



ROSANA GOLDBECK

**“DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES LIGNOCELULOLÍTICAS E
ESTUDO GENÉTICO DE MICRO-ORGANISMOS SILVESTRES ISOLADOS
DE DIVERSAS REGIÕES BRASILEIRAS VISANDO A PRODUÇÃO DE
BIOETANOL”**

***“DETERMINATION OF LIGNOCELLULOLYTIC PROPERTIES AND
GENETIC STUDY OF WILD MICROORGANISMS ISOLATED FROM
DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS FOR BIOETHANOL PRODUCTION”***

CAMPINAS
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ROSANA GOLDBECK

**DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES LIGNOCELULOLÍTICAS E ESTUDO
GENÉTICO DE MICRO-ORGANISMOS SILVESTRES ISOLADOS DE DIVERSAS
REGIÕES BRASILEIRAS VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

***DETERMINATION OF LIGNOCELLULOLYTIC PROPERTIES AND GENETIC STUDY OF
WILD MICROORGANISMS ISOLATED FROM DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS FOR
BIOETHANOL PRODUCTION***

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP) para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Doctorate Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas (FEA/UNICAMP) to obtain the Ph.D grade in Food Engineering.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ROSANA GOLDBECK E
ORIENTADA PELO PROF. DR. FRANCISCO MAUGERI FILHO

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

G564g Golbeck, Rosana, 1982-
Determinação das propriedades lignocelulolíticas e estudo genético de micro-organismos silvestres isolados de diversas regiões brasileiras visando a produção de bioetanol / Rosana Goldbeck. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Francisco Maugeri Filho.
Coorientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Microorganismos - Seleção. 2. *Acremonium strictum*. 3. Celulase. 4. Genes. 5. Bioetanol. I. Maugeri-Filho, Francisco. II. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Determination of lignocellulolytic properties and genetic study of wild microorganisms isolated from different brazilian regions for bioethanol production

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Microorganisms - Screening

Acremonium strictum

Cellulase

Genes

Bioethanol

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutora em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Francisco Maugeri Filho [Orientador]

Eloizio Julio Ribeiro

Saartje Hernalsteens

Fátima Aparecida de Almeida Costa

Rafael Ramos de Andrade

Data da defesa: 24-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (FEA/UNICAMP) – Orientador

Prof. Dr. Eloizio Julio Ribeiro (FEQUI/UFU) – Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Saartje Hernalsteens (UNIFESP) – Membro Titular

Dr^a. Fátima Aparecida de Almeida Costa (FEA/UNICAMP) – Membro Titular

Dr. Rafael Ramos de Andrade (FEQ/UNICAMP) – Membro Titular

Dr. Daniel Ibraim Pires Atala (BRITISH PETROLEUM) – Membro Suplente

Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco (FEQ/UNICAMP) – Membro Suplente

Dr^a. Elizama Aguiar Oliveira (FEA/UNICAMP) – Membro Suplente

*“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas já não sou mais o que era antes.”
(Martin Luther King)*

*Dedico esta Tese às pessoas que mais Amo:
Ao meu Pai Silvano e minhas irmãs Luzia e Sylvania,
Sem vocês eu nada seria!*

Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Engenharia de Alimentos e à UNICAMP por me acolherem e permitirem meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pela orientação, dedicação, amizade, confiança e claro, pelo grande ensinamento científico durante todos esses anos.

Agradeço ao Prof. Dr. Gonçalo Guimarães Amarante Pereira pela co-orientação e amizade e também a toda equipe do Laboratório de Gênômica e Expressão (LGE/IB) que sempre me ajudou nas dificuldades encontradas e contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Pau Alegre Ferrer pela supervisão durante o estágio de 6 meses realizado na Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Também quero agradecer a toda equipe de pesquisa do Prof. Dr. Pau, que me acolheu durante minha estadia no Departamento de Engenharia Química da Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Agradeço à Dr^a. Fátima Aparecida de Almeida Costa (Fifa) por ser uma pessoa adorável e estar sempre disposta a ajudar na realização dos trabalhos e a Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Rodrigues pelas sugestões ao longo da execução dos experimentos.

A Toda Equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB), que durante todos esses anos juntos, posso chamar de “Família LEB”. Pessoas maravilhosas que se tornaram grandes amigos e que sempre participaram do meu projeto, sofreram comigo nos momentos difíceis e vibraram comigo nas conquistas, levo vocês em meu coração. Em Especial, quero agradecer a Cristiane, colega de laboratório, que sempre contribui muito para a realização deste trabalho e a aluna de iniciação científica Mayla, que trabalhou junto no decorrer do trabalho. Também não posso deixar de agradecer ao meu querido amigo e colega de laboratório Marcus Bruno, que durante todo o meu mestrado e doutorado, dividiu comigo tristezas e alegrias, e principalmente me deu forças quando estive realizando estágio de doutoramento no exterior.

Aos secretários da Pós-Graduação, Cosme e Marcos, e aos secretários do Dea, Mauro, Fredi e Reinaldo, pela amizade e pelos serviços prestados.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento do projeto e a CAPES pela concessão da bolsa de estágio de doutorado no exterior.

Gostaria de agradecer a Prof^ª. Dr^ª. Saartje Hernalsteens, a Prof^ª. Dr^ª. Telma Teixeira Franco, ao Prof^º. Dr. Eloizio Julio Ribeiro, ao Dr. Daniel Ibraim Pires Atala, a Dr^ª. Fátima Aparecida de Almeida Costa, a Dr^ª. Elizama Aguiar de Oliveira e ao Dr. Rafael Ramos de Andrade por aceitarem fazer parte da banca examinadora e pelas correções e sugestões que muito contribuíram para este trabalho.

Agradeço imensamente a minha família, pelo apoio, incentivo e amor. Mesmo distantes estiveram sempre presentes na minha mente e em meu coração. Ao meu Pai pelos ensinamentos e grande incentivo aos meus estudos. À minha mãe querida, que mesmo em outro plano espiritual, me ilumina e me protege todos os dias. Á minhas irmãs (Luzia e Sylvania) pela grande amizade, amor e ajuda, e ao meu irmão Luiz Henrique. Sem vocês eu nada seria... Amo muito vocês!!!

Agradeço a todos os meus amigos que me proporcionaram momentos de alegria e felicidade, em especial Leila e Tati, pela grande amizade e companheirismo. E também a Rejane e Luana, amigas e colegas de apto, que sempre me proporcionaram momentos felizes e agradáveis. E a todos os outros amigos que aqui não citei, mas que de alguma forma me ajudaram e estão presentes em meu coração.

À Deus principalmente, que me ilumina e me protege todos os dias.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xix
RESUMO GERAL	xxiii
ABSTRACT	xxv
CAPÍTULO 1 – Apresentação do Trabalho e Revisão Bibliográfica	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	3
1.2 OBJETIVOS	6
1.2.1 Objetivo Geral	6
1.2.2 Objetivos Específicos	6
1.3 ETAPAS REALIZADAS	7
1.4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1.4.1 Microbiota Silvestre Brasileira	9
1.4.2 Biomassa Lignocelulósica	10
1.4.3 Celulases	12
1.4.4 Micro-organismos Produtores de Celulases	15
1.4.5 Gênero <i>Acremonium</i>	18
1.4.6 Produção de Celulases	19
1.4.7 Principais Aplicações das Celulases	22
1.4.8 Produção de Bioetanol	24
1.4.9 Engenharia Genética	28
1.4.10 Conceitos de Biologia Molecular	30
1.4.11 Tendências Futuras para a Produção e Aplicação de Celulases	34
Referências Bibliográficas	36
CAPÍTULO 2 – Screening and Identification of Cellulase Producing Yeast-Like Microorganisms from Brazilian Biomes	45
ABSTRACT	49
2.1 INTRODUCTION	50

2.2 MATERIALS AND METHODS	51
2.2.1 Sampling for Microorganisms	51
2.2.2 Solid Medium Selection	52
2.2.3 Liquid Medium Selection	52
2.2.4 Endoglucanase Activity	53
2.2.5 Filter Paper Activity	53
2.2.6 Cellobiase Activity	53
2.2.7 Molecular Identification	53
2.2.8 Microscopy	54
2.3 RESULTS AND DISCUSSION	54
2.3.1 Solid Medium Selection	54
2.3.2 Liquid Medium Selection	57
2.3.3 Molecular Identification	60
2.4 CONCLUSION	62
ACKNOWLEDGEMENTS	63
REFERENCES	63
CAPÍTULO 3 – Characterization and Purification of Cellulases Produced by <i>Acremonium strictum</i> Isolated from Brazilian Biome	67
ABSTRACT	69
3.1 INTRODUCTION	70
3.2 MATERIALS AND METHODS	72
3.2.1 Microorganism	72
3.2.2 Fermentation	72
3.2.3 Determination of Proteins	74
3.2.4 Precipitation with 70% Ethanol	74
3.2.5 Precipitation with 60% Acetone	74
3.2.6 Concentration by Nanofiltration	75
3.2.7 Characterization: Temperature and pH profile	75
3.2.8 Purification by FPLC	76
3.2.9 Electrophoresis SDS-PAGE	76

3.2.10 Identification of Peptides by Mass Spectrometry _____	76
3.3 RESULTS AND DISCUSSION _____	77
3.3.1 Recovery: Precipitation and Concentration of Enzymes _____	77
3.3.2 Characterization Enzymatic: Temperature and pH Profile _____	79
3.3.4 Identification of Peptides _____	89
3.4 CONCLUSION _____	91
ACKNOWLEDGMENTS _____	91
REFERENCES _____	92
CAPÍTULO 4 – Cellulase Production from a New Strain <i>Acremonium strictum</i> Isolated from Brazilian Biome Using Different Substrates _____	95
ABSTRACT _____	97
4.1 INTRODUCTION _____	98
4.2 MATERIAL AND METHODS _____	100
4.2.1 Microorganism _____	100
4.2.2 Submerged Fermentations _____	100
4.2.3 Enzymatic Activities _____	101
4.2.4 Optimization of Enzyme Production _____	102
4.3 RESULTS AND DISCUSSION _____	103
4.3.1 Fermentations: Commercial Cellulose _____	103
4.3.2 Fermentations: Lignocellulosic Biomass _____	105
4.3.3 Optimization of Enzymes Production _____	110
4.4 CONCLUSIONS _____	113
ACKNOWLEDGEMENTS _____	114
REFERENCES _____	114
CAPÍTULO 5 – Identificação, Isolamento e Clonagem de Genes de Celulases de <i>Acremonium strictum</i> em <i>Escherichia coli</i> _____	119
RESUMO _____	121
5.1 INTRODUÇÃO _____	122
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS _____	124
5.2.1 Micro-organismo _____	124

5.2.2 Extração de DNA	124
5.2.3 Sequenciamento 454 do Genoma de <i>Acremonium strictum</i>	124
5.2.4 Predição dos Genes de Celulases no Genoma de <i>Acremonium strictum</i>	125
5.2.5 Isolamento dos Genes Preditos	126
5.2.6 Amplificação e Purificação do cDNA	126
5.2.7 Clonagem em <i>Escherichia coli</i>	128
5.2.8 Mini-Preparação de DNA Plasmidial	129
5.2.9 Sequenciamento dos Clones	129
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
5.3.1 Identificação e Isolamento dos Genes de Celulases	130
5.3.2 Clonagem em <i>Escherichia coli</i>	136
5.4 CONCLUSÃO	137
AGRADECIMENTOS	138
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
CAPÍTULO 6 – Conclusões Gerais e Sugestões de Trabalhos Futuros	143
6.1 CONCLUSÕES GERAIS	145
6.2 SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS	149

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Table 3.1. Values used in the CCRD to determine the optimal temperature and pH of the enzymes from *Acremonium strictum* _____77

Table 3.2. Results for different methods employed in the precipitation and recovery of the enzymes from *Acremonium strictum* _____78

Table 3.3. Matrix of the CCRD (Central Composite Rotational Design) to determine the optimal temperature and pH of the enzymes from *Acremonium strictum* precipitated with 60% acetone _____79

Table 3.4. Analysis of variance (ANOVA) for three enzymatic activities (filter paper, cellobiase and β -glucosidase activity) that showed significant differences ($p < 0.05$) to pH and temperature profile _____82

Table 3.5. Peptides identified into liquid chromatograph coupled to mass spectrometer (ESI-TOF-QUAD) using a database containing all non-redundant proteins derived from the CAZy website _____90

CAPÍTULO 4

Table 4.1. Independent variables and levels used in the Plackett & Burman Design for optimization of cellulases production by *Acremonium strictum* _____102

Table 4.2. Matrix of the Plackett & Burman Design and their responses (CMCase and β -glucosidase activity) after 240 hours of fermentation by *Acremonium strictum* _____111

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Estrutura da celulose	11
Figura 1.2. Mecanismo de biodegradação da celulose	14
Figura 1.3. Organização genômica do RNA ribossomal: 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 e 26S rDNA	32

CAPÍTULO 2

Figure 2.1. Halo of hydrolysis formed around the colony (strain named AAJ6) when grown for 96 hours at 30 °C	55
Figure 2.2. Enzymatic Activity Indices (EAI) for the five yeast strains grown on solid medium	56
Figure 2.3. Graph of CMCase activity in relation to the fermentation time for the five strains studied	58
Figure 2.4. Graph of FPase activity in relation to the fermentation time for the five strains studied	58
Figure 2.5. Graph of Cellobiase activity in relation to the fermentation time for the five strains studied	59
Figure 2.6. Morphology of <i>Acremonium strictum</i> (AAJ6 strain) grown on SERVACEL [®] during exponential growth phase. Two distinct cellular forms can be observed (120X): pseudo-mycelia and predominantly unicellular form (yeast-like)	62

CAPÍTULO 3

Figure 3.1. Pareto charts of the effects of pH and temperature (linear L and quadratic Q) on enzymatic activity by <i>Acremonium strictum</i> : a) endoglucanase activity or CMCase; b) filter paper activity; c) cellobiase activity; d) β -glucosidase activity	81
--	----

