocorre a fosforilação do domínio F-box que ubiquitina Cre1 para ser degradado. No entanto o produto do gene *creB* em presença de glicose é ativada e faz a deubiquitinação. É importante ressaltar que a linhagem de *T. reesei* mais comumente utilizada como hiperprodutora de celulases Rut C30 (Montenecourt e Eveleigh, 1979) possui o gene *cre1* mutado com apenas 20% da região codante, formando uma proteína defeituosa, com a falta da região C-terminal. Seidl et al. (2008) reportaram que o Rut C30 perdeu cerca de 85 kb de fragmento genômico durante o processo de metagênese o que resultou na perda de 29 genes, dentre os quais alguns relacionados ao transporte de proteínas e metabolismo primário.

O Grupo de Biologia Molecular da Universidade de Vienna é fortemente reconhecido pela comunidade acadêmica pelas contribuições sobre a identificação e regulação de novas vias catabólicas e os processos regulatórios que regem a expressão de enzimas envolvidas na degradação de carboidratos, especialmente as enzimas dos fungos do gênero *Trichoderma*. Portanto, o objetivo geral do doutorado sanduíche foi empregar técnicas de genética molecular que foram realizadas com sucesso em diversos trabalhos do grupo com o intuito de estabelecer um protocolo para o aumento da produção de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular vegetal em *Trichoderma harzianum*.

## 2. Objetivo

Aumentar a produção de celulases com a superexpressão dos indutores *xyr1* e *lae1* de *Trichoderma harzianum* P49P11. Para alcançar esse objetivo as seguintes etapas foram conduzidas:

- Avaliação dos meios seletivos
- Readaptação dos protocolos de transformação para o fungo *T. harzianum*
- Construção dos vetores
- Superexpressão dos genes ativadores *xyr1* e *lae1*;
- Avaliação dos clones positivos em fermentação submersa usando frascos agitados

## 3. Estratégia metodológica

### 3.1. Origem e manutenção do fungo

A linhagem de *T. harzianum* P49P11 isolada na Floresta Amazônica por Delabona et al. (2012b) foi mantida em meio mínimo PDA com repiques periódicos.

### 3.2. Identificação dos genes *lae1* e *xyr1*

O gene ortólogo do fungo *T. harzianum lae1*, localizado na região 6:1675320-1676316, e o gene ortólogo *xyr1*, localizado na região 1:3812710-3815642 (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>), foram amplificados pela técnica de PCR para superexpressão em *T. harzianum*.

### 3.2.1. Digestão dos produtos de PCR com Enzimas de Restrição

Para a digestão de 0,1 – 1 µg de DNA foram utilizados de uma a cinco unidades de XhoI (Invitrogen, Life Technology) para digestão de *lae1* e XbaI (Invitrogen, Life Technology) para digestão de *xyr1* num volume de 20 µL nas condições especificadas pelo fabricante.

## 3.3. Construção dos vetores

### 3.3.1. Seleção do marcador molecular

Escolheu-se os genes de resistência ao antibiótico geneticina (Life Technology) e higromicina B (Life Technology) para compor os marcadores de seleção de *xyr1* e *lae1*, respectivamente, nas concentrações de 20, 50, 100, 200 e 500 µg/mL.

### 3.3.2. Cassetes

Para a clonagem de *lae1* e *xyr* utilizou-se a metodologia de *In-fusion cloning com cloning enhancer treatment*, por remover resíduos do produto de PCR e evitar perdas com etapas de purificação. Após a amplificação e purificação do fragmento correspondente aos genes descritos em 4.2, foi realizada a clonagem. Para a superexpressão constitutiva do gene *lae1*, foi utilizado o vetor pLHhtef1, resistente à higromicina B e que possui a região promotora de *tef 1*, como mostra a Figura 13a. Para clonagem do gene *xyr1* foi utilizado um vetor contendo aminoglicoside 3'fosfotransferase resistente a geneticina, tendo a região promotora *pkil* de *Trichoderma reesei* para a superexpressão constitutiva, como mostra a Figura 13b.

a)



b)

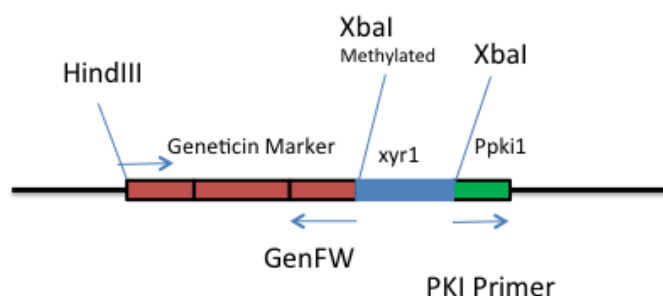


Figura 13: a) vetor pLHhtef1, resistente à higromicina B e que possui a região promotora de *tef1*; b) vetor contendo aminoglicoside 3'fosfotransferase, resistente à geneticina e que possui a região promotora de *pki1* de *T. reesei* para transformação de *T. harzianum*.

### 3.4. Obtenção de células competentes

Células de *Escherichia coli* JM109 (Promega) foram estriadas em placas de meio LB e incubadas a 37 °C por 12 horas. Aproximadamente de 10-12 colônias foram inoculadas em 250 mL de meio SOB em frasco de 2 L e mantidas a 18 °C com agitação (200-250 rpm) até atingir uma  $A_{600nm}$  de 0,6-0,9. Em seguida, a cultura foi mantida em gelo por 10 minutos e centrifugada a 2500xg por 10 minutos a 4 °C. Ressuspendeu-se o pellet em 80 mL de TB (10 mM Pipes, 15 mM  $CaCl_2$ , 250 mM de KCl, pH 6,7, esterilizado por filtração) previamente gelado e manteve-se no gelo por 10 minutos. Centrifugou-se novamente a 2500xg por 10 minutos a 4 °C. Ressuspendeu-se em 20 mL de TB e adicionou-se 1,4 mL de DMSO, agitou-se gentilmente e este foi mantido em



gelo por 10 minutos. Aliquotou-se as células para tubos eppendorf e as mesmas foram mantidas à -80 °C.

### 3.5. Transformação em *E. coli*

Uma alíquota de 200 µL de células competentes *E. coli* JM109 foi descongelada e recebeu a adição de 50 a 100 ng de DNA transformante. Esta mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e posteriormente aquecida a 42° C por 40 segundos. As células foram imediatamente incubadas em gelo por 2 minutos e 1 mL de meio SOB foi adicionado às células transformadas, que foram incubadas por 1 hora a 37°C. Alíquotas da transformação foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina, por 18 horas a 37° C. As colônias ampicilina resistentes (amp<sup>+</sup>) foram submetidas a PCR de colônia para confirmar a presença dos genes clonados. As amplificações por PCR foram realizadas utilizando-se:

- 38 µl de água destilada
- 5 µl de tampão para PCR10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 9.0), Triton X 100 1%) - 3 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 1 µl dNTPs 10 mM
- 1 µl forward primer 10 pmol/µL
- 1 µl reverse primer 10 pmol/µL
- 0,2-1 µl *Phusion* polymerase

Para cada tubo contendo os componentes descritos, adicionou-se uma colônia de *E. coli*amp<sup>+</sup> como molde. O ciclo utilizado foi:

Temperatura (°C)	Tempo	
95	5 min	} 30 ciclos
95	45 s	
55	30 s	
72	2 min	
72	5 min	

### **3.5.1. Miniprep e purificação do DNA plasmidial**

Dez mililitros de cultura de *E. coli* com o plasmídeo de interesse foram crescidos durante 16 horas em meio LB com 100 µg/mL de ampicilina. A purificação de plasmídeos em *E. coli* foi realizada com o kit Wizard®Plus Minipreps DNA Purification Systems da Promega, seguindo as orientações do fabricante.

## **3.6. Transformação em *T. harzianum***

### **3.6.1. Obtenção de protoplastos**

A linhagem de *T. harzianum* foi inoculada em meio PDA, sendo, então, incubadas a 29°C durante 7 dias. Foi feita uma suspensão de esporos usando solução fisiológica (0,9% NaCl +0,05% Tween 80) e foi inoculado 50 µL em meio PDA, contendo papel celofane na superfície, sendo, então, incubadas a 29°C durante 18 horas. Os papéis foram colocados em placa de Petri estéril contendo solução de lise (40 mL de tampão fosfato 10 mmol/L + 0.3g da enzima de *T. harzianum*, Sigma L-1412), foi feito um sanduíche com papel celofane +solução de lise, até 5 folhas por placa de Petri. As placas de Petri foram incubadas em *shaker* a 90 rpm de agitação por 2 horas. Após 2 horas o celofane foi retirado com uma pinça estéril e a solução foi filtrada usando lã de vidro acoplada em um tubo falcon de 50 mL. A solução foi centrifugada por 10 min a 2000 g e 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o pellet foi lavado no mínimo 2 vezes com 50 mL de STC (Sorbitol 1,2 M, CaCl 10 mM, TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5). Após a última centrifugação ressuspendeu-se o precipitado em 1 mL de STC.

### **3.6.2. Transformação**

Adicionou-se o DNA plasmidial (1 µg/mL) em um tubo falcon e em seguida, acrescentou-se 200 µL de protoplastos e 50 µL de solução de PEG 60% (6 g de PEG

4000 em 5 mL de STC) e incubou-se em gelo por 20 min. Após adicionou-se 2 mL de solução PEG 60% e incubou-se à temperatura ambiente por 10-15 minutos. Adicionou-se 4 mL da solução STC e agitou-se cuidadosamente e extensivamente para uma perfeita mistura dos protoplastos com a solução de PEG. Adicionou-se 1 mL desse mix de protoplasto a 5 mL de meio MEX com a seleção dos transformantes (adição de geneticina e higrominina B). Incubou-se a 20° C até crescimento.