Figure 3.2. Contour curves for enzymatic activity of *Acremonium strictum* as a function of pH and temperature: (a) filter paper activity; (b) cellobiase activity; p-value < 0.00001 __84

Figure 3.3. Chromatogram obtained by FPLC for purification of the enzymes from *Acremonium strictum* present in the enzymatic extract (precipitated with acetone 60%): a) Streamline-DEAE resin; b) Q-Sepharose resin _____86

Figure 3.4. Electrophoresis Gel used to separate of the enzymes from *Acremonium strictum* according to molecular weight. (a) standard, (b) crude enzymatic extract, (c to f) fractions of 2 mL collected from the chromatograph (FPLC) when using the Q-Sepharose resin, where maximum enzymatic activity was recorded _____88

CAPÍTULO 4

Figure 4.1. Comparison of the enzyme activities from *Acremonium strictum* using commercial substrates, such as microcrystalline cellulose (AVICEL® and SERVACEL®) and carboxymethylcellulose (CMC) during 240 hours of fermentation: a) CMCcase activity, b) FPase activity, c) Cellobiase activity d) β -glucosidase activity _____103

Figure 4.2. CMCcase activity (a) and FPase activity (b) of *Acremonium strictum* in relation to fermentation time using sugarcane bagasse pretreated with different intensities and microcrystalline cellulose (AVICEL®) _____106

Figure 4.3. Cellobiase activity (a) and β -glucosidase activity (b) of *Acremonium strictum* in relation to fermentation time using sugarcane bagasse pretreated with different intensities and microcrystalline cellulose (AVICEL®) _____108

Figure 4.4. Pareto charts of the effects of the five parameters studied: bagasse concentration, molasses concentration, agitation, pH and temperature on enzymatic production by *Acremonium strictum*: a) CMCcase activity; b) β -glucosidase activity _____112

CAPÍTULO 5

- Figura 5.1.** Mapa do vetor pGEM-T Easy _____ 128
- Figura 5.2.** Alinhamento entre as sequências do DNA genômico e as sequências do RNA mensageiro do *Contig* 006 predito no sequenciamento 454 do *Acremonium strictum* _____ 132
- Figura 5.3.** Alinhamento entre as sequências do DNA genômico e as sequências do RNA mensageiro do *Contig* 249 predito no sequenciamento 454 do *Acremonium strictum* _____ 133
- Figura 5.4.** Gel de agarose (1%) da amplificação do DNA genômico de *Acremonium strictum* usando os primers desenhados a partir dos *contigs* (006 e 249) montados através do sequenciamento 454 _____ 134
- Figura 5.5.** Gel de agarose (1%) da amplificação do cDNA de *Acremonium strictum* usando os primers desenhados a partir dos *contigs* (006 e 249) montados através do sequenciamento 454 _____ 135
- Figura 5.6.** Gel de agarose (1%) dos plasmídeos de *E. coli* contendo os insertos (*contigs* 006 e 249) amplificados com os primers universais M13 _____ 136

RESUMO GERAL

O etanol vem novamente despertando de modo crescente a atenção de pesquisadores, empresas e governo, devido ao aumento do preço do petróleo e perspectivas de esgotamento das fontes não-renováveis de combustíveis fósseis, bem como, preocupações de natureza ambiental, relacionadas à emissão de substâncias que comprometem o meio ambiente. O estabelecimento de metas extremamente ambiciosas para aumento do consumo do etanol nos próximos anos requer um aumento substancial da produção de etanol e, nesse sentido, estimula a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias que permitem o uso de novas matérias-primas na produção de etanol, como a biomassa lignocelulósica. No entanto a ampliação desta tecnologia é limitante devido ao alto custo das enzimas, indicando desta forma a importância da busca por novas fontes de enzimas capazes de contribuir para este processo. Em face disto, este trabalho teve como objetivo estudar as propriedades lignocelulolíticas de micro-organismos silvestres isolados de diversas regiões brasileiras, bem como realizar um estudo genético visando à produção de bioetanol. Inicialmente foi realizada uma seleção das cepas que apresentaram capacidade de produção de celulasas, a partir de micro-organismos silvestres isolados de diversas regiões do país. Após a seleção, a cepa nomeada AAJ6 foi selecionada como potencial produtor de celulasas e identificada molecularmente como *Acremonium strictum*. Posteriormente, foram realizados estudos de recuperação, purificação e caracterização enzimática das enzimas produzidas pelo micro-organismo em estudo. A precipitação com acetona 60% foi o método que resultou em melhores porcentagens de recuperação, registrando 80,67% de recuperação para as endoglucanases (CMCase), 65% para a atividade de papel de filtro (FPase) e 25% para celobiase. Em relação à purificação, a resina Q-Sepharose foi selecionada como mais eficiente para a purificação das enzimas do complexo celulase produzidas por *Acremonium strictum*. Quanto à caracterização enzimática, as faixas de temperatura e pH estudadas não tiveram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à atividade de endoglucanase (CMCase). Já para a atividade de FPase e celobiase, a faixa temperatura ótima foi de 54 a 57 °C e o pH ótimo foi de 4,7. Para a β -glicosidase, apenas a temperatura foi significativa, favorecendo temperaturas mais elevadas (54 a 57 °C) para a atividade enzimática.

Paralelamente conduziram-se fermentações para produção de celulases empregando diferentes substratos, tanto substratos comerciais (carboximetilcelulose, SERVACEL® e AVICEL®) como bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com diferentes intensidades. O bagaço de cana submetido a um pré-tratamento leve (12 kgf/cm²; 188,5°C) foi o que melhor induziu o micro-organismo em estudo a produzir as maiores atividades celulolíticas em comparação aos demais substratos estudados, registrando valores máximos de CMCase de 134,42 U/L em 240 horas de fermentação, 10,82 U/L de FPase em 192 horas, 27,72 U/L de celobiase em 96 horas e 3,48 U/L de β-glicosidase em 240 horas. Com o avanço da biotecnologia e da biologia molecular, a identificação de genes presentes num determinado micro-organismo já se tornou essencial. Em face disto, foi realizado o sequenciamento 454 do genoma do *Acremonium strictum* e dois genes de celulases foram identificados, sendo um gene de endoglucanase da família 74a e um gene de β-glicosidase. Estas enzimas foram isoladas, sequenciadas e clonadas em *E.coli* através do vetor pGEM-T Easy de forma que futuros trabalhos possam abordar os produtos de expressão destas enzimas em *Saccharomyces cerevisiae* visando à produção de bioetanol de segunda geração.

Palavras-chave: seleção de micro-organismos, *Acremonium strictum*, celulases, genes, bioetanol.

ABSTRACT

Ethanol has increasingly attracted the attention of researchers, companies and governments due to the increase in oil prices and prospects of depletion of nonrenewable fossil fuels, as well as environmental concerns related to emissions of substances that compromise the environment. Excessively ambitious goals for the increased consumption of ethanol in the for the years ahead requires a substantial increase in ethanol production and, accordingly, encourages research and development of technologies that allow the use of new raw materials for ethanol production, such as lignocellulosic biomass. However the expansion of this technology is limited due to the high cost of enzymes, thus indicating the importance of searching for new sources of enzymes able to contribute to this process. In the face of this, the present work intended to study the lignocellulolytic properties of wild microorganisms isolated from various regions of Brazil as well as conducting a genetic study aimed at producing bioethanol. Initially a selection of strains that were capable of producing cellulases was carried out. Then, the the selected strain, named AAJ6 and molecularly identified as *Acremonium strictum*, was shown to be a potential producer of cellulases. Subsequently, studies were performed for recovery, purification and characterization of the enzymes produced by this microorganism. Precipitation with 60% acetone was the method that led to improved recovery percentages, about 80%, for the endoglucanases (CMCase), 65% for filter paper activity (FPase) and 25% for cellobiase. With regard to purification, chromatographic column with Q-Sepharose resin was selected as the most efficient for the purification of the cellulase enzyme complex produced by *Acremonium strictum*. As enzymatic characterization, the temperature and pH ranges studied did not differ significantly ($p < 0.05$) compared to the activity of endoglucanase (CMCase). As for the cellobiase and FPase activity, the optimum temperature range was 54 to 57 °C and optimum pH was 4.7. For the β -glucosidase, only temperature was significant, favoring higher temperatures (54 to 57 °C) for enzyme activity. Parallel fermentations were conducted for cellulase production using different cellulosic substrates (carboxymethylcellulose, SERVACEL® and AVICEL®) and sugarcane bagasse pretreated with different intensities. Bagasse that underwent t mild pretreatment (12 kgf/cm², 188.5

°C) was the best inducer for microorganism under study, and led to the highest cellulolytic activities, being the maximum values 134.42 U/L for CMCase after 240 hours of fermentation, 10.82 U/L for FPase after 192 hours, 27.72 U/L for cellobiase after 96 hours and 3.48 U/L for β -glucosidase after 240 hours. At the current stage of biotechnology and molecular biology, the identification of genes present in a given micro-organism has become essential. In view of this, the 454 sequencing of the genome of *Acremonium strictum* was carried out and two cellulase genes were identified, being an endoglucanase of the family 74a gene and β -glucosidase gene. These enzymes were isolated, sequenced and cloned into *E. coli* using the pGEM-T Easy vector so that future work can address the expression products of these enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* in order to produce second generation bioethanol.

Key words: screening of microorganisms, *Acremonium strictum*, cellulases, genes, bioethanol.

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

E

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A combinação das variações do preço do barril de petróleo, as perspectivas de esgotamento das fontes não-renováveis, o risco geopolítico decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis e a preocupação com o meio ambiente, resulta na ampliação, em termos globais, da procura por fontes alternativas de energia. Assim, o biodiesel, a célula combustível de hidrogênio e, principalmente, o etanol, passaram a constar de forma definitiva na agenda dos governos e das políticas de praticamente todos os países (Bastos, 2007; Soccol *et al.*, 2010).

O etanol, ou álcool etílico (C_2H_5OH) é produzido desde os tempos antigos pela fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais (cereais, beterraba e cana). Ainda hoje, boa parte da produção de etanol industrial é produzido por meio da fermentação, embora também haja processos químicos que utilizam como substrato o eteno (derivado do petróleo). Recentemente foi criado um novo conceito de etanol (bioetanol de 2ª geração), correspondendo ao etanol celulósico, que utiliza como matéria-prima a biomassa lignocelulósica para a sua fabricação. Essas matérias-primas provenientes de sobras e resíduos de produtos naturais (como o sabugo e a palha do milho, o bagaço, as pontas e as palhas da cana-de-açúcar) emergem como alternativas fundamentais para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol. Já que hoje esse incremento da produção esbarraria em limitações para expansão da área plantada, seja por competir com a produção de alimentos, seja pelo nível de seus preços relativos frente ao petróleo e aos próprios alimentos (Bastos, 2007).

As matérias-primas de origem lignocelulósica, contêm de 30 a 60% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 10 a 20% de lignina. A celulose e a hemicelulose podem ser totalmente convertida em glicose, por ação enzimática (celulases e hemicelulases). A glicose liberada pode ser utilizada para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse (Castro e Pereira, 2010).

A produção de bioetanol com base na biomassa lignocelulósica, tem como 1ª fase à quebra de moléculas de celulose e liberação de açúcares, utilizando processos químicos ou

termoquímicos e/ou enzimáticos, para então produzir o etanol por meio de processos fermentativos. O uso da biotecnologia para converter celulose em etanol abre portas para as empresas que atuam no desenvolvimento de enzimas, em especial, o complexo celulasas (Peixoto, 2006; Soccol *et al.*, 2010).

O complexo celulasas se refere a um conjunto de enzimas que conjuntamente são capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise e liberando açúcares, em especial, moléculas de glicose (Castro e Pereira, 2010).

Um fator limitante para a ampliação da tecnologia de produção do bioetanol é o alto custo das enzimas necessárias para degradação da biomassa lignocelulósica, portanto, a busca por novas fontes de enzimas capazes de contribuir para este processo é de grande interesse industrial (Almeida, 2009; Delabona *et al.*, 2012). Neste contexto, atenção particular deve ser dada à microbiota silvestre existente no território brasileiro, e a implementação de programas, visando seu melhor aproveitamento, já que o conhecimento da microbiota, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes micro-organismos, tornando-se importantes para as interações ambientais e em futuras aplicações biotecnológicas, como a produção de enzimas (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004; Peixoto, 2006).

Observa-se continuamente ao longo dos anos, as contribuições científicas geradas relacionadas ao complexo celulasas, no que tange ao isolamento de micro-organismos produtores de celulasas, ao aumento da expressão de celulasas, à purificação e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose, à clonagem e expressão de genes, à determinação de estruturas tridimensionais das celulasas e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas. No entanto, a fim de se obter complexos enzimáticos capazes de hidrolisar a biomassa vegetal a um custo reduzido é necessário a seleção de cepas que possuem capacidade de expressão elevada e uma diversidade de enzimas celulolíticas com atividade específica elevada.

Em face disto, este trabalho teve como objetivo estudar as propriedades lignocelulolíticas de micro-organismos silvestres isolados de diversas regiões brasileiras,

bem como realizar um estudo genético visando à produção de bioetanol. Para tanto, realizou-se a seleção de micro-organismos silvestres que apresentaram capacidade de produção de celulases a partir do banco de cepas isoladas de diversas regiões brasileiras e armazenado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos - FEA/UNICAMP (Hernalsteens e Maugeri, 2007). O micro-organismo que apresentou maior potencial para produção de celulases foi identificado molecularmente no Laboratório de Genômica e Proteômica (Instituto de Biologia/UNICAMP) juntamente com o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Foram realizados estudos para recuperação, purificação e caracterização das enzimas produzidas, além de estudos visando à produção de celulases a partir de diferentes substratos (comerciais e bagaço de cana pré-tratado com diferentes intensidades). Por fim foi sequenciado o genoma do micro-organismo em estudo para predição dos genes de celulases presentes, que foram identificados, isolados e clonados em *E.coli*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar as propriedades lignocelulolíticas de micro-organismos silvestres isolados de diversas regiões brasileiras, bem como realizar um estudo genético visando à produção de bioetanol de celulose.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar micro-organismos silvestres produtores de celulases, tanto em meio sólido como meio líquido;
- Identificar molecularmente o micro-organismo selecionado como potencial produtor de celulases;
- Estudar diferentes substratos indutores na produção de celulases;
- Determinar o melhor método de recuperação e purificação das enzimas produzidas;
- Caracterizar as enzimas produzidas quanto ao perfil de pH e temperatura ótimos;
- Identificar e isolar genes específicos de celulases presentes no genoma do micro-organismo em estudo;
- Clonar os genes de interesse em *Escherichia coli*.