### 3.7. Fermentação submersa para seleção dos melhores clones

Para selecionar os melhores clones com superexpressão de *xyl1* e *lae1* foram realizadas micro fermentações submersa em frascos agitados de todos os transformantes.

Os clones de *xyl1* e *lae1* foram inoculados em meio PDA e mantidos em estufa a 29°C por 7 dias. Foi realizada suspensão de esporos com uma solução salina 0,9% para contagem dos esporos em câmara de Neubauer para concentração. Uma concentração de  $10^7$  esporos/mL foi transferida para o meio de inóculo contendo 1% de bagaço de cana explodido e deslignificado (BED) para as fermentações com os transformantes em *xyl1* e 1% de Celufloc<sup>®</sup> para as fermentações com os transformantes em *lae1*, ambas em solução de sais de Mandels (Mandels e Sternberg, 1976), em Erlenmayer de 50mL com um volume de trabalho de 20mL. Para mitigar o efeito do pH durante o período de incubação dos diferentes clones foi utilizado tampão fitalato de potássio em pH 5.0. Os frascos foram incubados em *shaker*, a 29° C e 200 rpm por 96 horas de incubação. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de 2 mL em microtubo *ependorf* para dosagem das atividades enzimáticas de FPase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase e CMCase (item 3.8). Escolhidos os melhores clones foi avaliada fermentação submersa em frascos Erlenmayer de 500 mL com 200 mL de meio. Nesta fermentação foi realizada uma etapa de pré-inóculo onde  $10^7$  esporos/mL foram transferidos para um frasco de 200 mL contendo 1% de Celufloc<sup>®</sup> e 1% de glicose em meio de Mandels em tampão fitalato de potássio. Após 48 horas um volume de 20 mL do pré-inóculo foi transferido para o meio de inóculo conforme descrito acima. Alíquotas de 4 mL foram retiradas a cada 24 horas num total de 96 horas de incubação.

### 3.8. Metodologia Analítica

#### 3.8.1. Atividade de FPase

A atividade enzimática de FPase foi dosada pelo método da atividade de papel de filtro (filter paper activity – FPA) descrito por Ghose (1987), modificado de forma a reduzir a escala de reação para 100  $\mu$ L, visando redução do uso de reagente e otimização de tempo.

Para atividade de FPase em placa de 96 poços de fundo cônico, um disco de papel filtro Whatman N° 1 foi adicionado em cada pocinho da placa e em seguida 80 $\mu$ l de tampão citrato de sódio (pH 4,8) 0,05 M foi adicionado juntamente com 20  $\mu$ l do sobrenadante da cultura com uma diluição adequada. A reação foi incubada no termociclador a 50 °C por 1 hora. Após 1 hora a reação foi cessada pela adição de 100  $\mu$ l de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1956) e incubada novamente no termociclador por 5 minutos a 99 °C. Após esfriamento, foi transferido 100  $\mu$ l para placa de Elisa 96 poços onde a leitura da absorbância em 540 nm foi realizada usando Leitora de Placa Espectra Max 384 (Molecular Device). Para atividade de FPase empregando tubo de ensaio, três discos de papel filtro Whatman N° 1 (5 mg) foram adicionados em cada tubo e em seguida 100 $\mu$ l de tampão citrato de sódio (pH 4,8) 0,05 M foi adicionado juntamente com 50  $\mu$ l do sobrenadante da cultura com uma diluição adequada. A reação foi incubada a 50 °C por 1 hora em banho termostático. Após 1 hora a reação foi cessada pela adição de 300  $\mu$ l de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) e mantidas em banho de ebulição a 99 °C por 5 minutos. Após esfriamento, 2 ml de água destilada foram adicionados aos tubos, e a absorbância lida em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. O açúcar redutor foi medido pelo método de Miller (1959), empregando glicose como padrão.

Para ambos procedimentos uma unidade (FPU) de FPase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

### ***3.8.2. Atividade de Xilanase e CMCase***

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços de fundo cônico como descrito: 10 µl do sobrenadante da cultura com uma diluição adequada foi adicionado a 40 µl de tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e 50 µl do substrato 0,05%. Para atividade de xilanase o substrato usado foi xilana de beechwood e para a atividade de CMCase foi usada carboxi-metil-celulose (CMC) A mistura foi incubada em Termociclador a 50°C por 10 minutos para atividade de xilanase e 30 minutos para atividade de CMCase. O açúcar redutor foi medido pelo método do DNS (Miller, 1959), pela adição de 100 µL de reagente e incubada novamente em Termociclador a 99°C por 5 minutos com imediato resfriamento. Após resfriamento, foi transferido 100 µl para placa de Elisa 96 poços onde a leitura da absorbância em 540 nm foi realizada usando Leitora de Placa Espectra Max 384 (Molecular Device). Uma unidade (U) de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose por minuto, nas condições de ensaio. E uma unidade (U) de CMCase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

### ***3.8.3. Atividade de β-glicosidase***

A atividade da enzima β-glicosidase foi dosada empregando como substrato p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (Sigma-Aldrich, MO) na concentração de 5 mM dissolvido em tampão citrato citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8). O ensaio foi composto de 80 µL de substrato e 20 µL de enzima do sobrenadante da cultura em uma diluição adequada. A reação foi montada em microplacas de atividade e incubados por 10 min a 50 °C em termociclador. A reação foi parada com adição de 100 µL de 1M Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 100 µL da reação foi transferido para microplacas de leitura e a absorbância foi determinada a 400 nm. Uma unidade (U) de β-glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições de ensaio.

### **3.8.4. Proteínas Totais**

A concentração de proteínas totais foi determinada empregando o método recomendado para o reagente preparado da Bio-Rad (Protein Assay Reagent Concentrate) para placas de 96 poços. O método é baseado no método de Bradford (1976), mas emprega o reagente concentrado, e a leitura da cor formada após a reação é realizada em leitora de placas a 595 nm. Albumina de soro bovina foi utilizada como padrão.

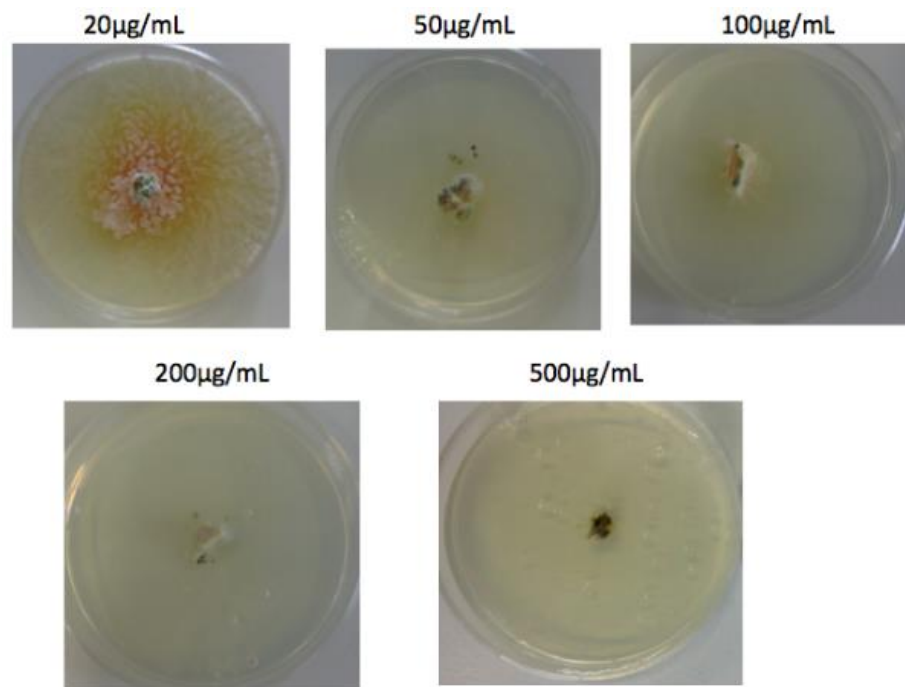
## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Seleção do marcador molecular**

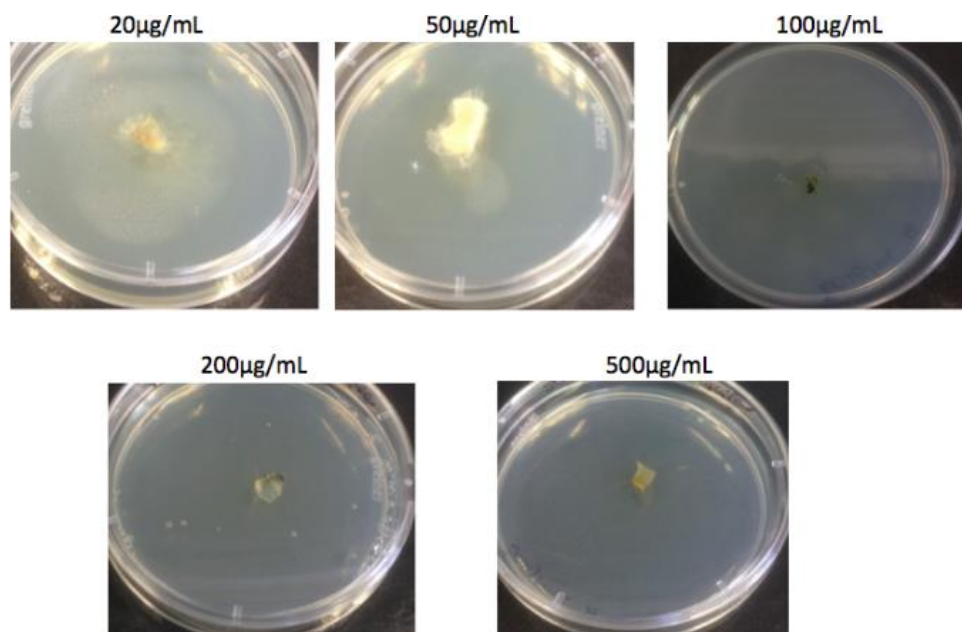
Os sistemas de transformação compreendem a existência de vetores contendo marcas de seleção e de mecanismos que possibilitam sua introdução em células receptoras. Os vetores empregados na transformação de fungos filamentosos constituem-se, em geral, de DNA plasmidial de origem bacteriana (*Escherichia coli*) nos quais são incorporadas marcas seletivas apropriadas. Como marcador seletivo foi utilizado antibiótico (geneticina e higromicina B).