1.3 ETAPAS REALIZADAS

Para que tais objetivos fossem alcançados, o presente trabalho foi desenvolvido de acordo com as etapas descritas a seguir:

ETAPA 1: Seleção e Identificação de Micro-organismos Produtores de Celulases

Nesta etapa realizou-se o estudo de seleção de micro-organismos silvestres isolados de diferentes regiões brasileiras para a produção de celulases. Inicialmente realizou-se uma seleção em meio sólido seguida por uma seleção em meio líquido. O micro-organismo que apresentou maiores atividades enzimáticas foi selecionado como potencial produtor de celulases e identificado molecularmente quanto ao gênero e espécie.

Os resultados alcançados nesta etapa estão descritos no Capítulo 2: “Screening and Identification of Cellulase Producing Yeast-Like Microorganisms from Brazilian Biomes”.

ETAPA 2: Caracterização, Recuperação e Purificação das Enzimas

Após a seleção do micro-organismo, foram realizados estudos de caracterização, precipitação, concentração e purificação de celulases produzidas pelo micro-organismo silvestre *Acremonium strictum*, identificado no capítulo anterior. Determinado o melhor método de recuperação, as enzimas foram caracterizadas quanto ao seu perfil de pH e temperatura ótimos. As enzimas presentes no caldo fermentado foram também purificadas por cromatografia de troca iônica em FPLC, e posteriormente foram identificados os peptídeos presentes através de espectrometria de massas.

Os resultados obtidos nesta etapa foram relatados no Capítulo 3: “Characterization and Purification of Cellulases Produced by *Acremonium strictum* Isolated from Brazilian Biome”.

ETAPA 3: Estudo da Produção de Celulases Empregando Diferentes Substratos

A produção de enzimas celulolíticas pelo micro-organismo *Acremonium strictum* isolado do bioma brasileiro a partir de diferentes substratos foram estudadas nesta etapa. Inicialmente foram conduzidas fermentações empregando substratos comerciais, como celulose microcristalina de diferentes marcas (AVICEL® e SERVACEL®) e carboximetilcelulose (CMC). Posteriormente, foram realizadas fermentações empregando bagaço de cana pré-tratados com diferentes intensidades. Definido o melhor indutor de celulases, foi realizado um delineamento de Plackett & Burman para otimizar a produção de celulases por *Acremonium strictum*.

Os resultados desta etapa estão reportados no Capítulo 4: “Cellulase Production from a New Strain *Acremonium strictum* Isolated from Brazilian Biome Using Different Substrates”.

ETAPA 4: Estudo Genético: Identificação e Clonagem de Genes de Celulases

Por fim, foi realizado o estudo da identificação, isolamento e clonagem de genes de celulases presentes no genoma do micro-organismo silvestre *Acremonium strictum* isolado do bioma brasileiro. O genoma do micro-organismo em estudo foi sequenciado através do sequenciamento 454 (pirosequenciamento) e 2 genes foram preditos, sendo eles: um gene de endoglucanase da família 74a e um gene de β -glicosidade. Estes genes foram isolados a partir do cDNA do micro-organismo e clonados em *E. coli* através do vetor pGEM-T Easy.

Os resultados encontrados nesta etapa podem ser visualizados no Capítulo 5: “Identificação, Isolamento e Clonagem de Genes de Celulases de *Acremonium strictum* em *Escherichia coli*”.

1.4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.4.1 Microbiota Silvestre Brasileira

Os micro-organismos estão presentes em toda biosfera, são capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Sua presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas, além disso, os micro-organismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável (Rodrigues, 2008).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do Planeta onde abriga 7 biomas, 49 ecorregiões já classificadas, e incalculáveis ecossistemas. O Brasil tem uma área de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, possuindo várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido, o semi-árido e áreas temperadas. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas (biomas). A variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileira, tornando-as as mais diversas do mundo (Hernalsteens, 2006).

Devido à grande biodiversidade brasileira, as espécies pertencentes à fauna e flora talvez não venham a ser conhecidas em sua totalidade, sabendo-se, entretanto, que o número de espécies ainda não identificadas pode alcançar a ordem de dezena de milhões. Neste contexto é fundamental a implementação de programas na busca de um melhor aproveitamento da biodiversidade brasileira. Atualmente, há um grande interesse em encontrar espécies de micro-organismos ainda não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria em geral e à de alimentos em particular, bem como otimizar processos de produção desses insumos a partir de micro-organismos já conhecidos (Hernalsteens, 2006; Goldbeck, 2008).

Estudos estimam que menos de 5% dos micro-organismos existentes na Terra, tenham sido descritos. Isso porque os esforços dos centros de pesquisa estão focados principalmente nos macro-organismos (mamíferos, répteis, anfíbios, aves, peixes e plantas), resultando no conhecimento de 80 a 90% destes seres. No entanto os micro-organismos, mesmo exercendo funções vitais nos ecossistemas e na biosfera em geral foram pouco

estudados, tanto devido à falta de interesse, quanto à dificuldade na pesquisa destes seres invisíveis a olho nu (Hernalsteens, 2006).

No contexto da variabilidade ecológica, atenção particular deve ser dada à microbiota silvestre residente no território brasileiro, que pode ser de grande interesse à indústria alimentícia, farmacêutica e química. A capacidade produtora de insumos pode substituir processos químicos por processos biológicos. Como exemplo, cita-se a substituição de hidrólises ácidas por enzimáticas, por meio de enzimas microbianas (Peixoto, 2006).

1.4.2 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o principal recurso renovável disponível no ambiente. É composta por microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz de polissacarídeos. Essa matriz é composta por dois tipos de polissacarídeos, chamados hemiceluloses e pectina, e uma pequena quantidade de proteínas estruturais e lignina (Taiz e Zeiger, 2004; Sánchez e Cardona, 2008).

As hemiceluloses, também chamadas de glicanas de ligação cruzada, fazem ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose envolvendo-as em uma rede. Os polímeros de carboidrato que fazem parte das hemiceluloses são compostos principalmente pelos açúcares D-glicose, D-manose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose e D-ácido glicurônico (Rowell *et al.*, 2005).

A lignina é um composto formado por fenilpropanóides depositado durante a maturação da parede celular. Este composto faz ligações cruzadas com os polissacarídeos da parede auxiliando no seu empacotamento. O complexo formado por lignina, celulose e hemicelulose é denominado de lignocelulose (Buchanan *et al.*, 2004).

A celulose é o composto mais abundante nos lignocelulósicos, sendo um polímero linear formado exclusivamente por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ conforme pode ser visualizado na Figura 1.1. Estudos de dispersão de luz determinaram o peso molecular da celulose, indicando que a celulose possui um grau de polimerização médio de 9000 – 10000, podendo em alguns casos atingir números muito

maiores do que este. Moléculas de celulose são orientadas ao acaso e têm a tendência de formar ligações de hidrogênio inter e intramolecular (Rowell *et al.*, 2005). Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem que ela tem uma subestrutura constituída de domínios altamente cristalinos unidos por ligações amorfas (Taiz e Zeiger, 2004).

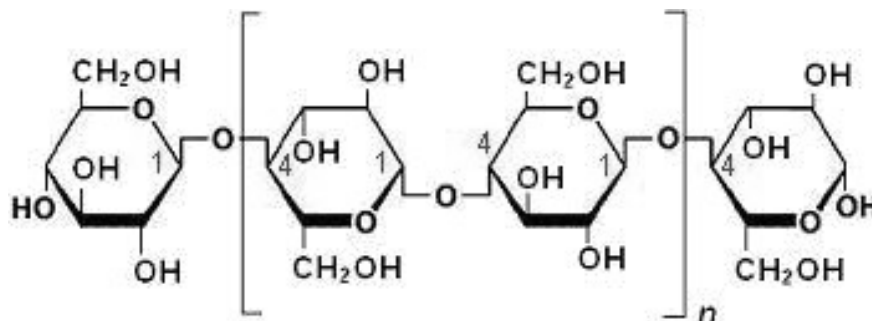


Figura 1.1. Estrutura da celulose.

A celulose é o produto primário da fotossíntese no meio ambiente terrestre, e é o mais abundante biorecurso renovável produzido na biosfera (aproximadamente 100 bilhões de toneladas secas ao ano) e pode ser hidrolisada com ácidos e converter-se em glicose. Já a biodegradação da celulose se dá pelas celulasas produzidas por diversos microorganismos, e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem (Zhang *et al.*, 2006).

A celulose merece um destaque especial entre os materiais carboníferos utilizados industrialmente por duas razões: primeiro porque pertence a uma classe de produtos naturais e depois, se utilizados de forma consciente, se transforma numa fonte inesgotável, pois é regularmente regenerado pela natureza em curto espaço de tempo. A cada ano a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas de gás carbônico e água em celulose e outros produtos vegetais (Peixoto, 2006).

A celulose não pode ser usada pela maioria dos animais como fonte de energia porque lhes falta uma enzima que hidrolise as ligações $\beta(1-4)$. Os únicos vertebrados que conseguem utilizar a celulose como alimento são os ruminantes (bovinos, ovelhas, cabras,

camelos e girafas), já que são animais que possuem um estômago (rúmen) que contém protistas e bactérias que secretam celulase (Sanderma e Schmidt, 1973; Peixoto, 2006).

1.4.3 Celulases

Celulases são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia, promovendo a hidrólise de materiais celulósicos e a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol. O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo celulase (Castro e Pereira, 2010).

A maioria dos estudos do complexo celulase refere-se a enzimas microbianas devido ao potencial de converter material celulósico insolúvel em glicose (Zhang *et al.*, 2006). Os sistemas de celulases mais eficientes não são secretados e encontrados livres no meio e sim são encontrados acoplados às superfícies de micro-organismos anaeróbios em estruturas macromoleculares chamadas celulosomos. Essas estruturas são constituídas por enzimas hidrolíticas assim como proteínas estruturais, que ancoram o celulosomo fora da célula de forma complexa e dinâmica que auxilia a interação sinérgica entre as enzimas. Entretanto, celulases livres podem ser produzidas por fungos e bactérias aeróbicos. Apesar das enzimas bacterianas serem mais eficientes, as enzimas fúngicas como as de *Trichoderma reesei* dominam as aplicações industriais devido ao seu alto nível de expressão e secreção. Investimentos têm sido realizados visando o desenvolvimento de coquetéis de celulases especializadas e de baixo custo (Chang, 2007).

Para a degradação completa da celulose são necessárias as atuações sinérgicas de quatro tipos de celulases:

1) Endo- β (1-4)glucanases ou CMCases (E.C.3.2.1.4): hidrolisam ligações β (1-4) ao acaso dentro da cadeia de celulose amorfa ou solúvel (carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose) liberando glicose, celobiose e celodextrinas (Lynd *et al.*, 2002). A atividade das endoglucanases é caracterizada por hidrólise aleatória de ligações β -glicosídicas, resultando em uma rápida diminuição da viscosidade, acompanhada da taxa de aumento de grupos redutores.

2) Exo- β (1-4)glucanases ou Celobiohidrolases ou Avicelases (E.C.3.2.1.91): hidrolisam as ligações glicosídicas da celulose a partir da extremidade não redutora liberando celobiose. A atividade das exoglucanase é caracterizada por degradar celulose amorfa e quando puras podem degradar Avicel (celulose microcristalina insolúvel), porém o mesmo não acontece com o algodão. Exoglucanases e endoglucanases atuam sinergisticamente para degradação completa da celulose cristalina, sendo a primeira mais eficiente na redução da viscosidade.