Foi feito um range de concentração dos antibióticos geneticina e higromicina B (20, 50, 100, 200 e 500 µg/mL) para a escolha da melhor concentração que garantisse a resistência para seleção dos transformantes. A concentração escolhida para geneticina foi de 100 µg/mL e para higromicina B foi de 50 µg/mL conforme mostra a Figura 14 **a)** e **b)**, respectivamente.

a)



b)



**Figura 14:** a) Seleção do marcador para *xyr1*, range de concentrações de geneticina; b) Seleção do marcador para *lae1*, range de concentrações de higromicina B.

## 4.2. Identificação dos genes *xyr1* e *lae1*

O genoma do *T. harzianum* apesar de estar sequenciado ainda não está anotado. Assim, foi realizado um *blast* das sequências de interesse no banco do *Trichoderma reesei* utilizando o NCBI (National Center for Biotechnology Information), para o desenho dos *primers* conforme mostra a Tabela 1, para realizar a amplificação e certificação dos mesmos. Extraiu-se o DNA conforme metodologia padrão (Sambrook et al., 1989) para realizar a amplificação.

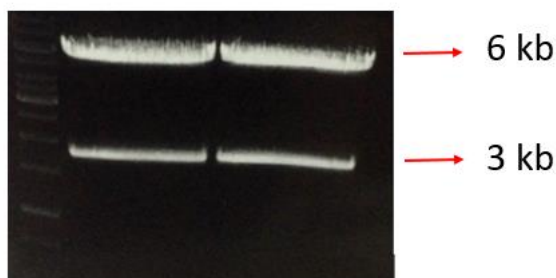
**Tabela 2:** GenBank das sequencias de *T. reesei* utilizadas para fazer o blast no NCBI do *T. harzianum*.

Sequência	GenBank ( <i>T. reesei</i> )	Primers
Lae1	AFX86442.1	(F)ATGGAACCTCATCAATCAG (R) GAGTCCAACAAGCACGTCT
Xyr1	AAO33577.1	(F)ATGTTGTCCAATCCTCTCC (R) TCAAACAGTACCAGCAATCA

## 4.3. Estratégia para super expressão de *xyr1* e *lae1*

Foi utilizado o plasmídeo pki-gen (Mach et al., 1994), sem o *xyr1* de *T. reesei*. O mesmo foi clivado utilizando a enzima de restrição XbaI overnight à 37°C, apenas para promover a linearização. Para superexpressão de *lae1* utilizou-se o plasmídeo *tef1* com 6kb + *lae1* de *T. reesei* com 3kb. Foi utilizado as enzimas de restrição ClaI e HindIII para poder isolar o vetor *tef* como mostra a Figura 15.





**Figura 15:** Plasmídeo *tef1* digerido com as enzimas *Cla*I e *Hind*III, *tef 1* com 6kb (banda superior) e *lae1* de *T. reesei* com 3kb (banda inferior).

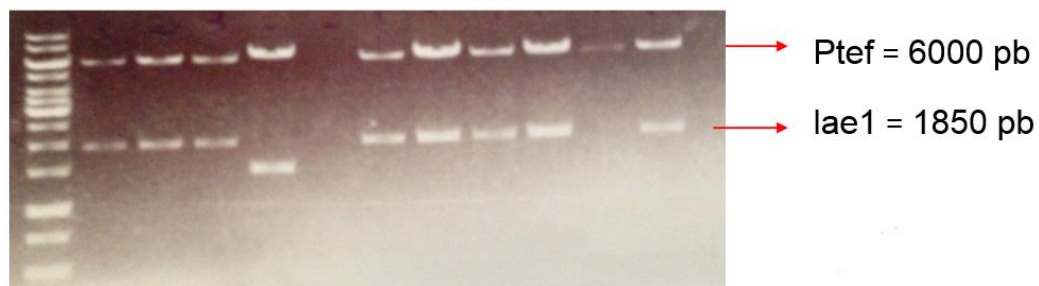
O vetor *tef 1* foi excisado e purificado usando o protocolo de extração de gel QIAquick (Qiagen) conforme orientações do fabricante. O protocolo de clonagem em *E. coli* JM109 foi otimizado, portanto foi necessário um longo período de tempo para sua otimização e eficácia. Inicialmente foi utilizado Stella cells (Clontech, USA) para transformação usando diferentes proporções de diluição.

Foram obtidas 11 colônias isoladas de superexpressão de *xyl1* e *lae1*, respectivamente, as quais foram repicadas individualmente em tubo contendo LB-amp. As mesmas foram confirmadas utilizando enzima de restrição para separar o gene do vetor. Após confirmação em gel foram escolhidos os clones positivos 8 e 10 para midiprep plasmidial e posterior transformação em *T. harzianum*. A figura 16 a) mostra as duas bandas excisadas correspondente ao vetor *pki* (banda superior) e gene *xyl1* (banda inferior), já em b) temos as bandas do vetor *tef1* (banda superior) e o gene *lae1* (banda inferior),

a)

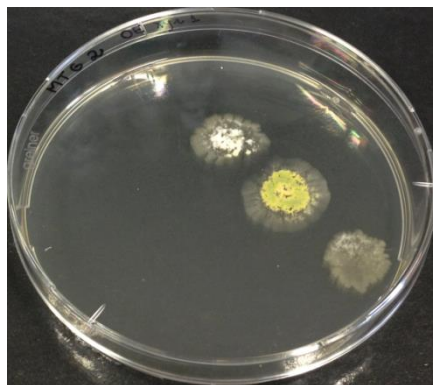


b)



**Figura 16:** Confirmação das colônias de superexpressão por excisão, em **a)** mostra as duas bandas excisadas correspondente ao vetor pki (banda superior) e gene xy1 (banda inferior), já em **b)** temos as bandas do vetor tef1 (banda superior) e gene lae1 (banda inferior).

Quarenta e cinco possíveis transformantes de xy1 foram isolados em placa de Petri contendo apenas MEX+ marcador seletivo geneticina 100 $\mu$ g/mL e 48 possíveis transformantes de lae1 também foram isolados em placa de Petri contendo apenas MEX+ marcador seletivo higromicina B 50 $\mu$ g/mL. A Figura 17 mostra uma das placas com transformantes de xy1. Todos esses transformantes foram analisados por fermentação submersa quanto a produção das enzimas FPase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase e CMCase.



**Figura 17:** Colônias isoladas em placa contendo MEX + 0,1% de TritonX100 + marcador seletivo geneticina na concentração de 100 $\mu$ g/mL.

#### 4.3.1. Fermentações com os clones positivos para superexpressão de *xyr1*

Para avaliar a produção das enzimas pelos transformantes com superexpressão de *xyr1* foi realizada fermentação submersa utilizando BED como fonte de carbono. A Tabela 3, 4 e 5 mostra as atividades enzimáticas de FPase (metodologia usando placa de 96 poços), xilanase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase obtidas nos tempos de 48, 72 e 96 horas, respectivamente. O ensaio de fermentação para o fungo *T. harzianum* selvagem foi feito em triplicata e o desvio padrão obtido foi  $\leq 0,12$  para todas as atividades.

**Tabela 3:** Fermentação submersa dos clones de *xyl1* e do *T. harzianum* selvagem no tempo de 48 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática para as enzimas avaliadas.

Clone_xyr1	Tempo (h)	FPase (FPU/mL)	CMCase (IU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -Glicosidase (IU/mL)
<b>1</b>	<b>48</b>	<b>0,47</b>	<b>0,42</b>	<b>90,89</b>	<b>8,83</b>
<b>2</b>	<b>48</b>	<b>0,48</b>	<b>0,68</b>	<b>89,52</b>	<b>8,25</b>
3	48	0,41	0,65	86,70	6,94
4	48	0,42	0,62	84,78	7,06
<b>5</b>	<b>48</b>	<b>0,56</b>	<b>0,72</b>	<b>101,13</b>	<b>8,78</b>
<b>6</b>	<b>48</b>	<b>0,45</b>	<b>0,70</b>	<b>102,54</b>	<b>8,69</b>
<b>7</b>	<b>48</b>	<b>0,49</b>	<b>0,67</b>	<b>88,79</b>	<b>7,52</b>
8	48	0,49	0,65	83,01	8,00
9	48	0,49	0,61	76,11	6,89
10	48	0,54	0,69	82,62	7,17
12	48	0,44	0,67	71,52	6,78
<b>13</b>	<b>48</b>	<b>0,52</b>	<b>0,61</b>	<b>92,69</b>	<b>9,17</b>
14	48	0,54	0,68	90,27	8,47
15	48	0,55	0,68	89,25	6,00
<b>16</b>	<b>48</b>	<b>0,47</b>	<b>0,72</b>	<b>82,56</b>	<b>8,84</b>
17	48	0,55	0,68	81,36	6,10
18	48	0,41	0,43	85,08	4,21
19	48	0,48	0,66	89,10	7,13
20	48	0,39	0,64	91,52	3,67
22	48	0,48	0,68	66,08	7,09
23	48	0,43	0,43	66,51	6,83
24	48	0,67	0,36	76,29	6,45
25	48	0,40	0,42	91,26	4,35
26	48	0,55	0,71	86,37	6,69
27	48	0,21	0,27	34,67	2,98
28	48	0,31	0,61	62,39	5,44
<b>29</b>	<b>48</b>	<b>0,49</b>	<b>0,44</b>	<b>80,62</b>	<b>8,23</b>
<b>30</b>	<b>48</b>	<b>0,56</b>	<b>0,68</b>	<b>92,28</b>	<b>7,09</b>
32	48	0,47	0,67	87,25	7,23
33	48	0,39	0,43	78,75	6,37
<b>35</b>	<b>48</b>	<b>0,48</b>	<b>0,46</b>	<b>76,87</b>	<b>6,69</b>
36	48	0,21	0,67	82,73	7,30
37	48	0,53	0,31	38,84	2,91
38	48	0,51	0,46	87,35	6,83
39	48	0,48	0,45	74,60	7,31
40	48	0,49	0,44	80,89	7,36
<b>41</b>	<b>48</b>	<b>0,52</b>	<b>0,68</b>	<b>92,74</b>	<b>6,69</b>
<b>42</b>	<b>48</b>	<b>0,48</b>	<b>0,69</b>	<b>100,43</b>	<b>2,40</b>
43	48	0,51	0,37	99,70	7,87
44	48	0,23	0,34	62,18	6,94
<b>45</b>	<b>48</b>	<b>0,41</b>	<b>0,69</b>	<b>92,93</b>	<b>6,22</b>
<i>T. harzianum</i>	48	0,44	0,43	67,90	6,71

**Tabela 4:** Fermentação submersa dos clones de *xyr1* e do *T. harzianum* selvagem no tempo de 72 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática para as enzimas avaliadas.

Clone_xyr1	Tempo (h)	FPase (FPU/mL)	CMCase (IU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -Glicosidase (IU/mL)
<b>1</b>	<b>72</b>	<b>0,70</b>	<b>1,94</b>	<b>91,64</b>	<b>9,66</b>
<b>2</b>	<b>72</b>	<b>0,69</b>	<b>2,03</b>	<b>87,50</b>	<b>9,43</b>
3	72	0,44	2,06	88,86	7,79
4	72	0,43	2,08	79,62	8,40
<b>5</b>	<b>72</b>	<b>0,55</b>	<b>2,36</b>	<b>90,34</b>	<b>10,11</b>
<b>6</b>	<b>72</b>	<b>0,49</b>	<b>2,20</b>	<b>92,63</b>	<b>9,98</b>
<b>7</b>	<b>72</b>	<b>0,85</b>	<b>2,28</b>	<b>88,85</b>	<b>7,90</b>
8	72	0,45	2,10	84,48	9,23
9	72	0,42	1,91	79,44	7,50
10	72	0,45	2,19	81,81	8,11
12	72	0,45	2,11	80,00	8,33
<b>13</b>	<b>72</b>	<b>0,80</b>	<b>2,06</b>	<b>88,39</b>	<b>9,79</b>
14	72	0,47	2,05	78,00	9,11
15	72	0,42	2,11	77,13	6,83
<b>16</b>	<b>72</b>	<b>0,80</b>	<b>2,09</b>	<b>78,49</b>	<b>9,32</b>
17	72	0,41	2,09	67,29	7,76
18	72	0,40	2,00	76,62	4,81
19	72	0,41	2,17	74,45	8,10
20	72	0,39	2,04	79,60	4,01
22	72	0,56	2,18	81,85	8,30
23	72	0,41	2,12	72,02	7,81
24	72	0,74	2,28	69,54	7,27
25	72	0,37	2,10	90,64	5,02
26	72	0,72	2,17	94,32	7,32
27	72	0,37	1,66	75,60	6,13
28	72	0,39	1,96	81,45	6,72
<b>29</b>	<b>72</b>	<b>0,72</b>	<b>2,14</b>	<b>73,82</b>	<b>8,74</b>
<b>30</b>	<b>72</b>	<b>0,49</b>	<b>1,94</b>	<b>102,68</b>	<b>7,56</b>
32	72	0,61	2,10	99,58	7,89
33	72	0,45	1,86	92,11	7,09
35	72	0,79	1,99	102,11	7,40
36	72	0,32	1,97	88,54	7,72
37	72	0,53	1,62	89,00	5,31
38	72	0,45	1,92	103,88	7,72
39	72	0,54	2,03	98,41	8,04
40	72	0,44	1,98	99,66	7,96
<b>41</b>	<b>72</b>	<b>0,74</b>	<b>1,99</b>	<b>109,20</b>	<b>7,46</b>
<b>42</b>	<b>72</b>	<b>0,44</b>	<b>2,05</b>	<b>104,18</b>	<b>8,54</b>
43	72	0,44	1,98	102,27	7,62
44	72	0,27	1,51	93,13	3,48
<b>45</b>	<b>72</b>	<b>0,44</b>	<b>1,97</b>	<b>99,10</b>	<b>7,04</b>
<i>T. harzianum</i>	72	0,57	2,31	86,52	7,02

**Tabela 5:** Fermentação submersa do *T. harzianum* selvagem no tempo de 96 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática para as enzimas avaliadas.

Clone_yyr1	Tempo (h)	FPase (FPU/mL)	CMCase (IU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -Glicosidase (IU/mL)
<b>1</b>	<b>96</b>	<b>0,72</b>	<b>2,30</b>	<b>76,60</b>	<b>9,27</b>
<b>2</b>	<b>96</b>	<b>0,70</b>	<b>2,01</b>	<b>85,76</b>	<b>9,29</b>
3	96	0,67	2,10	80,16	7,64
4	96	0,76	2,17	76,59	8,05
<b>5</b>	<b>96</b>	<b>0,90</b>	<b>2,48</b>	<b>95,91</b>	<b>9,47</b>
<b>6</b>	<b>96</b>	<b>0,84</b>	<b>2,36</b>	<b>93,90</b>	<b>9,33</b>
<b>7</b>	<b>96</b>	<b>0,85</b>	<b>2,24</b>	<b>93,36</b>	<b>7,73</b>
8	96	0,67	1,82	78,34	7,94
9	96	0,72	2,13	71,82	7,10
10	96	0,67	2,07	76,92	7,65
12	96	0,72	2,02	79,34	8,08
<b>13</b>	<b>96</b>	<b>0,86</b>	<b>2,07</b>	<b>97,03</b>	<b>9,57</b>
14	96	0,69	1,90	77,17	9,35
15	96	0,79	1,71	93,50	6,67
<b>16</b>	<b>96</b>	<b>0,74</b>	<b>2,07</b>	<b>82,18</b>	<b>10,14</b>
17	96	0,59	1,89	74,75	6,99
18	96	0,55	1,87	86,14	4,66
19	96	0,62	1,89	79,67	7,15
20	96	0,58	1,86	83,94	4,17
22	96	0,74	1,66	82,95	7,86
23	96	0,67	1,95	79,07	9,33
24	96	0,76	2,09	87,86	7,46
25	96	0,61	1,88	83,98	4,96
26	96	0,74	1,92	82,58	7,61
27	96	0,55	1,78	49,96	6,86
28	96	0,52	1,98	55,15	8,10
<b>29</b>	<b>96</b>	<b>0,69</b>	<b>2,36</b>	<b>67,93</b>	<b>9,87</b>
<b>30</b>	<b>96</b>	<b>0,69</b>	<b>2,15</b>	<b>79,26</b>	<b>7,71</b>
32	96	0,79	2,18	65,22	8,25
33	96	0,53	1,94	65,03	7,08
35	96	0,78	2,07	71,60	7,11
36	96	0,63	2,16	86,70	7,73
37	96	0,48	1,78	90,51	6,39
38	96	0,67	2,32	70,31	7,02
39	96	0,67	2,25	86,47	7,83
40	96	0,66	2,19	79,92	7,79
<b>41</b>	<b>96</b>	<b>0,65</b>	<b>2,23</b>	<b>99,78</b>	<b>7,11</b>
<b>42</b>	<b>96</b>	<b>0,68</b>	<b>2,02</b>	<b>82,90</b>	<b>8,87</b>
43	96	0,67	2,31	83,21	8,48
44	96	0,44	1,61	75,20	4,29
<b>45</b>	<b>96</b>	<b>0,58</b>	<b>2,09</b>	<b>95,55</b>	<b>13,78</b>
<i>T. harzianum</i>	96	0,69	2,29	70,47	7,88

Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática para as enzimas avaliadas nos 3 tempos de incubação. O pico de produção de FPase para o fungo selvagem de *T. harzianum* tido como controle foi de 0,69 FPU/mL em 96 horas de incubação. O melhor clone para a mesma atividade foi o de número 5 (xyr\_5) com valor de 0,90 FPU/mL também em 96 horas, um incremento de 30,43 %. O segundo melhor clone foi o xyr\_13 com pico de atividade de 86 FPU/mL em 96 horas, conforme mostra a Tabela 5.

Para atividade de CMCase os clones com superexpressão de xyr1 não tiveram diferença significativa de atividade quando comparado com o pico de atividade do fungo controle (2,31 U/mL) em 72 horas de incubação (Tabela 4). O clone xyr\_5 obteve o pico de atividade em 96 horas com valor de 2,48 U/mL (Tabela 5), sendo que o valor encontrado no tempo de 72 horas foi de 2,36 U/mL (Tabela 4). Entretanto, no tempo de 48 horas foi observado diferença relevante de atividade entre alguns clones (xyr\_5 – 0,72 U/mL); (xyr\_13 – 0,72 U/mL); (xyr\_6 – 0,70 U/mL); (xyr\_42 – 0,69 U/mL) e (xyr\_45 – 0,69 U/mL), em comparação com o *T. harzianum* controle (0,43 U/mL), conforme mostra a Tabela 3.