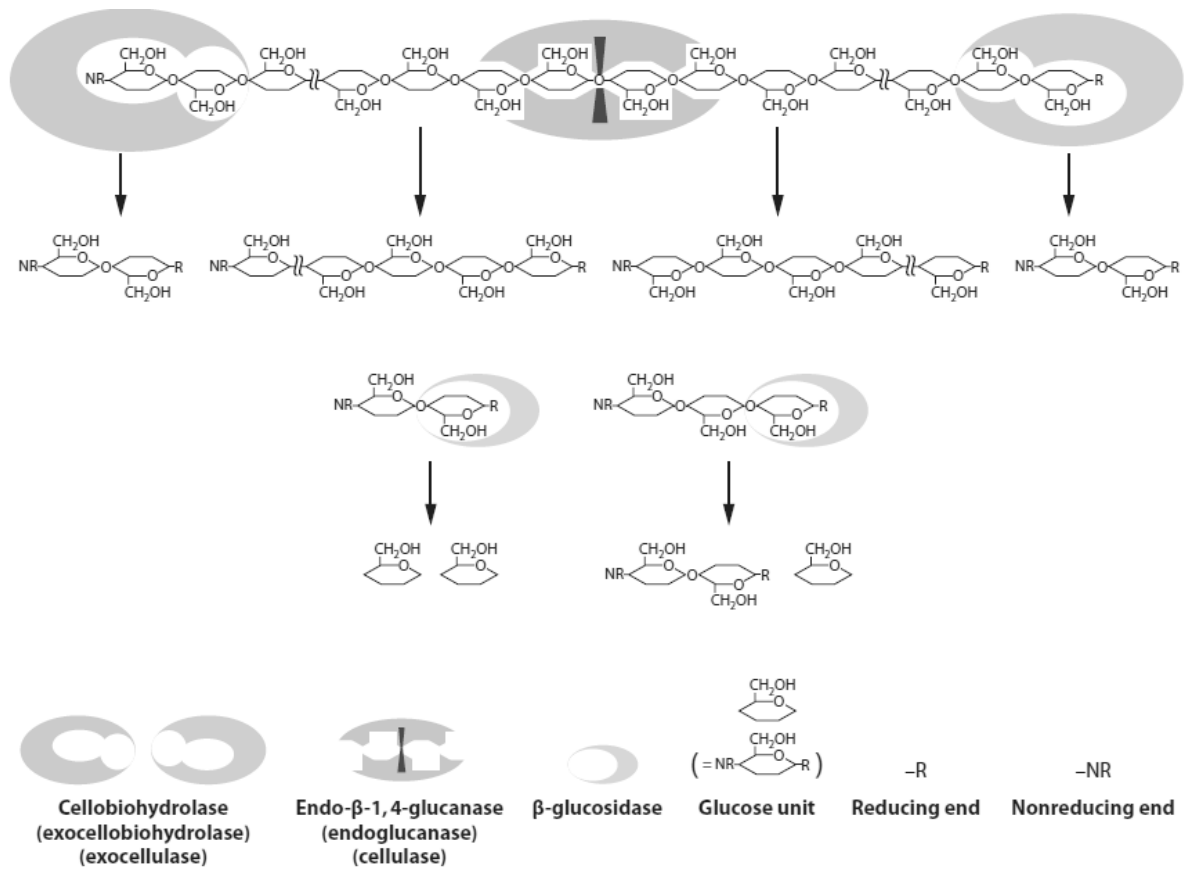
3) β (1-4)D-glucana-glucano-hidrolases ou exoglicohidrolases (E.C.3.2.1.74): hidrolisam as ligações β (1-4) glicosídicas de celodextrinas liberando glicose diretamente do polímero. A atividade diminui proporcionalmente com a diminuição da cadeia do substrato.

4) β (1-4)glicosidases ou celobiasas (E.C.3.2.1.21): hidrolisam as ligações do tipo β (1-4) de celobiose, trealose, gentiobiose liberando glicose. Ao contrário das exoglicohidrolases, a taxa de hidrólise das celobiasas aumenta proporcionalmente com a diminuição do tamanho da molécula do substrato. As β -glicosidases e as exoglicohidrolases têm em comum os substratos de cadeia de glicose de 2 a 6 unidades, mas podem ser distinguida com base nas suas atividades relativas sobre os dois substratos celobiose e celohexose. As β -glicosidases hidrolisam muito mais rapidamente a celobiose do que as celobiohexoses, enquanto o oposto ocorre com as exoglicohidrolases (Whitaker, 1994).

A ação das celulases em determinado substrato depende, preponderantemente, da origem do substrato e da composição ou, ainda, de pré-tratamentos químicos ou físicos em ação sinérgica com outras classes de enzimas como xilanases, pectinases, peroxidases, lactases, fenoloxidasas, dentre outros (Zhang *et al.*, 2006).

As β -glicosidases têm papel fundamental para a degradação de materiais lignocelulósicos. A celobiose, principal substrato para a β -glicosidase é um potente inibidor de exocelulases, portanto a ausência dessa enzima diminui o potencial do processo de sacarificação de biomassas. Han e Chen (2008) mostraram que a adição de β -glicosidases de sabugo de milho durante a sacarificação e fermentação desta mesma biomassa diminuiu a concentração de celulose em 28% e a produção de etanol aumentou cerca de 22%.

O mecanismo de biodegradação das celulasas pode ser visualizado através da Figura 1.2. As celobiohidrolases agem sobre os terminais não redutores das fibras de celulose liberando celobiose. As Endo- β -(1-4)-glucanases clivam a cadeias de celulose aleatoriamente. Enquanto que as β -glicosidases hidrolisam celobiose ou celo-oligômeros liberando glicose a partir das extremidades não redutoras (Watanabe and Tokuda, 2010).



Fonte: (Watanabe and Tokuda, 2010).

Figura 1.2. Mecanismo de biodegradação da celulose.

As enzimas do complexo celulolítico, quando atuam conjuntamente, apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras (Castro e Pereira, 2010).

1.4.4 Micro-organismos Produtores de Celulases

A decomposição da celulose no solo ocorre por ação de celulases produzidas por uma vasta e diversa população fúngica, sendo os principais representantes dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium* e *Phoma*, e bactérias aeróbias: *Acidothermus*, *Bacillus*, *Celvibrio*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, e anaeróbias: *Acetovibrio*, *Bacteróides*, *Butyrivibrio*, *Caldocellum*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Pseudonocardia*, *Ruminococcus* e *Thermoanaerobacter* (Zhang *et al.*, 2006).

Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulases, no entanto, apenas algumas cepas são conhecidas como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar extensivamente a celulose natural até açúcares solúveis. Embora muitos fungos e bactérias degradem a celulose, os produtos obtidos devido ao crescimento microbiano em meios contendo este carboidrato são, de um modo geral, o gás carbônico e o metano (Ruegger e Tauk-tornisielo, 2004).

No entanto muitos trabalhos e métodos oficiais para determinação da atividade celulolítica utiliza como substratos fontes não naturais, como carboximetilcelulose (CMC), papel de filtro entre outros. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (Ruegger e Tauk-tornisielo, 2004). Assim, o rápido crescimento e decomposição da celulose ou a produção de altos níveis de enzima que degradem a celulose solúvel não são critérios adequado para a seleção de micro-organismos que venham a ser usados como fonte de uma enzima extracelular estável ou que sirva de preparação para uso em sacarificação da celulose (Kang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

Não há medida absoluta que possa ser avaliada para uma única enzima agindo sobre um substrato solúvel. Quanto mais resistente o substrato e maior o tempo de exposição da enzima, maior a diferença entre a capacidade produtiva de celulases completas e incompletas. Um estudo da capacidade produtiva de celulases depende, contudo, da escolha do substrato, sua concentração e a extensão da conversão. Experimentos com utilização de

papel de filtro têm sido largamente utilizados por serem considerados simples e de fácil reprodutibilidade (Ogawa *et al.*, 1982; Stamford *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). Nestes experimentos, a sacarificação da celulose prediz a ação da enzima na conversão extensiva da celulose concentrada a partir de uma experiência razoavelmente curta, baseada na conversão limitada de uma quantidade de substrato diminuída.

Fungos, de um modo geral, são vigorosos produtores de ácidos em meios contendo carboidratos associados a amônio (NH_4^+) como fonte de nitrogênio. A taxa de produção de ácido está diretamente relacionada à taxa de consumo de carboidrato. Quando esgotado o carboidrato do meio, há formação de ácido e conseqüente queda de pH (Kang *et al.*, 2004).

As celulases produzidas por fungos filamentosos, de forma geral, apresentam valores de pH ótimos na faixa ácida (3,6-5,0), já as bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos. Em relação a temperatura ótima de atuação destas enzimas, encontra-se em sua maioria acima de 40 °C (Castro e Pereira, 2010).

A celulase de origem fúngica é produzida quando o micro-organismo é inoculado em meios de culturas que contenham celulose, sefaroze (polissacarídeo bastante utilizado na produção de resinas para purificação de proteínas), lactose ou celobiose como fonte de carbono. A glicose, utilizada como fonte de carbono, não serve como indutora da produção de celulases e, ainda, reprime fortemente a produção dessa enzima mesmo na presença de indutores (Nisizawa *et al.*, 1972).

Peixoto (2006) selecionou leveduras silvestres de diversas regiões brasileiras com potencial para produção de celulases. Para os testes de atividade de celulase foram utilizados 3 tipos diferentes de substratos: carboximetilcelulose (CMC), celobiose e papel filtro. As leveduras AQ6 e AS03 foram as que produziram maior atividade de CMCase entre as cepas estudadas. A mesma cepa AQ6 também apresentou a maior atividade de celobiase dentre as leveduras testadas. E em relação à atividade de FPase, 3 cepas se destacaram por apresentarem as maiores atividades (AP2, AQ3 e AY7). De modo geral, as atividades enzimáticas registradas foram reduzidas em comparação com micro-organismos já estudados com maior profundidade, como os fungos filamentosos. Porém o que se pode ressaltar é o fato da existência de cepas de leveduras, sob determinadas condições, capazes de produzir enzimas de grande interesse biotecnológico como as celulases.

Trichoderma reesei é o micro-organismo mais estudado e o fungo celulolítico de maior importância industrial. Ele produz pelo menos seis enzimas geneticamente diferentes: duas celobiohidrolases (Cel 7A e Cel 6A, também conhecidas como CBH I e CBH II e quatro endoglucanases (Cel 7B, Cel 5B, Cel 2A, Cel 45A, também chamadas de EG I, II, III e V) (Qin *et al.*, 2008).

Na produção de celulasas um fator chave é a hidrólise do material celulósico e para isso é essencial tornar esta etapa economicamente viável para que a tecnologia de bioconversão seja aplicada em escala industrial (Rodrigues *et al.*, 2012). Entre os fungos celulolíticos, *Trichoderma* e *Aspergillus* tem sido intensivamente estudados em virtude da sua alta habilidade de secretar enzimas que degradam a celulose, e suas enzimas são utilizadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica (Zhou *et al.*, 2008).

Várias composições enzimáticas produzidas e secretadas por fungos filamentosos e outros micro-organismos tem efeitos muito diferentes sobre a despolimerização da biomassa lignocelulósica. O *Trichoderma reesei* produz grandes quantidades de exo e endoglucosidases, mas pouca atividade de β -glicosidase, enquanto o *Aspergillus niger* secreta grandes quantidades de β -glicosidases, embora suas atividades de celulasas sejam um pouco limitadas. Até o momento, um micro-organismo natural que produz uma preparação enzimática ideal para hidrólise de biomassa ainda não foi descoberto. Portanto, preparados hidrolíticos com baixas ou inadequadas atividades enzimáticas devem ser suplementados com enzimas nativas ou enzimas recombinantes para uso em aplicações biotecnológicas (Maeda *et al.*, 2011).

Outro fungo estudado na produção de celulasas é *Acremonium cellulolyticus* que foi isolado em 1982 do solo do nordeste do Japão (Hideno *et al.*, 2011). A cepa silvestre de *A. cellulolyticus* Y-94 secreta uma grande quantidade de β -glicosidase e FPase (atividade em filtro de papel), apresentando valores similares aos encontrados por *Trichoderma reesei* QM9414 (Fang *et al.*, 2009).

1.4.5 Gênero *Acremonium*

O gênero *Acremonium* consiste de aproximadamente 100 espécies distribuídas mundialmente (Kirk *et al.*, 2001). Este gênero é encontrado em nichos diversos, como solo, patógeno humano, patógeno de insetos e endofíticos (Domsch *et al.*, 2007).

Acremonium zeae, também denominado *Acremonium strictum*, *Cephalosporium sp.* ou *Cephalosporium acremonium*, juntamente com o *Fusarium verticillioides* são colonizadores de milho (*Zea mays*) recém colhidos. A infecção por este fungo é assintomática e normalmente ocorre no embrião e no endosperma. Estudos demonstraram que *Acremonium zeae* pode atuar como um protetor para o milho devido à produção do antibiótico pirrocidina que inibe o crescimento do fungo *Aspergillus flavus* e consequentemente da aflatoxina produzida por este fungo. A presença do fungo endofítico representa uma defesa imediata contra ataques de patógenos à semente e à plântula (Wicklowsky *et al.*, 2005). Além da pirrocidina, a produção do antibiótico cephalosporina C já foi estudada e atualmente o fungo é utilizado para produção deste antibiótico (Weil *et al.*, 1995; Cabri, 2009).

Algumas espécies de *Acremonium* também foram estudadas visando a produção de celulasas e hemicelulasas. O fungo *Acremonium cellulolyticus* produz celobiohidrolase, β -glicosidade, endoglucanase e xilanase. O meio de cultura para produção de celulasas foi otimizado e o sobrenadante da cultura apresentou maior rendimento na sacarificação de lascas de madeira e resíduos de papel, comparado com enzimas comerciais provenientes de *Trichoderma sp.* Este maior rendimento foi atribuído à presença de β -glicosidases na cultura de *Acremonium*, já que esta enzima degrada um inibidor da celobiohidrolase (Ikeda *et al.*, 2007).

Diversas espécies de *Acremonium*, incluindo *Acremonium persicinum* e *Cephalosporium Acremonium*, foram explorados quanto à produção de β -glucanases e β -glicosidases (McDougall e Seviour, 2002).

Almeida (2009) estudou a produção de celulasas e hemicelulasas de espécies de *Acremonium* endofíticos e concluiu que o bagaço de cana e a palha de milho foram indutores eficientes na produção de xilanases, endoglucanases e FPases a partir de

Acremonium zeae EA0802 e *Acremonium sp.* EA0810. A enzima endoglucanase produzida por *Acremonium sp.* EA0810 apresentou alta atividade enzimática em pH neutro e termoestabilidade, despertando promissora aplicação industrial.

1.4.6 Produção de Celulases

As duas principais estratégias para a produção de celulases por micro-organismos são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS) (Castro e Pereira, 2010).

A fermentação no estado sólido (FES) é definida como uma fermentação realizada na ausência ou quase ausência de água livre. A produção de celulases em FES ganhou grande interesse devido ao baixo custo efetivo da tecnologia e por empregar micro-organismos, na grande maioria fungos com alta capacidade de produção de celulases, que se desenvolvem em condições muito próximas ao ambiente natural (Singhania *et al.*, 2010).

A fermentação no estado sólido (FES) apresenta como vantagens frente à fermentação submersa (FS) menor possibilidade de contaminação, pela ausência de água livre no sistema, menor volume de resíduos líquidos gerado, além de uma produtividade e concentração final de produto maiores, devido o fato que o extrato obtido na maioria das vezes estar de três a quatro vezes menos diluído que na fermentação submersa (Castro e Pereira, 2010).