Em contrapartida a atividade de xilanase apresentou diferença significativa para todos os 3 tempos de incubação. O pico de atividade do *T. harzianum* foi de 86,52 U/mL em 72 horas (Tabela 4). O clone xyr\_41 apresentou atividade de 109,20 U/mL, correspondendo a um aumento de 26,21 % seguido dos clones xyr\_42 e xyr\_31 com valor máximo de atividade de 104, 18 U/mL e 102,68 U/mL, respectivamente (Tabela 4). No tempo de 96 horas ocorreu diminuição da atividade de xilanase para todos os clones e também para o fungo selvagem, sendo encontrada atividade de 99, 78 U/mL e 70, 47 U/mL, para o xyr\_41 e *T. harzianum* controle, respectivamente (Tabela 5).

O *T. harzianum* P49P11 é tido como um bom produtor de  $\beta$ -glicosidase, sendo capaz de produzir 15,65 U/mL em fermentação submersa em Biorreator Bioflo 3L (New Brunswick Scientific, USA) usando BED como fonte de carbono (Delabona et al., 2012). No presente ensaio o *T. harzianum* obteve atividade máxima de  $\beta$ -glicosidase de 7,88 U/mL em 96 horas de incubação (Tabela 5), ao passo que o clone xyr\_45 apresentou quase o dobro de atividade, com pico de 13, 78 U/mL em 96 horas, correspondendo a um incremento de 74,87 %, seguido do clone xyr\_16 com 10, 14 U/mL de atividade de  $\beta$ -glicosidase, conforme mostra a Tabela 5.

Como visto, Xyr1 é um ativador transcricional não somente de xyn1 e xyn2, mas também de cbh1, cbh2, egl1 e bx11, demonstrando ser controlador da transcrição de enzimas xilanólíticas bem como das celulolíticas sob condição de indução e não indução. Além disso, xyr1 proporcionou a regulação da indução da expressão do gene de algumas enzimas, por exemplo, BGLI e BXLI em *Trichoderma reesei* (Stricker et al., 2006). Em *Trichoderma harzianum* também foi verificado a indução de xilanases e celulases quando xyr1 foi super expresso chegando em incrementos de até 74,87%, como mencionado anteriormente.

Portanto, os clones 1,2,5,7,13,16,29,30,35,41,42,45 foram os escolhidos para a fermentação em maior escala usando frascos de 500 mL em 200 mL de volume reacional tendo como fonte de carbono 2% de bagaço de cana explodido e deslignificado (BED). Aumentou-se a concentração da fonte de carbono, a fim de, verificar diminuição da repressão catabólica nos clones com superexpressão de xyr1.

A Tabela 6 mostra o resultado do pico de atividades enzimáticas obtidos em 96 horas de incubação pelos clones selecionados. Nesta avaliação a atividade de FPase foi realizada empregando tubo de ensaio.

**Tabela 6:** Atividades enzimáticas dos sobrenadantes de xyr1 obtidos por fermentação submersa em frascos agitados de 500 mL com 200 mL de meio de cultura utilizando BED 2% como fonte de carbono em 96 horas de incubação à 29°C e 200 rpm de agitação.

Clones_xyr1	FPase (FPU/mL)	CMCase (IU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -glicosidase (IU/mL)	Proteínas Totais (mg/mL)
1	1,08 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,06	87,96 $\pm$ 0,1	8,29 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,06
2	1,07 $\pm$ 0,07	0,66 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,2	8,38 $\pm$ 0,05	0,79 $\pm$ 0,08
5	1,29 $\pm$ 0,1	1,33 $\pm$ 0,04	90,15 $\pm$ 0,4	9,08 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,06
7	1,36 $\pm$ 0,11	1,34 $\pm$ 0,1	88,22 $\pm$ 0,1	8,06 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,09
13	1,13 $\pm$ 0,09	0,84 $\pm$ 0,05	87,06 $\pm$ 0,09	7,87 $\pm$ 0,09	0,73 $\pm$ 0,1
16	1,11 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,06	89,96 $\pm$ 0,08	7,71 $\pm$ 0,1	0,77 $\pm$ 0,2
29	1,12 $\pm$ 0,1	0,92 $\pm$ 0,07	80,74 $\pm$ 0,1	8,13 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,2
30	1,14 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,06	79,02 $\pm$ 0,2	8,4 $\pm$ 0,08	0,7 $\pm$ 0,08
35	1,13 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,08	79,6 $\pm$ 0,3	8,72 $\pm$ 0,1	0,76 $\pm$ 0,1
41	1,02 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,05	93,05 $\pm$ 0,2	7,32 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,09
42	1,12 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,04	75,67 $\pm$ 0,2	7,81 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,05
45	1,08 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,05	67,96 $\pm$ 0,1	9,49 $\pm$ 0,1	0,71 $\pm$ 0,2
<i>T. harzianum</i>	0,83 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,07	62,21 $\pm$ 0,2	6,14 $\pm$ 0,2	0,64 $\pm$ 0,2



Os resultados mostram que realmente houve um incremento na produção das enzimas quando tem a superexpressão de *xyr1*. O clone *xyr\_5* foi o melhor transformante obtido, com atividade de FPase de  $1,36 \pm 0,11$  FPU/mL contra  $0,83 \pm 0,11$  FPU/mL alcançado pelo selvagem (Tabela 5), um incremento de quase 64%. As atividades de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase do *xyr\_5* também foram melhores, apresentando um incremento de 71,71%; 44,91%; 47,88 %, respectivamente.

Pucher et al. (2011) observou transcrição alterada no perfil de genes que codifica para enzimas associadas com a degradação de (hemi) celuloses em uma linhagem mutante de *T. reesei* sob controle do gene *nagl* de *T. atroviride*. No entanto, o promotor *nagl* não é mais forte que o promotor nativo de *xyr1* e, portanto, as atividades não foram significativamente melhoradas. Por outro lado, Seiboth et al. (2012) obteve aumento na produção de celulases quando realizou a superexpressão do gene *xyr1* sob controle do promotor constitutivo forte *pki* em *Trichoderma* QM9414. Wang et al. (2013) obtiveram incrementos de 114 e 134 % para as atividades de FPase e CMCase respectivamente, em sobrenadante de *Trichoderma reesei* RUT C30 com superexpressão de *xyr1* sob controle do promotor *pdv* de *T. reesei*. O gene *pdv* de *T. reesei* (que codifica piruvato descarboxilase), foi recentemente identificado e tem sido usado para gerar altos níveis de expressão de celulases recombinante.

Portanto, usar ferramentas de biologia molecular para superexpressão de genes relacionados com a expressão de enzimas degradantes da biomassa parece ser uma estratégia bastante vantajosa, já que possibilita resultados interessantes.

#### 4.3.2. Fermentações com os clones positivos para superexpressão de *lae1*

Para avaliar a produção das celulases pelos transformantes com superexpressão de *lae1* foi realizada fermentação submersa utilizando Celufloc<sup>®</sup> 1% como fonte de carbono. A Tabela 6, 7 e 8 mostra as atividades enzimáticas de FPase (metodologia usando placa de 96 poços), xilanase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase obtidas nos tempos de 48, 72 e 96 horas, respectivamente. O ensaio de fermentação para o fungo *T. harzianum* selvagem foi feito em triplicata e o desvio padrão obtido foi  $\leq 0,14$  para todas as atividades.

**Tabela 7:** Fermentação submersa tendo 1% Celufloc® como fonte de carbono, dos clones de lae1 e do *T. harzianum* selvagem no tempo de 48 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática.

Clone_lae1	Tempo (h)	FPase (FPU/mL)	CMCase (IU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -Glicosidase (IU/mL)
1	48	0,36	0,51	94,38	1,61
<b>2</b>	<b>48</b>	<b>0,40</b>	<b>0,48</b>	<b>100,98</b>	<b>2,35</b>
3	48	0,35	0,49	109,05	2,11
<b>4</b>	<b>48</b>	<b>0,47</b>	<b>0,50</b>	<b>118,05</b>	<b>2,36</b>
5	48	0,41	0,49	109,93	2,17
6	48	0,37	0,48	94,56	2,04
<b>7</b>	<b>48</b>	<b>0,41</b>	<b>0,50</b>	<b>106,85</b>	<b>2,44</b>
8	48	0,33	0,47	104,94	1,76
9	48	0,38	0,39	77,61	2,31
10	48	0,33	0,45	94,93	1,56
12	48	0,41	0,46	98,88	2,17
14	48	0,34	0,48	107,87	2,18
15	48	0,33	0,50	91,61	2,13
<b>17</b>	<b>48</b>	<b>0,37</b>	<b>0,58</b>	<b>65,73</b>	<b>2,28</b>
19	48	0,31	0,54	67,17	2,21
20	48	0,25	0,53	64,32	1,62
21	48	0,30	0,52	67,12	2,24
22	48	0,31	0,53	65,82	1,92
23	48	0,33	0,54	61,06	1,97
24	48	0,30	0,51	59,90	1,51
26	48	0,28	0,54	62,20	1,71
27	48	0,26	0,51	64,11	1,54
28	48	0,30	0,51	70,06	2,02
29	48	0,29	0,49	64,57	1,80
30	48	0,27	0,46	59,72	1,54
31	48	0,26	0,51	62,70	1,91
32	48	0,17	0,51	50,29	2,06
<b>33</b>	<b>48</b>	<b>0,19</b>	<b>0,52</b>	<b>50,75</b>	<b>2,64</b>
34	48	0,19	0,52	52,92	2,28
35	48	0,19	0,49	49,30	1,71
36	48	0,18	0,52	54,45	2,06
37	48	0,18	0,49	49,81	1,55
38	48	0,19	0,47	46,97	1,62
39	48	0,17	0,50	45,66	1,35
<b>40</b>	<b>48</b>	<b>0,23</b>	<b>0,55</b>	<b>51,05</b>	<b>2,89</b>
<b>41</b>	<b>48</b>	<b>0,21</b>	<b>0,52</b>	<b>44,91</b>	<b>2,62</b>
<b>42</b>	<b>48</b>	<b>0,20</b>	<b>0,50</b>	<b>45,27</b>	<b>2,45</b>
43	48	0,19	0,47	40,67	2,11
44	48	0,17	0,47	44,49	1,74
45	48	0,18	0,51	47,15	2,21
<i>T. harzianum</i>	48	0,26	0,52	69,63	1,99

**Tabela 8:** Fermentação submersa tendo 1% Celufloc® como fonte de carbono, dos clones de lae1 e do *T. harzianum* selvagem no tempo de 72 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática.