Já a fermentação submersa (FS) é definida como uma fermentação realizada em excesso de água, ou seja, em meio aquoso, empregada na produção de celulases por bactérias e actinomicetos (Singhania *et al.*, 2010). A fermentação submersa apresenta como vantagem a facilidade de purificação das enzimas produzidas, devido a baixa concentração de partículas de substrato no meio, quando comparada com a fermentação no estado sólido. Outra vantagem do alto teor de água no meio é a facilitação do controle da temperatura de cultivo, reduzindo a degradação do produto pela elavação da temperatura, em especial, enzimas com baixa termoestabilidade. Processos difusionais e de mistura são facilitados devido ao caráter homogêneo do sistema e tecnologias de monitoramento de variáveis *on line* mais amplamente disponíveis (Castro e Pereira, 2010).

Indubitavelmente, um dos parâmetros mais exaltados na diferenciação desses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional. Na FES há ausência ou quase ausência de água livre (Pandey, 2003). A água presente nesses sistemas (FES) encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada adsorvida pela superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30-85% e a atividade de água típica vai de 0,40-0,90, mimetizando condições encontradas na natureza e permitindo até que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação é pouco provável (Robinson e Nigam, 2003).

A água possui diversas funções em um bioprocessos, tais como, a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, bem como a remoção de metabólitos, a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas como proteínas, nucleotídeos e carboidratos, a estabilidade da estrutura lamelar e a conservação da permeabilidade da membrana plasmática. Em relação ao cultivo de fungos filamentosos, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, ocasionando um desequilíbrio nas vias, afetar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimação celular (Gervais e Molin, 2003).

A produção de celulasas é altamente influenciada por vários parâmetros, dentre eles, a natureza do substrato celulósico, o pH do meio de cultivo, temperatura da fermentação, disponibilidade de água e nutrientes, suplementação de indutores, entre outros (Singhania *et al.*, 2010).

De forma geral, na maior parte dos trabalhos reportados na literatura, os materiais utilizados para a produção de celulasas são de origem lignocelulósica ou celulósica pura. Entretanto, o efeito indutor de espécies de menores massas moleculares tem sido rastreado há muito tempo. Mandels e colaboradores (1962) compararam o efeito de diversos oligo e polissacarídeos na indução de celulasas de *T. viride*, expressas por suas atividades em CMC, obtendo como os de maior potencial: lactose, nigerose, lichenana, glucana de cevada, e principalmente sofrorose, que apresentou um poder indutor cerca de 2500 vezes maior que o observado anteriormente utilizando-se celobiose (Mandels *et al.*, 1962; Castro

e Pereira, 2010). Este forte poder indutor da sofrose tem sido reafirmado por alguns autores sendo, por isso, alvo de muitos estudos.

Nesta mesma linha de trabalho, estudos com diferentes cepas de *T. reesei*, demonstraram que a utilização de L-sorbose na indução da produção de endoglucanase, levou a níveis de expressão ainda maiores que os observados para a sofrose na linhagem *T. reesei* PC-3-7, porém atividades inferiores na linhagem QM 9414 (Nogawa *et al.*, 2001). Por fim, outro trabalho que utilizou a mesma linhagem *T. reesei* PC-3-7, comprovou a supremacia da sofrose em induzir a produção de endoglucanases, quando comparada ao dissacarídeo lactose, no entanto, quando se adicionou celobiose juntamente à lactose, os autores observaram um efeito indutor claramente sinérgico que proporcionou produção enzimática cerca de cinco vezes maior que a observada quando sofrose foi utilizada (Morikawa *et al.*, 1995).

Castro (2006) comparou a produção de endoglucanases e β -glicosidases por *Trichoderma reesei* e *Hemicola grisea*, quando cultivadas em substratos insolúveis (celulignina de bagaço de cana-de-açúcar e celulose microcristalina Avicel) e solúveis (carboximetilcelulose e celobiose). Foram observadas taxas menores de produção das enzimas quando fontes insolúveis foram utilizadas, especialmente a de origem lignocelulósica, devido a um período inicial de aclimação das células a essa matéria-prima. Já quando carboximetilcelulose (CMC) e celobiose foram consideradas, os tempos correspondentes à produção enzimática máxima foram antecipados em cerca de 50 h. Ainda, nesse estudo pôde-se concluir que na síntese das enzimas do complexo celulolítico pelos fungos *T. reesei* Rut C30 e *Hemicola grisea* var. *thermoidea*, não há correlação direta com a fonte de carbono utilizada para a indução, visto que mesmo quando as linhagens foram cultivadas na presença apenas de celobiose como substrato, endoglucanases e exoglucanases também foram excretadas pelas células, e que essa síntese não se enquadrava em caráter constitutivo.

1.4.7 Principais Aplicações das Celulases

A demanda por celulases está constantemente em ascensão devido suas diversas aplicações. Existem várias empresas envolvidas na produção de celulases, como indústrias têxteis, indústrias de detergentes, indústrias de papel, entre outras. Mundialmente, as duas grandes companhias, *Genencor* e *Novozyme* estão na disputa da liderança da produção de celulases visando à conversão de biomassa lignocelulósica. Ambas as empresas tem desempenhado um papel significativo em reduzir o custo da produção de celulases devido sua pesquisa ativa e continuam a reduzir o custo por adotarem tecnologias inovadoras (Singhania *et al.*, 2010).

A produção de celulases em escala industrial teve início em meados da década de 80, sendo utilizada como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Logo, essas enzimas começaram a ser utilizadas na indústria de alimentos, com o objetivo de melhorar propriedades sensoriais de massas. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas indústrias têxteis (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose, amaciamento e desbotamento do brim) e de polpa e papel (modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa) e também em lavanderias (aumento do brilho, remoção de sujeiras e maciez dos tecidos) (Castro e Pereira, 2010).

Já na década de 90, as celulases, juntamente com as hemicelulases, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas. Considerando importações e exportações brasileiras, as celulases movimentaram um montante de USD 1,35 milhão (Olofsson *et al.*, 2008).

Os tecidos jeans e brim alcançaram uma popularidade marcante durante as últimas décadas. Na década de 70 e 80 as indústrias desenvolveram a técnica de lavagem do tecido com pedra pomes para conferir ao jeans maciez proporcionando maior conforto aos consumidores. Esta técnica, chamada *stone-washing*, apesar de ser eficiente para os objetivos almejados causa um rápido desgaste das máquinas industriais. Neste contexto, começaram a ser utilizados coquetéis de celulases microbianas, ricos em endoglucanases, em substituição às pedras, processo denominado *bio-stoning* (Almeida, 2009).

Durante o processo de *bio-stoning*, as celulases atuam hidrolisando as pequenas fibras da superfície do tecido, proporcionando a perda do índigo. As vantagens de substituir as pedras pelas enzimas são: redução do desgaste das máquinas; aumento da produtividade das máquinas devido à maior quantidade de tecido tratado em menos tempo, é um processo não poluente e gera efluentes tratáveis e flexibilidade para criar e reproduzir novos produtos (Belghith *et al.*, 2001).

Nas indústrias de papel e celulose, as celulases atuam no branqueamento do papel, auxiliando na separação da lignina da fibra, aumentando a suscetibilidade ao tratamento químico, diminuindo assim, a utilização de cloro durante o tratamento. Devido ao pH alcalino e às altas temperaturas (55 a 70°C) aos quais a polpa é submetida, é necessário que as enzimas utilizadas neste processo sejam resistentes a tais condições (Collins *et al.*, 2005).

Celulases e hemicelulases têm uma ampla aplicação nas indústrias alimentícias. Começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Essas enzimas podem ser utilizadas na extração e clarificação de sucos, melhora na textura, qualidade e vida útil de produtos de padaria, entre outras (Almeida, 2009; Castro e Pereira, 2010).

As β -glicosidases podem ser utilizadas na produção de melhores vinhos. Alguns monoterpenos de uvas contribuem significativamente para o sabor da bebida. Estes compostos estão presentes na forma volátil (ligada glicosidicamente). Esta última fração é composta por dissacarídeos, denominados α -L-arabinofuranosil- β -D-glicopiranosídeo, e por uma fração não glicosídica que pode ser terpenol, terpenodiol, 2-feniletanol ou álcool benzílico. Para a hidrólise deste composto a ligação glicosídica é hidrolisada por α -arabinofuranosidase, α -L-ramnosidase ou β -D-apiosidase e posteriormente uma β -glicosidase libera o monoterpenol, fazendo com que o vinho apresente um aroma e sabor melhorados (Le Clinche *et al.*, 1997).

Atualmente a principal aplicação das enzimas do complexo celulolítico está relacionada à hidrólise de biomassa lignocelulósica. As matérias-primas de origem lignocelulósica contêm de 20 a 60% de celulose, que por ação enzimática, podem ser totalmente convertida em glicose. Esse monossacarídeo pode ser utilizado como peça

fundamental para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse. Desta forma, o conceito de biorrefinarias celulósicas se enquadra à essas tecnologias, visando o aproveitamento integral e integrado dos resíduos agroindustriais gerados em uma determinada cadeia produtiva, de modo a agregar valor à mesma (Castro e Pereira, 2010; Limayem and Ricke, 2012).

1.4.8 Produção de Bioetanol

Um dos maiores desafios do século XXI é atender à grande demanda por energia, principalmente para transporte e processos industriais que utilizam energia proveniente de combustíveis fósseis. A crescente preocupação com a segurança do abastecimento de óleo tem sido evidenciada pelo aumento do preço do petróleo. Mais importante do que estes fatores econômicos é a preocupação de um desenvolvimento sustentável e para isso, o abastecimento de energia futuro deve vir acompanhado de uma substancial redução da emissão de gases do efeito estufa (Almeida, 2009; Soccol *et al.*, 2010; Kuhad *et al.*, 2011).

Dados estes fatores, os biocombustíveis de fontes renováveis, como o etanol, têm sido apontados como solução viável. A produção de etanol, já foi introduzida em escala industrial, principalmente no Brasil e nos Estados Unidos. Este combustível já é comercializado em preços competitivos, além disso, tecnologias como a dos carros bi-combustíveis tendem a aumentar ainda mais a sua utilização (Almeida, 2009; Limayem and Ricke, 2012).

O Programa Nacional do Álcool (Proálcool), criado pelo governo Brasileiro em 1975 resultou menos dependência dos combustíveis fósseis. A adição 25% de etanol na gasolina reduziu a importação de 550 milhões de barris petróleo e também reduziu a emissão de CO₂ em 110 milhões de toneladas. Hoje, 44% da matriz energética brasileira é renovável e 13,5% é derivado de cana (Soccol *et al.*, 2010).

O aumento de consumo de álcool combustível novamente ganhou força com o lançamento da indústria brasileira, em março de 2003, do primeiro veículo bi-combustível (*flex fuel*) movido a álcool e gasolina, puros ou misturados em qualquer proporção (Atala,

2004; Hira e Oliveira, 2009). Atualmente, o Brasil tem mais de 80% de seus veículos rodando com bioetanol e motores de avião, mesmo de pequeno porte, estão agora sendo desenvolvidos para o seu uso. Segundo a Petrobrás Biocombustíveis, a produção de bioetanol do Brasil pode triplicar até 2020, passando dos atuais 27,5 bilhões de litros para 70 bilhões de litros (Soccol *et al.*, 2010).

O álcool etílico ou etanol é uma substância orgânica pertencente à classe dos álcoois primários saturados. Pode ser obtido a partir de hidrocarbonetos como eteno e etino e da hulha (carvão mineral) ou por fermentação de carboidratos pela biomassa (bioetanol). O bioetanol é o gênero que compreende todos os processos de obtenção do etanol em que a matéria-prima é a biomassa, tal como a celulose, a cana-de-açúcar ou o milho, por exemplo (Ethanol Brasil, 2007; Soccol *et al.*, 2010).

As fontes atuais de etanol como cana-de-açúcar e grão de milho apresentam a desvantagem de serem utilizados para alimentação humana e de animais, além de necessitarem de terras férteis e de uso de agrotóxicos para seu cultivo. Neste contexto, a biomassa lignocelulósica apresenta enorme potencial para contribuir com esta tecnologia devido à grande disponibilidade e baixo custo. A produção de etanol a partir de resíduos desta natureza pode aumentar consideravelmente sem, contudo, aumentar a área plantada (Almeida, 2009; Rabelo *et al.*, 2011).

A produção de bioetanol a partir de celulose é o grande destaque nas pesquisas mundiais e brasileiras de biocombustíveis da atualidade. Converter celulose em etanol envolve dois passos fundamentais: a quebra das longas cadeias das moléculas de celulose em açúcares e a fermentação desses açúcares em etanol. Na produção do bioetanol de segunda geração, pré-tratamentos termoquímicos são bastante utilizados para provocar a ruptura da parede celular do tecido vegetal de maneira que o polissacarídeo se exponha à atuação da enzima. Dentre os procedimentos mais utilizados, o tratamento ácido revela-se eficiente, mas resulta em alta concentração de furfural na fase líquida o que pode provocar efeito deletério sobre o micro-organismo utilizado na fermentação (Eggeman e Elander, 2005; Rabelo *et al.*, 2011).

O grande obstáculo na produção de etanol celulósico é que o micro-organismo produtor de álcool não consegue utilizar mais do que 30% do material lignocelulósico.

Como a lignocelulose é formada de 30% a 40% de celulose, 20% a 40% de hemicelulose e 10% a 20% de lignina, e a levedura só consegue metabolizar os produtos da degradação da celulose (hexoses), obtem-se um rendimento de apenas 20% em álcool. No entanto, o processo se tornará mais interessante se a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) conseguir metabolizar também a hemicelulose (pentoses), aumentando o rendimento para quase 60% do material lignocelulósico (Technology Review, 2006; Soccol *et al.*, 2010).