Clone_lae1	Tempo (h)	FPase (FPU/mL)	CMCase (IU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -Glicosidase (IU/mL)
1	72	0,45	0,81	97,14	2,11
<b>2</b>	<b>72</b>	<b>0,48</b>	<b>0,89</b>	<b>105,18</b>	<b>2,86</b>
3	72	0,43	0,83	107,88	2,48
<b>4</b>	<b>72</b>	<b>0,50</b>	<b>0,84</b>	<b>120,59</b>	<b>2,88</b>
5	72	0,44	0,80	114,39	2,65
6	72	0,41	0,75	94,15	2,50
<b>7</b>	<b>72</b>	<b>0,44</b>	<b>0,84</b>	<b>113,87</b>	<b>2,94</b>
8	72	0,40	0,77	100,41	2,27
9	72	0,41	0,79	98,12	2,67
10	72	0,36	0,76	92,87	1,86
12	72	0,45	0,75	107,28	2,60
14	72	0,41	0,79	96,71	2,62
15	72	0,40	0,76	95,47	2,69
<b>17</b>	<b>72</b>	<b>0,44</b>	<b>0,88</b>	<b>59,93</b>	<b>2,43</b>
19	72	0,43	0,92	57,24	2,63
20	72	0,40	0,92	59,64	0,98
21	72	0,46	0,87	58,72	2,72
22	72	0,41	0,81	57,28	2,37
23	72	0,45	0,70	53,76	2,52
24	72	0,40	0,86	57,21	1,75
26	72	0,39	0,78	51,73	1,93
27	72	0,40	0,80	49,65	1,83
28	72	0,28	0,80	57,90	2,66
29	72	0,41	0,79	52,27	2,37
30	72	0,35	0,72	46,32	1,63
31	72	0,38	0,82	56,25	2,32
32	72	0,20	0,82	98,40	2,70
<b>33</b>	<b>72</b>	<b>0,25</b>	<b>0,87</b>	<b>103,07</b>	<b>3,01</b>
34	72	0,24	0,84	90,08	2,60
35	72	0,20	0,77	84,73	2,04
36	72	0,21	0,79	95,49	2,56
37	72	0,20	0,81	97,00	2,14
38	72	0,25	0,84	84,67	2,01
39	72	0,18	0,81	81,76	1,81
<b>40</b>	<b>72</b>	<b>0,26</b>	<b>0,88</b>	<b>120,83</b>	<b>3,30</b>
<b>41</b>	<b>72</b>	<b>0,21</b>	<b>0,88</b>	<b>95,92</b>	<b>3,08</b>
<b>42</b>	<b>72</b>	<b>0,21</b>	<b>0,90</b>	<b>96,62</b>	<b>2,86</b>
43	72	0,20	0,84	78,57	2,50
44	72	0,20	0,79	79,71	2,19
45	72	0,20	0,87	77,79	2,21
<i>T. harzianum</i>	72	0,34	0,79	83,12	2,47

Tabela 9: Fermentação submersa tendo 1% Celufloc® como fonte de carbono, dos clones de lae1 e do *T. harzianum* selvagem no tempo de 96 horas de incubação. Os clones destacados em vermelho foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática.

Clone_lae1	Tempo (h)	FPase (FPU/mL)	CMCase (IU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -Glicosidase (IU/mL)
1	96	0,42	0,84	105,43	1,87
<b>2</b>	<b>96</b>	<b>0,51</b>	<b>0,87</b>	<b>121,53</b>	<b>2,91</b>
3	96	0,41	0,80	115,28	2,51
<b>4</b>	<b>96</b>	<b>0,52</b>	<b>0,85</b>	<b>127,83</b>	<b>3,00</b>
5	96	0,46	0,82	115,10	2,67
6	96	0,40	0,73	96,34	2,33
<b>7</b>	<b>96</b>	<b>0,46</b>	<b>1,00</b>	<b>119,10</b>	<b>2,94</b>
8	96	0,41	0,74	110,23	2,23
9	96	0,46	0,75	115,92	2,84
10	96	0,40	0,69	101,02	1,86
12	96	0,47	0,72	114,25	2,45
14	96	0,49	0,73	107,21	2,61
15	96	0,42	0,70	104,42	2,55
<b>17</b>	<b>96</b>	<b>0,48</b>	<b>0,96</b>	<b>88,35</b>	<b>2,87</b>
19	96	0,40	0,87	68,97	2,22
20	96	0,52	0,99	70,22	1,55
21	96	0,44	0,98	64,87	2,26
22	96	0,51	0,98	67,76	2,84
23	96	0,49	0,71	62,31	3,03
24	96	0,50	0,97	63,85	1,99
26	96	0,47	0,99	60,40	2,27
27	96	0,45	1,02	63,65	2,06
28	96	0,53	0,92	71,35	2,13
29	96	0,52	0,90	50,77	2,89
30	96	0,42	0,79	59,00	1,88
31	96	0,28	0,87	70,14	3,10
32	96	0,25	0,82	121,31	2,97
<b>33</b>	<b>96</b>	<b>0,38</b>	<b>1,04</b>	<b>128,06</b>	<b>3,46</b>
34	96	0,24	0,90	129,14	3,02
35	96	0,24	0,89	107,43	2,31
36	96	0,24	0,90	126,16	2,66
37	96	0,23	0,87	114,30	2,33
38	96	0,25	0,86	110,91	2,23
39	96	0,21	0,87	106,91	2,05
<b>40</b>	<b>96</b>	<b>0,49</b>	<b>0,94</b>	<b>139,70</b>	<b>3,52</b>
<b>41</b>	<b>96</b>	<b>0,41</b>	<b>0,93</b>	<b>120,27</b>	<b>3,24</b>
<b>42</b>	<b>96</b>	<b>0,46</b>	<b>0,92</b>	<b>119,35</b>	<b>3,90</b>
43	96	0,33	0,90	99,38	2,69
44	96	0,23	0,65	105,80	2,54
45	96	0,27	0,92	104,95	2,89
<i>T. harzianum</i>	96	0,37	0,82	94,00	2,64

Os clones destacados em vermelho (2;4;7;17;33;40;41 e 42) foram os que de maneira geral apresentaram maior atividade enzimática para as enzimas avaliadas nos 3 tempos de incubação. O pico de produção de FPase para o fungo selvagem de *T. harzianum* tido como controle foi de 0,37 FPU/mL em 96 horas de incubação. O melhor clone para a mesma atividade foi o de número 4 (lae\_4) com valor de 0,52 FPU/mL também em 96 horas, um incremento de 40,54 %. O segundo melhor clone foi o lae\_2 com pico de atividade de 0,51 FPU/mL em 96 horas, conforme mostra a Tabela 9.

Para atividade de CMCase, 5 clones se destacaram: lae\_7; lae\_20; lae\_26; lae\_27 e lae\_33 com atividade aproximada de 1,0 U/mL em 96 horas de incubação contra 0,82 U/mL (96 horas) produzida pelo fungo selvagem (Tabela 9), um incremento de quase 22%.

Para atividade de xilanase muitos clones apresentaram resultados relativamente maiores que o fungo selvagem, cujo pico de atividade foi de 94,0 U/mL em 96 horas (Tabela 9). O melhor clone para xilanase foi o lae\_40 com pico de 139,70 U/mL em 96 horas, um incremento de quase 50%. Os clones lae\_33; lae\_4; lae\_2 e lae\_41 também se destacaram, com atividade de xilanase acima de 120,0 U/mL conforme mostra a Tabela 9.

A superexpressão de lae1 também foi positiva para a atividade de  $\beta$ -glicosidase nos 3 tempos avaliados conforme mostra as Tabelas 7, 8 e 9. O pico de atividade ocorreu em 96 horas de incubação (Tabela 9), sendo que o fungo selvagem atingiu 2,64 U/mL. O melhor clone para essa atividade foi o lae\_42 com 3,9 U/mL, um incremento de 47,72%. Os clones lae\_4; lae\_23; lae\_31; lae\_34; lae\_40; lae\_41 e lae\_42 apresentaram atividade de CMCase acima de 3,0 U/mL (Tabela 9).

Existe muita especulação acerca da ação de LAE1 e até a presente data apenas um trabalho publicado com a superexpressão do gene, realizado no fungo *Trichoderma* QM9414 (Seiboth et al., 2012). Este trabalho sugere que LAE1 está envolvida no controle da transcrição de genes de celulases, destacando aumento da atividade de CMCase quando o fungo foi cultivado em celulose.

Para certificação do resultado realizado em micro fermentação, os clones 2, 4, 7, 17, 33, 40, 41 e 42 foram os escolhidos para a fermentação em maior escala usando frascos de 500 mL em 200 mL de volume reacional tendo como fonte de carbono 2% de Celufloc®. Aumentou-se a concentração da fonte de carbono, a fim de, verificar diminuição da repressão catabólica nos clones com superexpressão de lae1.

A Tabela 10 mostra o resultado do pico de atividades enzimáticas obtidos em 96 horas de incubação pelos clones selecionados (2, 4, 7, 33, 40, 41 e 42), bem como pelo *T. harzianum* selvagem. Nesta avaliação a atividade de FPase foi realizada empregando tubo de ensaio.

**Tabela 10:** Atividades enzimáticas dos sobrenadantes de lae1 obtidos por fermentação submersa em frascos agitados de 500 mL com 200 mL de meio de cultura usando Celufloc® 2% como fonte de carbono em 96 horas de incubação à 29°C e 200 rpm de agitação.

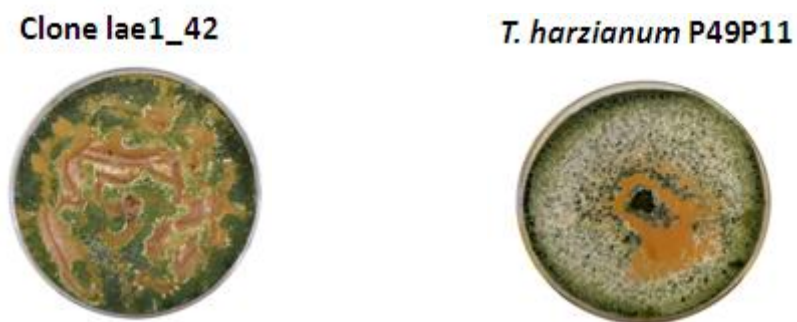
Clones_lae1	FPase (FPU/mL)	CMCase (IU/mL)	Xilanase (IU/mL)	$\beta$ -glicosidase (IU/mL)	Proteínas Totais (mg/mL)
2	0,89 $\pm$ 0,1	0,91 $\pm$ 0,21	141,5 $\pm$ 5,1	2,95 $\pm$ 0,8	0,42 $\pm$ 0,2
4	0,90 $\pm$ 0,1	1,00 $\pm$ 0,3	138,9 $\pm$ 6,9	3,56 $\pm$ 0,6	0,45 $\pm$ 0,2
7	0,95 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,08	155,7 $\pm$ 4,1	3,85 $\pm$ 0,2	0,49 $\pm$ 0,07
33	0,93 $\pm$ 0,07	1,09 $\pm$ 0,05	145,6 $\pm$ 8,7	3,6 $\pm$ 0,3	0,50 $\pm$ 0,02
40	0,82 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,07	156,8 $\pm$ 4,8	3,41 $\pm$ 0,4	0,50 $\pm$ 0,04
41	0,91 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,04	153,6 $\pm$ 3,5	3,99 $\pm$ 0,6	0,51 $\pm$ 0,02
42	0,97 $\pm$ 0,04	1,12 $\pm$ 0,04	142,2 $\pm$ 7,8	3,71 $\pm$ 0,8	0,53 $\pm$ 0,02
<i>T. harzianum</i>	0,57 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,02	103,2 $\pm$ 5,9	1,82 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,09

Os resultados mostraram que realmente houve um incremento na produção das enzimas quando tem a superexpressão de lae1. O clone lae1\_42 foi o que mais se destacou de maneira geral, com atividade de FPase de 0,97  $\pm$  0,04 FPU/mL, respectivamente contra 0,57  $\pm$  0,03 FPU/mL alcançado pelo selvagem (Tabela 10), um incremento de 70,17%. As atividades de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase também foram melhores frente às atividades obtidas pelo selvagem, com valores de 1,12 IU/mL; 142,2 IU/mL; 3,71 IU/mL, respectivamente.

Para produção de xilanase o melhor clone foi o lae1\_40 com atividade de 156,8  $\pm$  4,8 com aumento de 51,93% em relação ao selvagem. Para a enzima  $\beta$ -glicosidase o melhor clone foi o lae1\_41 com o dobro de atividade comparado com o fungo selvagem.

O trabalho de Seiboth et al. (2012) também sugere que a manipulação da expressão gênica de lae1 em *T. reesei* causa alterações fenotípicas marcantes, no seu estudo em estirpes delta-lae1 foi relatado a falta da pigmentação amarelada que é produzida por *T. reesei*, e pela significativa redução da esporulação, já em estirpes com

superexpressão de *lae1* ocorreu a recuperação da pigmentação, e levou a um aumento da esporulação. No presente estudo não foi observada diferença na esporulação com a superexpressão de *lae1*. A Figura 19 mostra o crescimento do clone *lae1\_42* e do fungo selvagem em meio PDA em placa de Petri.



**Figura 18:** Crescimento do clone *lae1\_42* (esquerda) e do fungo selvagem (direita) em meio PDA em placa de Petri.

Portanto, para o fungo *Trichoderma harzianum* podemos concluir que a superexpressão de *lae1* teve influência na produção das enzimas FPase, CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase representando uma nova abordagem como técnica de melhoramento de celulases.

## Capítulo VII

### Considerações Finais e Perspectivas

A produção de etanol 2G já está em desenvolvimento e encontra-se diante de um grande desafio: utilizar materiais complexos e compactos para serem hidrolisados em açúcares fermentescíveis. A produção de coquetéis enzimáticos eficientes a um custo viável para a sacarificação dos materiais celulósicos é a chave deste processo. Pelos resultados apresentados neste trabalho relacionados a esse desafio podemos concluir:

- O melhoramento do processo de produção de enzimas bem como o melhoramento molecular do micro-organismo *Trichoderma harzianum* pode aumentar a produção de enzimas degradantes da biomassa vegetal e a suplementação de enzimas acessórias na hidrólise enzimática pode aumentar o rendimento da produção de glicose.
- A melhor fonte de carbono indutora de celulasas em *T. harzianum* foi o bagaço de cana explodido e deslignificado (BED) + sacarose na proporção 3:1, alcançando valores de 1,21 FPU/mL, 80.0U/mL de xilanase e 17,30 U/ mL de  $\beta$ -glicosidase; Para essa melhor fonte de carbono o pH ideal para a produção de FPase e  $\beta$ -glicosidase foi pH fixo em 5.0, já para a xilanase foi pH fixo em 6.0. O uso do extrato enzimático de *T. harzianum* em hidrólise enzimática do BED apresentou desempenho similar ao extrato enzimático do hipercelulolítico de *T. reesei* Rut C30;
- Por meio de planejamento *mixture design* foi possível concluir que o BED é o componente mais importante do meio de cultura para a maximização de celulasas; e o meio de cultura MIX (composto de 6,7 g/L BED + 1,7 g/L sacarose + 1,7 g/L de farelo de trigo) maximizou a produção de xilanase e  $\beta$ -glicosidase; e a sacarose desempenhou um



papel importante na biossíntese de FPase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase; O aumento da concentração de BED e do meio MIX em 2, 3 e 4 % permitiu aumento da atividade enzimática, porém o aumento não foi proporcional à carga de fonte de carbono usada;

- O proteoma do extrato enzimático de *T. harzianum* cultivado em BED resultou na identificação de 24 hidrolases glicosídicas diferentes, 4 proteínas CBM dentro de 12 diferentes famílias do CAZy; as enzimas  $\beta$ -glicosidase and  $\beta$ -xilosidase (identificados pela família GH3) representaram majoritariamente 21% dos peptídeos encontrados seguido pelas enzimas hemicelulolíticas (família GH 10 e GH 11) com 16, 66% das proteínas identificadas;
- O painel enzimático contra substratos celulósicos e não celulósicos do extrato enzimático de *T. harzianum* cultivado em BED mostrou ausência das enzimas pectinase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, encontradas no extrato enzimático do fungo *Penicillium echinulatum*, que demonstrou melhor rendimento na hidrólise enzimática; As duas enzimas foram suplementadas no coquetel enzimático produzido por *T. harzianum* e proporcional um aumento de 116% no rendimento, de 1,5 para 3,3 g/L de glicose.
- O uso de glicerol na fase de pré-inóculo permitiu maior secreção de proteínas e maior quantidade de hifas longas e volumosas e a estratégia usando glicerol para o crescimento de elevada massa celular de *T. harzianum* seguida de indução com bagaço de cana pré-tratado mostrou ser uma alternativa interessante para aumentar a produção de celulases;
- A superexpressão de *xyr1* e *lae1* teve influência positiva na produção das enzimas FPase, CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase representando uma nova abordagem como técnica de melhoramento de celulases.

## **Perspectivas para trabalhos futuros**

Para trabalhos futuros sugere-se:

- Confirmar o aumento da superexpressão de *xyl1* e *lae1* por análise de expressão gênica utilizando a técnica de Real Time e o aumento do número de cópias dos genes pela técnica de Southern blot;
- Avaliar os melhores clones obtidos com a superexpressão de *xyl1* e *lae1* em biorreator;
- Realizar um aprofundamento no uso das técnicas de biologia molecular na tentativa de deleção do repressor catabólico *cre1*;
- Aprofundar os estudos de estratégia de aumento de massa fúngica utilizando glicerol como fonte de carbono na fase de pré-inóculo e diferentes fontes de carbono na fase de indução como sacarose.



## Referências Bibliográficas

Aden A.; Foust T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. *Cellulose*, p. 16, p. 535-545, 2009.