Quanto mais os cientistas forem capazes de manipular geneticamente esses micro-organismos, reduzindo o número de passos no processo de conversão, mais barata ficará a hidrólise enzimática e conseqüentemente mais cedo o etanol de celulose vai se tornar comercialmente competitivo (Technology Review, 2006; Limayem and Ricke, 2012).

Jannuzzi (2003) cita que a utilização de biomassa para a geração de energia é bastante interessante para o Brasil, especialmente na direção de usos com maior conteúdo tecnológico como geração de eletricidade, produção de vapor e combustíveis para transporte. O etanol da cana de açúcar se destaca nesta área, já que a indústria da cana mantém o maior sistema de energia comercial de biomassa no mundo através da produção de etanol e do uso quase total de bagaço para a geração de eletricidade.

A utilização de biocombustíveis diminui os gastos com energia e a emissão de gases tóxicos para a atmosfera, reduzindo em até 80% a emissão de CO₂ (Bastos, 2007). E por ser uma fonte de combustível e/ou energia renovável, o interesse mundial na questão do bioetanol tomou proporções em que o aprofundamento em pesquisas é essencial para a diminuição do consumo de combustíveis fósseis (Jannuzzi, 2003).

Dentre os cultivares destinados à produção de biocombustíveis, destacam-se a cana-de-açúcar e o milho. O rendimento teórico para a produção de etanol a partir da palha de milho seca é de aproximadamente 480 L/t, assumindo que hexoses e pentoses formados a partir da degradação da celulose original são fermentados (Kadam e McMillan, 2003).

Outro exemplo é a indústria madeireira, que gera uma elevada carga de rejeitos que podem ser aproveitados para a produção de etanol. Okuda *et al.* (2007) trabalharam com produção de etanol a partir de rejeitos de madeira hidrolisado quimicamente com ácido sulfúrico, utilizando *Escherichia coli* KO11 em fermentação anaeróbica e produziram aproximadamente 30 g/L de álcool em fermentadores de 5 L com 90% de caldo hidrolisado

e 5% de nutrientes. Após 48 h de fermentação a viabilidade celular foi de 10^8 UFC/mL. O rendimento foi de 0,46 g de etanol/g de açúcar após 24 h de fermentação.

Enquanto os biocombustíveis são acusados de aumentar o preço dos alimentos e oferecer limitados benefícios ambientais, diversas pesquisas se alinham em busca do etanol de celulose, um biocombustível de segunda geração. O grande benefício do etanol elaborado a partir da celulose é que praticamente qualquer elemento vegetal – talos de grãos, serragem, lascas de madeira, plantas nativas perenes crescidas em terras marginais aos cultivos – poderia converter-se em bioetanol, um combustível com baixa emissão de poluentes para o setor do transporte (Ethanol Brasil, 2007; Rabelo *et al.*, 2011).

A produção de etanol a partir da glicose derivada da degradação do amido tem sido dominada pela utilização de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, o açúcar derivado da biomassa é uma mistura de hexoses (essencialmente a glicose) e pentoses (essencialmente a xilose) e muitas cepas selvagens de *S. cerevisiae* não degradam a xilose. Uma saída utilizada é a adição às leveduras de micro-organismos etanologênicos que degradem a xilose ou a manipulação por engenharia genética com mecanismo de expressão gênica de modo que um só micro-organismo degrade tanto as hexoses quanto as pentoses. Para o primeiro caso, pesquisas revelam que é possível a utilização bactérias e leveduras, como a *Zymomonas mobilis* para a degradação da xilose residual (Dien *et al.*, 2003); para o segundo caso, cepas de *S. cerevisiae* têm sido manipuladas geneticamente de maneira que tenham a capacidade de degradar ambos os carboidratos pela adição de genes de *Pichia stipitis* (Jeffries e Jin, 2004).

O foco atual dos estudos relativos à produção do bioetanol está na redução dos custos, tanto da produção dos bioreatores, quanto do processo. Para isso, o pré-tratamento pode representar uma porção significativa na análise de custos, visto que a aplicação de um pré-tratamento adequado facilitará a disponibilização da celulose, aumentando assim a interação enzima-substrato. Desta forma, a compreensão de matérias que denotam a importância e as estratégias de pré-tratamentos é essencial (Eggeman e Elander, 2005; Soccol *et al.*, 2010). Muitas pesquisas também estão sendo desenvolvidas com o intuito de modificar geneticamente os micro-organismos para melhorar a qualidade das celulases

produzidas. Celulases de melhor qualidade resultarão na diminuição de custos na obtenção de bioenergia sustentável (Zhang *et al.*, 2006; Kataria and Ghosh, 2011).

1.4.9 Engenharia Genética

Estudos de engenharia genética e biologia molecular são de extrema relevância para o conhecimento dos genes envolvidos nas rotas de biossíntese, e assim permitir modificações gênicas nos micro-organismos de interesse, com a finalidade de elevar a produtividade do processo fermentativo (Padilha, 2003). Avanços em engenharia genética vem sendo realizados na modificação da levedura convencional *Saccharomyces cerevisiae* visando sua capacitação para fermentar glicose e pentoses simultaneamente (Limayem and Ricke, 2012).

Novas matérias-primas, como a biomassa lignocelulósica, vêm sendo empregadas na produção de etanol. No entanto, os resíduos lignocelulósicos que são abundantes, não são convertidos diretamente em etanol porque são polímeros complexos que a maioria das leveduras não conseguem metabolizar (Technology Review, 2006; Soccol *et al.*, 2010; Limayem and Ricke, 2012).

A grande parte dos investimentos relacionados ao bioetanol de segunda geração está na procura de uma levedura ideal, capaz de realizar além da fermentação em si, a hidrólise da biomassa. Diversos micro-organismos estão sendo estudados através da manipulação do seu DNA para aumentar a produção de enzimas que degradam a celulose (Van Zyl *et al.*, 2007). Faz-se necessário então modificar geneticamente as leveduras existentes, com a remoção de características genéticas indesejadas e o acréscimo de genes (de outro micro-organismo), para que possam degradar os polímeros e reduzi-los a glicose e assim serem absorvidos no processo de fermentação, produzindo o bioetanol (Technology Review, 2006; Limayem and Ricke, 2012).

A expressão das celulases dentro da própria biomassa vegetal também é uma alternativa para facilitar o processo de produção de etanol. Neste sentido foi realizada a expressão de genes codificantes do domínio catalítico da endoglucanase termoestável de *Acidothermus cellulolyticus* em *Arabidopsis* (Del Campillo, 1999). Levando em conta as

seguintes considerações: as enzimas dentro da biomassa devem suportar as condições severas de pH e temperatura necessárias no pré-tratamento, o nível de expressão deve ser suficiente para a hidrólise de toda a biomassa e a produção das enzimas heterólogas não podem causar prejuízos para o desenvolvimento da planta (Lynd *et al.*, 2002).

Com o objetivo de incrementar os níveis de produção de enzimas, diferentes técnicas podem ser utilizadas, dentre as quais as mais comumente aplicadas às celulases são a mutação clássica (aleatória) e a expressão gênica. Em relação à expressão gênica, as formas mais conhecidas de manipulação do conteúdo genético das células são a expressão homóloga e a expressão heteróloga, que se distinguem devido a procedência do material genético inserido na célula hospedeira. Dentre os organismos hospedeiros mais comumente utilizados para a expressão heteróloga de proteínas, estão a bactéria *Escherichia coli* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (Castro e Pereira, 2010).

Já a mutação clássica vem sendo aplicada há décadas sobre linhagens de *Trichoderma reesei* (teleomorfo *Hypocrea jecorina*) gerando diversas linhagens, sendo a linhagem Rut C30 a mais reportada. Esta linhagem teve seu potencial celulolítico incrementado devido à mutação do gene *cre1*, resultando em menor efeito de repressão catabólica da glicose pelas células durante a expressão das enzimas, enquanto que o aumento da quantidade de retículo endoplasmático resultou na elevação das taxas de *O*-glicosilação das proteínas (Castro e Pereira, 2010).

Várias tentativas vêm sendo realizadas para superar os obstáculos encontrados na produção de etanol de celulose, como: introduzir genes para o metabolismo fermentador de pentoses em organismos etanologênicos, ou minimizar a suscetibilidade de organismos naturalmente fermentadores de pentose a inibidores nos pré-tratamentos, bem como, expressão de proteínas heterólogas em micro-organismos etanologênicos selvagens ou engenheirados para favorecer a sacarificação e fermentação simultânea, além de outras tentativas de engenharia genética e metabólica (Balat, 2008).

1.4.10 Conceitos de Biologia Molecular

Atualmente, ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em sequências gênicas vêm sendo utilizadas cada vez mais, em diversas áreas de pesquisa, abrangendo desde a genética forense, agricultura, biotecnologia até a medicina diagnóstica (Snustad e Simmons, 2001).

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é um polímero de duas cadeias de desoxirribonucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster. Essas cadeias são constituídas por um açúcar (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada, timina (T), adenina (A), citosina (C) ou guanina (G). A dupla hélice é um fator essencial na replicação do DNA durante a divisão celular cada hélice serve de molde para outra nova. O principal papel do DNA é armazenar as informações necessárias para a construção das proteínas. Os segmentos de DNA que contêm a informação genética são denominados genes. O restante da sequência de DNA tem importância estrutural ou está envolvido na regulação do uso da informação genética (Griffiths, 2006).

O RNA (ácido ribonucléico) é polímero de nucleótidos formado por uma cadeia simples de nucleotídeos, e não uma de dupla hélice como o DNA. O RNA é formado por um açúcar (ribose) ao invés do desoxirribose encontrado no DNA, um grupo fosfato e uma base nitrogenada, uracila (U), adenina (A), citosina (C) ou guanina (G). O RNA é o responsável pela síntese de proteínas da célula (Griffiths, 2006).

Em genética, DNA complementar (cDNA) é o DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro, cujos íntrons já foram removidos, numa reação catalisada pela enzima transcriptase reversa (Sambrook *et al.*, 1989).

Os íntrons e éxons são sequências de bases nitrogenadas no DNA. Os íntrons até então acreditados irrelevantes no processo de transcrição, são sempre suprimidos na formação do RNA mensageiro. Já os éxons são as partes “efetivamente” responsáveis pela codificação de proteínas (Snustad e Simmons, 2001).

Um gene é uma sequência de DNA que contém informação genética e pode influenciar o fenótipo de um organismo. Dentro de um gene, a sequência de bases ao longo de uma cadeia de DNA definem uma cadeia de RNA mensageiro, que por sua vez define uma ou mais sequências proteicas. A relação entre a sequência de nucleótidos de um gene e a sequência de aminoácidos de uma proteína é determinada pelas regras de tradução, conhecidas coletivamente como código genético. O código genético consiste de três letras chamadas códons formadas por uma sequência de três nucleótidos (Bruce *et al.*, 2002).

A utilização de sequência de DNA como fonte básica de variação tem sido muito utilizada na resolução de questões taxonômicas e filogenéticas. Conforme o nível taxonômico em questão, várias sequências de genes específicos tem sido comumente utilizadas de acordo com o grau de conservadorismo da sequência. Estudos comparativos de sequências do gene do RNA ribossomal permitem avaliar as relações filogenéticas de vários níveis taxonômicos e descrever a estrutura genética de populações (White *et al.*, 1990).

O gene do ribossomo (rDNA) que codifica diretamente o RNA ribossomal é transcrito como um único precursor, consistindo de 3 regiões codificantes - 18S, 5.8S, 25S - separadas por duas regiões transcritas (ITS1 e ITS2), mas descartadas durante o processamento (Figura 1.3). Cada unidade básica do gene é separada por uma região não transcrita, denominada sequência espaçadora intergênica (IGS), considerada hipervariável (Jorgensen e Cluster, 1988). As regiões que codificam para rDNA (18S, 5.8S e 25S) não são geralmente úteis em termos de polimorfismo a nível intraespecífico porque essas regiões evoluem muito lentamente na sequências e quase nada em comprimento, sendo portanto, particularmente úteis para análises a nível de família e classes taxonômicas mais elevadas. As regiões ITS (ITS-1 e ITS-2) apresentam um nível intermediário de variação, o que torna essas sequências apropriadas para o uso a nível de gênero e/ou de espécie (Ko *et al.*, 1993).

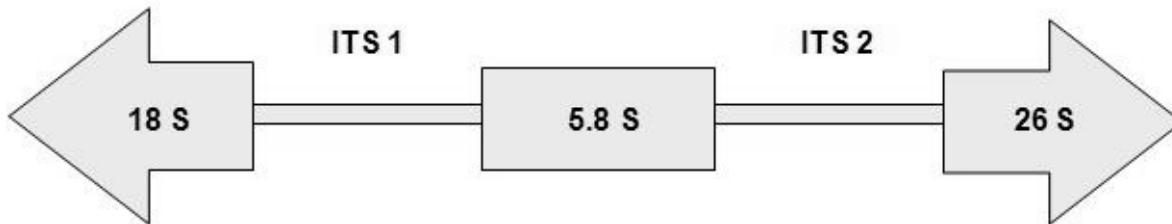


Figura 1.3. Organização genômica do RNA ribossomal: 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 e 26S rDNA.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA sem o uso de um organismo vivo, por exemplo, *Escherichia coli* (bactéria) ou leveduras. Descoberta em 1983 por Kary Mullis, a PCR é uma das técnicas mais comuns utilizadas em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para diversas tarefas, como o sequenciamento de genes, diagnóstico de doenças hereditárias, identificação de material genético (usado em testes de paternidade e na medicina forense), detecção de diagnóstico de doenças infecciosas e criação de organismos transgênicos (Snustad e Simmons, 2001).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado. O processo consiste basicamente em utilizar os mecanismos da replicação *in vitro*. Em primeiro lugar, deve-se extrair o material genético da célula ou outro material a ser estudado sem danificá-lo. Normalmente o material extraído é o DNA, mas pode-se trabalhar com o RNA em uma RT-PCR que é um desdobramento da PCR e possui outras aplicações. Depois de extraído o DNA, a este é adicionada uma mistura (também conhecida como pré-mix) que contém os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com um três fosfato, os *primers* (também chamados de oligonucleotídeos ou iniciadores) e a enzima DNA polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação (fragmento a ser amplificado). Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada de 94 a 96 °C por

pouco tempo para que haja a separação da dupla cadeia de DNA (Desnaturação, quebra das pontes de hidrogênio). Na segunda etapa, a temperatura é reduzida entre 50 a 60 °C dependendo da quantidade de citosina (C) e guanina (G) encontrada no primer, para que os primers se anelem (emparelham) com a fita molde de DNA (anelamento). Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72 °C para que a enzima possa funcionar sintetizando a nova molécula (extensão), em seguida um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos para cada reação na qual a taxa de replicação é exponencial (Saiki *et al.*, 1988).

O sequenciamento de DNA consiste em uma série de métodos bioquímicos que têm como finalidade determinar a ordem das bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) da molécula de DNA (Snustad e Simmons, 2001).

Uma das primeiras metodologias de sequenciamento foi desenvolvida por Frederick Sanger na década de 70. Inicialmente feita de forma manual, a automatização desta técnica permitiu uma maior eficiência e rapidez que viabilizou a realização de projetos Genomas. Um novo método de sequenciamento de DNA, usualmente chamado de pirosequenciamento, consiste em uma nova abordagem molecular do sequenciamento e se beneficia de uma técnica capaz de captar a emissão de luz causada pela adição de uma luciferase (enzimas que catalisam reações biológicas transformando energia química em energia luminosa), acoplada à polimerização do DNA previamente fragmentado e aderido a microesferas, com o uso de sequências adaptadoras (Griffiths, 2006).

A tecnologia de sequenciamento de DNA é similar a uma reação de PCR, com a diferença fundamental consistindo na adição de dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluorocromos. Os dideoxynucleotídeos são deoxynucleotídeos (dNTPs) modificados para não conter a extremidade 3` - OH e, com isso, interrompem a extensão da fita por serem incapazes de formar a ligação fosfodiéster com o próximo nucleotídeo. Com a reação utilizando uma mistura de dNTPs e ddNTPs, os últimos são incorporados em locais aleatórios durante a extensão da fita, resultando em fitas interrompidas de tamanhos diferentes. Ao separar os fragmentos por eletroforese e incidir um laser com os comprimentos de onda capazes de excitar os fluorocromos incorporados aos ddNTPs, é possível associar cada tamanho de fita (posição do ddNTP) com uma cor/nucleotídeo

diferente. À medida que os fragmentos passam pelo feixe de laser, os fluorocromos são excitados e a luz emitida é detectada por um fotomultiplicador. Esta informação é traduzida na forma de sequência através do computador (Sambrook *et al.*, 1989).

O *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) é a ferramenta mais popular de comparação de sequências de DNA e proteínas com os bancos de dados genômicos. Além disso, esse algoritmo permite fazer inferências tanto funcionais quanto evolutivas a respeito das sequências. O programa não procura conduzir uma comparação da extensão total das moléculas comparadas, mas apenas identificar, no banco de dados, a presença de uma sequência suficientemente parecida com a pesquisada, descartando assim, os resultados não produtivos e estendendo a região homóloga detectada até não mais ser possível (Altshul *et al.*, 1990).

De acordo com o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), os principais tipos de BLAST são:

- BLASTn: compara sequências de nucleotídeos com o banco de dados de nucleotídeos;
- BLASTp: compara sequências de aminoácidos com o banco de dados de proteínas. Também identifica possíveis domínios conservados nas proteínas analisadas;
- BLASTx: compara sequências de nucleotídeos com o banco de dados de proteínas;
- tBLASTn: traduz uma sequência de aminoácidos para nucleotídeos e compara com o banco de dados de genes;
- tBLASTx: traduz uma sequência de nucleotídeos para aminoácidos e compara com o banco de proteínas.

1.4.11 Tendências Futuras para a Produção e Aplicação de Celulases

Atualmente a produção de celulases e sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos são tecnologias que estão em crescente desenvolvimento, para as quais determinadas estratégias podem ser aplicadas, objetivando o aumento de produtividade e a economia do processo (Castro e Pereira, 2010).

O termo de engenharia de produto pode ser aplicado na produção de celulases, visando à obtenção de preparados enzimáticos em proporções ideais, que compreendem as diversas enzimas do complexo celulase, em especial endoglucanases e β -glicosidades. O preparado ideal pode ser obtido através do cultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases em condições otimizadas (Wen *et al.*, 2005) e pela produção em separado das celulases e posterior mistura dos extratos em proporções pré-otimizadas (Xiao *et al.*, 2004; Öhgren, *et al.*, 2006) ou ainda pela incorporação de genes de celulases em micro-organismos hospedeiros, fazendo com que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (Van Zyl *et al.*, 2007).

Outra opção que deve ser investigada, é o reciclo das células, já que as celulases são insumos que impactam significativamente o processo, podendo representar até 18% do custo operacional de uma planta. Dessa forma, se não for possível a produção de enzimas de baixo custo, torna-se necessário desenvolver operações unitárias que permitam o aproveitamento e reciclo desses biocatalisadores. Por exemplo, o uso de membranas para o reciclo de celulases, resultou em uma redução no custo de produção do produto final de 0,048 USD L⁻¹, provando portanto, que o reciclo de celulases é uma estratégia que deve ser investigada mais profundamente, e é um processo que deve ser levado em conta no desenvolvimento das enzimas, por ser uma provável alternativa para a viabilidade econômica de processos de segunda geração para produção de etanol (Castro e Pereira, 2010).

Referências Bibliográficas

- Almeida, M. N. Cellulases and Hemicellulases from Species of *Acremonium* Endophytes. M.S. Thesis, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, Brazil, p. 70, 2009.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Myers, E. W. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n.3, p. 403-410, 1990.
- Atala, D. I. P. Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 152 p., 2004.
- Balat, M.; Balat, H.; Oz, C. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.
- Bastos, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. *BNDES Setorial*, n. 25, p. 5-38, 2007.
- Belghith, H.; Ellouz-Chaabouni, S.; Gargouri, A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) celulasas. *J. Biotechnol.*, v. 89, p. 257-262, 2001.
- Bruce, A.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, K. M.; Roberts, K.; Walters, P. *Molecular Biology of the Cell*; 4nd Edition. Nova Iorque e Londres: Garland Science, 2002.
- Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. *Biochemistry & Molecular Biology of plants*, American Society of Plant Physiologists, 1387 p., 2004.
- Cabri, W. Catalysis: The pharmaceutical perspective, *Catalysis Today*, v. 140, p. 2-10, 2009.
- Castro, A. M. Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). M.S. Thesis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2006.

- Castro, A. M.; Pereira, N. JR. Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. *Quim. Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- Chang, M. C. Y. Harnessing energy from plant biomass. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.11, p. 677-684, 2007.
- Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 29, p. 3-23, 2005.
- Del Campillo, E. Multiple Endo-1,4-b-D-Glucanase (Cellulase) Genes In *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 146, p. 39-61, 1999.
- Delabona, P. S.; Farinas, C. S.; Silva, M. R.; Azzoni, S. F.; Pradella, J. G. C. Use of new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technol.*, v. 107, p. 517-521, 2012.
- Dien, B. S., Cotta, M. A., Jeffries, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 63, p. 258-266, 2003.
- Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T. H. Compendium of soil fungi. *European Journal Soil Science*, v. 59, p. 1007-1007, 2007.
- Eggeman, T.; Elander, R. T. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 2019-2025, 2005.
- Ethanol Brasil. Bioetanol - Etapa Decisiva. Disponível em: <<http://ethanolbrasil.blogspot.com>>. Acesso em: 05/06/2008. Publicado em 24 de abril de 2007.
- Fang, X.; Yano, S.; Inoue, H.; Sawayama, S. Strain improvement os *Acremonium cellulolyticus* for cellulase production by mutation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.107, n.3, p. 256-261, 2009.

- Gervais, P.; Molin, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, n. 1, p. 85-101, 2003.
- Goldbeck, R. Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lípase a partir de leveduras silvestres. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 113p., 2008.
- Griffiths, A. J. F.; Wessler, S. R.; Lewontin, R. C.; Gelbart, W. M.; Suzuki, D. T; Miller, J. H. Introdução à Genética. 8ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 743 p., 2006.
- Han, Y.; Chen, H. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, v.99, p. 6081-6087, 2008.
- Hernalsteens, S. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 186p., 2006.
- Hernalsteens, S.; Maugeri, F. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 49: 43-49, 2007.
- Hideno, A.; Inoue, H.; Tsukabara, K.; Yano, S.; Fang, X.; Endo, T.; Sawayama, S. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, v.48, p. 162–168, 2011.
- Hira, A.; Oliveira, L.G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. *Energ. Policy*, v. 37, p. 2450–2456, 2009.

- Ikeda Y.; Hayashi, H.; Okuda, N.; Park, E. Y. Efficient Cellulase Production by the Filamentous Fungus *Acremonium cellulolyticus*, *Biotechnol. Prog.*, v. 23, p. 333-338, 2007.
- Jannuzzi, G. D. M. Uma avaliação das atividades recentes de P&D em energia renovável no Brasil e reflexões para o futuro. *Energy Discussion Paper*, n 2.64-01/03, 2003.
- Jeffries, T. W.; Jin, Y. S. Metabolic engineered for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 63, p. 495-509, 2004.
- Jorgensen, R. A.; Cluster, P. D. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, v. 75, p. 1238-1247, 1988.
- Kadam, K. L.; McMillan, J. D. Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 88, p. 17-25, 2003.
- Kang, S. W.; Park, Y. S.; Lee, J. S.; Hong, S. I.; Kim, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, p.153–156, 2004.
- Kataria, R.; Ghosh, S. Saccharification of Kans grass using enzyme mixture from *Trichoderma reesei* for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 102, p.9970–9975, 2011.
- Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; David, J. C.; Stalpers, J. A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th Edition, CABI Publishing, Wallingford, 655 p., 2001.
- Ko, S. C.; O'Kane, S. L.; Schaal, B. A. Intraspecific taxonomy and comparisons of NrDNA ITS-2 sequences of *Arisaema ringens* (Araceae). *Rhodora*, v. 95(883/884), p. 254-260, 1993.

- Kuhad, R. C.; Gupta, R.; Khasa, Y. P.; Singh, A.; Zhang, Y. H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 4950–4962, 2011.
- Le Clinche, F.; Piñaga, F.; Ramon, D.; Valles, S. α -L-arabinofuranosidases from *Aspergillus terreus* with potential application in enology: Induction, purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 7, p. 2379-2383, 1997.
- Lee, S. J.; Lee, K. S.; Kim, S. R.; Gui, Z. Z.; Kim, Y. S.; Yoon, H. J.; Kim, I.; Kang, P. D.; Sohn, H. D.; Jin, B. R. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: Gene structure, expression, and enzymatic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 140, p. 551–560, 2005.
- Limayem, A.; Ricke, S. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, p. 449-467, 2012.
- Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 66, p. 506-577, 2002.
- Maeda, N. R.; Serpa, V. I.; Rocha, V. A. L.; Mesquita, R. A. A.; Santanna, L. M. M.; Castro, A. M.; Driemeier, C. E.; Pereira, N. JR.; Polikarpor, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochem.*, v. 46, p. 1196-1201, 2011.
- Mandels, M.; Parrish, F. W.; Reese, E. T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J Bacteriol*, v. 83, p. 400-408, 1962.
- Mcdougall, J. B. M.; Seviour, R. J. Factors affecting the synthesis of (1-3) and (1-6)- β -glucanases by the fungus *Acremonium sp.* IMI 383068 grown in batch culture. *Enzyme Microb. Technol.*, v.31, n.3, p. 289-299, 2002.

- Morikawa, Y.; Ohashi, T.; Mantani, O.; Okada, H. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 44, p. 106-111, 1995.
- Nisizawa, T.; Suzuki, H.; Nisizawa, K. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.*, v. 71, p. 999-1007, 1972.
- Nogawa, M.; Goto, M.; Okada, H.; Morikawa, Y. L-sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Genet.*, v. 38, n. 6, p. 329-334, 2001.
- Ogawa, K.; Toyama, H.; Toyama, N. Native cellulose hydrolyzing cellulase of *Trichoderma reesei*. *J. Ferment. Technol.*, v. 60, n. 4, p. 349-355, 1982.
- Öhgren, K.; Rudolf, A.; Galbe, M.; Zacchi, G. Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass Bioenergy*, v. 30, n. 10, p. 863-869, 2006.
- Okuda, N.; Ninomiya, K.; Takao, M.; Katakura, Y.; Shioya, S. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate or waste house using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 103, n. 4, p. 350-357, 2007.
- Olofsson, K.; Bertilsson, M.; Liden, G. A short review on SSF - An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, v. 31, p. 1-7, 2008.
- Padilha, F. F. Produção de biopolímeros por microrganismos modificados geneticamente. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 84 p., 2003.
- Pandey, A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 81-84, 2003.
- Peixoto, A. B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões brasileiras. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de

- Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 84 p., 2006.
- Quin, Y.; Wei, X.; Liu, X.; Wang, T.; Qu, Y.; Purification and Characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. *Protein Expression & Purification*, v. 58, p. 162-167, (2008).
- Rabelo, S.C.; Carrere, H.; Maciel Filho, R.; Costa, A. C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, v. 102, p.7887–7895, 2011.
- Robinson, T.; Nigam, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v.13, p.197-203, 2003.
- Rodrigues, A. C. ; Leitão, A. F. ; Moreira, S. ; Felby, C. ; Gama, M. Recycling of cellulases in lignocellulosic hydrolysates using alkaline elution. *Bioresource Technology*, v. 110, p. 526–533, 2012.
- Rodrigues, G. Prospecção de Genes de Celulase presentes em Biblioteca Metagenômica. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de Campinas, Jaboticabal, 47 p., 2008.
- Rowell, M. R., Pettersen, R., Han, J. S., Rowell, J. S., Tshabalala, M. A. Handbook of wood chemistry and wood composites. Chapter 3: Cell wall chemistry. CRC Press, 487p. , 2005.
- Ruegger, M. J. S.; Tauk-Tornisielo, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a (Ed). Cold Spring Harbor Publishers Inc, New York, USA, 1989.
- Sánchez, O. J.; Cardona, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 99, n.13, p. 5270-5295, 2008.
- Sanderma, W.; Schmidt, H. Efficiency of some organic compounds against reticulitermes-flavipes (kollar). *Holz als Roh-Und Werkstoff*, v. 31, n. 2, p. 71-73, 1973.
- Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel, A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. 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.
- Snustad, P.; Simmons, M. J. *Fundamentos de Genética*. 2^a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 756 p., 2001.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., Pitarelo, A. P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Bom, E. P. S., Moraes, L. M. P., Araújo, J. M., Torres, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technol.* 101, 4820-4825, 2010.
- Stamford, T. L. M.; Araújo, J. M.; Stamford, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 3a ed. Editora Atmed, Porto Alegre, 722 p., 2004.