Akel et al. Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Eukaryot Cell*, v. 8, p. 1837–1844, 2009.

Alkorta et al. Industrial applications of pectic enzymes: a re- characterization of acidic endo-polygalacturonase enzyme. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 20 - 28, 1998.

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

Bayer et al. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 8, p. 548-557, 1998.

Beckham et al. Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, p. 231–238, 2011.

Benoliel et al. A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. *SpringerPlus*, v. 2, p. 656, 2013.

Bidlack et al. Molecular Structure and component integration of secondary cell wall in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, v. 72, p. 51-56, 1992.

Bisset, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, v.69, p.2357-72, 1991.

Bradford, M.M. 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. 248–254, 1976.

Brennan, L.; Owende, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557–577, 2010.

Brijwani, K.; Vadlani, P. Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. *Enzym Research*, p. 1-10, 2011.

Canteri et al. Pectina: da matéria prima ao produto final. *Polímeros*, vol. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

Cantarel et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, v. 37, p. 233-238 2009.

Cannella et al. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnol Biofuels*, v.5, p. 26, 2012.

Chang, et al. Induction of pathogen resistance and pathogenesis-related genes in tobacco by a heat-stable *Trichoderma* mycelial extract and plant signal messengers. *Physiologia Plantarum*, v.100, p.341-52, 1997.

Chandra et al. Cellulase production by six *Trichoderma* spp. fermented on medicinal plant processings. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 36, p. 605–609, 2009.

Chaverri et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) complex. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 27, p. 302-313, 2003.

Colussi et al. Purification, and biochemical and biophysical characterization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844. *J Microbiol Biotechnology*, v. 21, p. 808–817, 2011.

Corabi-Adell, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista. Programa de pós graduação em Ciência Biológicas. Rio Claro-SP, 2004.

Cornu et al. Lignin-carbohydrate complexes in forages: structure and consequences in the ruminal degradation of cell-wall carbohydrates. *EDP Sciences*, v. 34, p. 385-398, 1994.

Cunha, Guilherme Pereira. Identificação e análise de empresas internacionais produtoras de etanol 2G. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Cziferszky, A.; Mach, R.L.; Kubicek, C.P. Phosphorylation positively regulates DNA-binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 14688–14694, 2002.

Delabona et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technology*, v. 107, p. 517-521, 2012a.

Delabona et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and bioenergy*, v. 37, p. 243 – 250, 2012b.

Dodd, D.; Cann, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, v.1, p. 2–17, 2009.

Elad, Y.; Chet, I.; Katan, J. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v. 70, p. 119-121, 1980.

Esterbauer et al. Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, v. 36, p. 51-65, 1991.

Fasanella, C.C. A ação das enzimas ligocelulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. In: Bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. 2008. (Dissertação) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

Fengel, D., Wood, W.G. *Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter & Co, Berlin, 613 pp., 1989.

Ferraresi de Araujo et al. O etanol de segunda geração e sua importância estratégica ante o cenário energético internacional contemporâneo. IX Fórum Ambiental da Alta Paulista, v. 9, n. 5, 2013, p. 01 -11, 2014.

Ferrigo et al. Trichoderma harzianum T22 induces in maize systemic resistance against Fusarium verticillioides. *Journal of Plant Pathology*, v. 96, p. 133-142, 2014.

Fox, E.M.; Howlett, B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, p. 481–487, 2008.

Girio et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol* 101:4755–4800, 2010.

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

Harman, G.E. et al. Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. v. 2. p. 43–56, 2004.

Howell, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. v. 87, p. 4-10, 2003.

Hoondal et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 409-418, 2002.

Horn et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels* v. 5, p. 45, 2012.

Horta et al. Transcriptome Profile of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Induced by Sugarcane Bagasse. *PloSone*, 9, e88689, 2014.

Ilmen et al. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 1298–1306, 1997.

Jayani et al. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

Kazi et al. Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. *Fuel*, v. 89, p. 20-28, 2010.

Kelbert et al. Lignocellulosic bioethanol production with revalorization of low-cost agroindustrial by-products as nutritional supplements. *Industrial Crops and Products*, v. 64, p. 16–24, 2015.

Klinke et al. Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 10-26, 2004.

Kubicek et al. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels* v. 2, p.19, 2009.



Kubicek, C.P. *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. Wiley Blackwell, 304 p., 2012.

Kumar, R.; Wyman, C.E. Access of Cellulase to Cellulose and Lignin for Poplar Solids Produced by Leading Pretreatment Technologies. *Biotechnology Progress*, v. 25, p. 807-819, 2009.

Lynd et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, New York, v. 66, p. 506-577, 2002.

Lynd et al. How biotech can transform biofuels. *Nature Biotechnology*, v. 26, p. 169-172, 2008.

Mach R, et al. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Current Genetics*, v. 4, p. 567–570, 1994.

Madigan M T, Martinko J M, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms*, 10th ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, Pearson Education, Inc., 2003.

Mandels, M.; Sternberg, D. Recent advances in celulase technology. *Journal of Fermentation Technology*, v. 54, p. 267-286, 1976.

MAPA (Ministéria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Produção Brasileira de Cana-de-açúcar, Açúcar e Etanol. Disponível: <http://www.agricultura.gov.br> (Visualizado em 27 de fevereiro de 2015).

Martins, L.F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. Dissertação mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2005.

Martinez et al. Genome sequencing and analysis of the biomass - degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnology*, v. 26, p. 553–560, 2008.

Marcuschamer et al. Challenge of Enzyme Cost in the Production of Lignocellulosic Biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, 1083-1087, 2012.

Mastouri et al. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, v. 100, p. 1213-1221, 2010.

Mello, B.L.; Polikarpov, I. Family 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates. *AMB Express*, v. 4, p. 2-6, 2014.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p.426–428, 1959.

Mehulkumar et al. Recent advancement in production of liquid biofuels from renewable resources: a review. *Research on Chemical Intermediates*, v. 41, p. 475–509, 2015.

Montenecourt, B.S.; Eveleigh, D.E. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. *Advanced Chemistry*, v. 181, p. 289–301, 1979.

Morales et al. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 1349–1361, 2015.

Morgenstern, et al. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. *Brifings in Functional Genomics*, v. 13, p. 471-481, 2014.

Mussato et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 817-830, 2010.

Nigam, P. S.; Singh, A. Production of liquid biofuels from renewable sources. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 37, p. 52-68, 2011.

Numan, M.T.; Bhosle, N.B. Alpha-L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 247–260, 2006.

Ogeda, Thais Lucy; Petri, Denise F.Siqueira. Hidrólise enzimática de biomassa. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP. *Quim. Nova*, v. 33, n. 7, p. 1549- 1558, 2010.

Pandey et al. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. *Process Biochemistry*. v. 35, p. 1135-1169. 2000.

Piccolo, C.; Bezzo, F. A Techno-economic comparison between two Technologies for bioethanol production from lignocelluloses. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 478-491, 2009.

Polizeli et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbial Biotechnology*, v. 67, p. 577–591, 2005.

Radford, A., Stone, P.J.; Taleb, F. Cellulase and amylase complexes, In *The Mycota III* ed. Brambl, R. and Marzluf, G.A. pp. 269–294. S Berlin and Germany: Springer-Verlag, 1996.

Ramos, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, p. 863-871, 2003.

Rico et al. Gene sis and consol idation of the Brazilian bioethan ol: A review of policies and incentive mechanisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 1874–1887, 2010.

Ridley, B. L.; O'Neill, M. A.; Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, v. 57, p. 929–967, 2001.

Sadhu, S.; Maiti, T.K. Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal*, v. 3, p. 235-258, 2013.

Sambrook, J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989.

Sanchez C: Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185-194, 2009.

Said, S., Pietro, R.C.L.R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. 1ª. Ed.. Ribeirão Preto:Legis Summa, 416p., 2004.

Sandgren et al. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v.89, p.246-291, 2005.

Santi et al. Pectinase e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Caderno pedagógico, Lajeado*, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

Santos et al. Potencial da Palha de Cana-de-açúcar para Produção de Etanol. *Quím. Nova*, v. 35, p. 1004 – 1010. 2012.

Schimidell, W.; Facciotti, M.C.R. *Biorreatores e processos fermentativos*. Biotecnologia Industrial. Editora Edgard Blucher, 6ª edição, p. 179-192, 2001.

Schimidell et al. Modelagem matemática e simulação de processo fermentativo. *Biotecnologia Industrial*, Edgard Blucher, p. 123-178, 2001.

Singhania et al. Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 541-549, 2010.

Sivan, A., Chet, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*, v.135, p.675-82, 1989.

Seiboth et al. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, v. 84, p. 1150–1164, 2012.

Seidl et al. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics*, v. 9, p. 327, 2008.

Shallom, D.; Shoham, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, p. 219–228, 2003.

Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.

Stewart D. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products*, v. 27, p. 202-207, 2008.

Stricker et al. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell*, v. 5, p. 2128–2137, 2009.

USDA (United States Department of Agriculture). Brazil Biofuels Annual - Annual Report, 2013 Disponível: <http://gain.fas.usda.gov> (Visualizado em 27 de fevereiro de 2015).

Wang et al. Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 40, p. 633–641, 2013.

Yapo, B.M. Pectin, rhamnogalacturonan II: on the small stem with four branches in the primary cell walls of plants. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011 (Disponível on line doi:10.1155/2011/964521).

Yu et al. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation*, v. 18, p. 793–802, 2007.

Yusuf, N.N.A.N.; Kamarudin, S.K.; Yaakub Z. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 2741–2751, 2011.

Zeilinger et al. Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 34463-34471, 1998.

Zhang, Y.H.; Lynd, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Bioengineering and Biotechnology*, v. 88, p. 797–824, 2004.