- Technology Review. Redesigning life to make ethanol. Disponível em: <http://www.technologyreview.com/printer_friendly_article.aspx?id=17052>. Acesso em: 15/07/2008. Publicado em: 01 de julho de 2006.
- Van Zyl, W. H.; Haan, R. D.; McBride, J.E.; LA Grange, D. C.; Lynd, L. R. Functional expression of cellobiohydrolases in *Saccharomyces cerevisiae* towards one-step conversion of cellulose to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1291-1299, 2007.
- Watanabe, H.; Tokuda, G. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review Entomology*, v. 55, p.609-632, 2010.
- Weil J.; Miramonti J.; Ladisch M. R. Biosynthesis of cephalosporin C: Regulation and recombinant technology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, n. 1, p. 88-90, 1995.
- Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Appl Biochem Biotechnol.*, v.93, p. 121-124, 2005.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, 1990.
- Wicklow D. T.; Roth, S.; Deyrup, S. T.; Gloer, J. B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol. Res.*, v. 109, n. 5, p. 610-618, 2005.
- Whitaker, J. . *Principles of Enzymology for Food Sciences*. 2^a (Ed). Marcel Dekker Inc, New York, 625 p., 1994.

Xiao Z.; Zhang, X.; Gregg, D. J.; Saddler, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 113–116, 1115–1126, 2004.

Zhang, P. H. Y.; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotchebology Advances*, v. 24, p. 452-481, 2006.

Zhou, J.; Wang, Y.; Chu, J.; Zhuang, Y.; Zhang, S.; Yin, P. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresource Technol.*, v. 99, p. 6826-6833, 2008.

CAPÍTULO 2

SCREENING AND IDENTIFICATION OF CELLULASE PRODUCING YEAST-LIKE MICROORGANISMS FROM BRAZILIAN BIOMES

Artigo Publicado:

African Journal of Biotechnology

DOI:10.5897//AJB12.422

Vol. 11(53), pp. 11595-11603, 3 July, 2012

SCREENING AND IDENTIFICATION OF CELLULASE PRODUCING YEAST-LIKE MICROORGANISMS FROM BRAZILIAN BIOMES

Goldbeck, R.¹; Andrade, C. C. P.¹; Pereira, G. A. G.²;
Maugeri Filho, F.¹

¹Laboratory of Bioprocess Engineering, Faculty of Food Engineering,
University of Campinas – UNICAMP, 13083-862, Campinas-SP, Brazil

²Laboratory of Genomic and Expression, Institute of Biology,
University of Campinas – UNICAMP, 13083-870, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT

The main goals of the present study included the screening and identification of cellulase producing wild yeasts, isolated from samples collected from different Brazilian biomes. They were selected according to their capabilities of degrading carboxymethylcellulose (CMC) and micro-crystalline cellulose (SERVACEL[®]), as single carbon sources in solid medium. After the step of solid medium selection, yeast cells were grown in liquid medium containing cellulose (SERVACEL[®]), in shake flasks at temperature of 30 °C and 150rpm agitation for 288h. Three specific activities were evaluated: endoglucanase (CMCase), total activity (Filter Paper activity), and cellobiase. From a total of 390 strains of wild yeasts previously isolated, 16 strains performed cellulose hydrolysis, verified by the colorless halo in the solid medium. Among these 16 strains, 5 stood out as presenting higher levels of enzyme activity. The following step, screening in liquid medium, indicated only one strain as a potential producer of cellulases, named as AAJ6, for which the highest hydrolytic activity on carboxymethylcellulose (0.33 U/mL) and filter paper (0.039 U/mL) was recorded. Afterwards, this wild yeast (AAJ6) was molecularly identified by sequencing the ITS1-5.8S-ITS2 and D1/D2 domains of the subunit (26S) ribosomal DNA. Sequencing resulted in the identification of this strain as yeast-like fungus *Acremonium strictum*.

Key words: *Acremonium strictum*; screening; identification; yeast-like; cellulases.

2.1 INTRODUCTION

In recent years the interest in production of cellulases has increased due to several potential applications, such as the production of bioenergy and biofuels as well as application in the textile and paper industries (Zhou *et al.*, 2008). Growing concerns regarding the shortage of fossil fuels, greenhouse gas emissions and air pollution by incomplete combustion of fossil fuels have also resulted in an increasing focus of producing bioethanol from lignocellulose, and especially the possibility of using cellulases to perform enzymatic hydrolysis of the lignocellulosic materials (Kitagawa *et al.*, 2011).

Cellulases are highly specific biocatalysts that act in synergy to release sugars, especially glucose which is of great industrial interest due to the potential for its conversion to, for example, bioethanol (Castro and Pereira, 2010).

There is a wide variety of microorganisms in nature which produce cellulases, some known as truly cellulolytic, are capable of degrading natural cellulose. In laboratory conditions, filter paper is used as inductor substrate for the production of exo-glycosidases and to measure total activity of the cellulolytic complex (Ruegger and Tauk-Tornisielo, 2004).

Although many bacteria and fungi degrade cellulose, the final products are generally carbon dioxide and methane when grown in media contains such carbohydrates. Only a few strains of fungi have been seen as major producers of enzymes, which can extensively degrade from insoluble cellulose to soluble sugars (Lee *et al.*, 2005). In this context, particular attention should be given to the wild flora, which can be of great interest for enzyme production (Peixoto, 2006).

Explorations of biodiversity in the search for new biocatalysts by selecting microorganisms from plants or animal cells represents a method for discovering new enzymes which may permit the development of bio-catalysis on an industrial scale. Currently, there is great interest in finding microorganism species that are not yet known as interesting producers of inputs to industry in general, and also in biotechnological processes can replace many chemical processes, in terms of production of key products. As an

example is the replacement of acid hydrolysis for enzymatic hydrolysis, as is well known in the industry (Peixoto, 2006).

Brazil possesses the greatest biodiversity on the planet and is home to seven biomes, forty-nine already classified ecoregions, and an incalculable number of ecosystems. Due to the large Brazilian biodiversity, the species of fauna and flora may never be completely known, and the number of species not yet identified may reach the order of tens of millions. It is estimated that less than 5% of microorganisms existing on earth have been identified. In this context it is essential to implement programs capable of better utilizing Brazilian biodiversity. Currently, there is great interest in finding microorganisms species that are not yet cataloged as interesting producers of inputs to industry in general, as well as optimizing production processes of these inputs from known microorganisms (Hernalsteens, 2006). Based on this information, the objective of the present study included screening and identification of cellulose producing wild yeasts isolated from different regions of Brazil.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Sampling for Microorganisms

Hernalsteens and Maugeri (2007) sampled flowers, fruit and soil from tropical Brazilian biomes, including: the Atlantic Rainforest (stretches along the Brazilian coast); the Cerrado (tropical savanna eco-region); the Pantanal (the world's largest wetland) and the Amazon Forest (complex biome due to the great diversity of vegetation present, considered the “lungs of the world”), aiming to isolate yeasts. The isolated yeasts were maintained in agar slant (GYMP Medium: 2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 1.0% malt extract, 0.2% monobasic sodium phosphate, 2.0% agar and pH 5.5) under refrigeration at 5 °C (stock culture). All cultures were stored in the bank of cultures in the Laboratory of Bioprocess Engineering (LEB) - FEA/UNICAMP and corresponded to a total of 390 strains.

2.2.2 Solid Medium Selection

Selection of yeasts was based on the break-down of carboxymethylcellulose (CMC) and cellulose (SERVACEL[®]), in separate experiments. The selective solid culture medium consisted of carboxymethylcellulose (CMC), 10 g/L or SERVACEL[®], 20 g/L; yeast extract, 0.6 g/L; KH₂PO₄, 7.0 g/L; K₂HPO₄, 2.0 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L; (NH₄)₂SO₄, 1.0 g/L; agar, 15.0 g/L and pH 5.0 (Peixoto, 2006).

The Petri dishes with the selective medium described above were inoculated with the yeasts, and incubated at 30 °C for 96 h. Then the plates were revealed using a congo red solution (1.4 g/L) in Tris-HCl 0.1 M pH 8.0. The cellulase producing yeasts were selected according to a colorless halo around the colonies.

The enzymatic activities in solid medium were estimated according to the method reported by Anagnostakis and Hankin (1975) who proposed an Enzymatic Activity Index (EAI), which is the ratio between the halo diameter and the colony diameter. The experiments were performed in triplicate and data was statistically analyzed with STATISTICA[®] 6.0, according to the Tukey's tests at 5 % of probability ($p \leq 0.05$).

2.2.3 Liquid Medium Selection

For the selection in liquid culture, the medium consisted of: SERVACEL[®], 20.0 g/L; yeast extract, 0.60 g/L; KH₂PO₄, 7.0 g/L, K₂HPO₄, 2.0 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.15 g/L; (NH₄)₂SO₄, 1.0 g/L; FeSO₄·7H₂O, 0.01 g/L; and KCl, 0.50 g/L and pH 5.5 (Peixoto, 2006).

The inoculums were cultivated on GYMP agar slants at 30 °C for 96 h. Fermentations were then performed in shake flasks at 30 °C and 150 rpm, and monitored for 288 h. Samples were removed every 48 hours.

The samples collected periodically were centrifuged at 4 °C and 18,200 x g for 10 minutes, and the supernatant (crude enzymatic extract) submitted to assays for CMCase (endoglucanase activity), FPase (filter paper activity) and Cellobiase activity.

2.2.4 Endoglucanase Activity

A carboxymethylcellulose (CMC, 1 %) solution was prepared in 0.2M sodium acetate buffer (pH4.2). 1 mL of the CMC solution was incubated with 1 mL of crude enzymatic extract at 50 °C for 10 minutes (Ogawa, 1982) and the amount of sugar was measured using the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) reagent method, according to Miller (1959).

2.2.5 Filter Paper Activity

Total cellulase activity was determined by the filter paper assay procedure (Mandels, 1976). The assay system had a total volume of 2 mL, consisting of 1 mL of crude enzymatic extract, 1 mL of 0.2M sodium acetate buffer (pH4.2) and 50 mg of Whatman filter paper N° 1, incubated for 60 minutes at 50 °C. The amount of reducing sugar was measured by the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) reagent method, according to Miller (1959).

2.2.6 Cellobiase Activity

Cellobiase activity was measured according a reaction mixture containing a solution of cellobiose 20mM in acetate buffer 0.2 M, pH5.2. 1 mL of the cellobiose solution was mixed with 1 mL of the crude enzymatic extract and incubated at 50 °C for 30 minutes. Reducing sugar was measured using a commercial enzymatic kit containing glucose oxidase (Henry, 1974).

One unit of endoglucanase, filter paper or cellobiase activity is defined as the amount of the enzyme that released 1 μ mol of glucose per minute from the substrate, at the three experimental conditions described above.

2.2.7 Molecular Identification

The yeast strain was identified by the molecular method as follows: a portion of a colony was cultured in 4 mL of 2% YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) medium, overnight, under agitation, at 30 °C. Afterwards, the cells were centrifuged and resuspended in 200 mL of breaking buffer and DNA extraction as described by Sambrook *et al.* (1989).

Identification was carried out by sequencing the gene that encodes the 5.8S region of ribosomal RNA and the spacer regions *ITS-1* and *ITS-2*. To do so, the universal primers *ITS1* (5 'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and *ITS4* (5 'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') were used. The D1/D2 domains of the 26S subunit were also sequenced by using the primers *NLI* (5 'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') and *NL4* (5 'GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'), according to the methodology described by Kurtzman and Robnett (1997); Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) and Leaw *et al.* (2006).

DNA fragments from PCR were purified by the enzymatic method ExoSAP with Exo 1 (Exonuclease 1) and SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase); and DNA quantification was performed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) at the wavelength of 260nm.

The reaction followed the sequencing method of Sanger and was performed using the MegaBACE device (GE Healthcare), at the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (LNLS), according to local protocol.

Nucleotide sequences were assessed and compared using the BLAST algorithm (*Basic Local Alignment Search Tool*) with the sequences deposited in the NCBI data bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for the genus and species already identified.

2.2.8 Microscopy

The morphology of *Acremonium strictum* (AAJ6 strain), grown on SERVACEL[®] during exponential growth phase, was observed in a Carl Zeiss Jena optical microscope, Variant Jenamed model, with 120X magnification.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

2.3.1 Solid Medium Selection

For selection in solid medium, the wild yeasts were grown in Petri dishes in order to identify those able to degrade carboxymethylcellulose (CMC) and micro-crystalline cellulose (SERVACEL[®]). After incubation, the plates were revealed with a congo red solution and halo formation was analyzed. The formation of a clear halo surrounding the

colony indicates hydrolytic activity. Diameters of the halos were measured in three different directions to determine the average value (Figure 2.1).

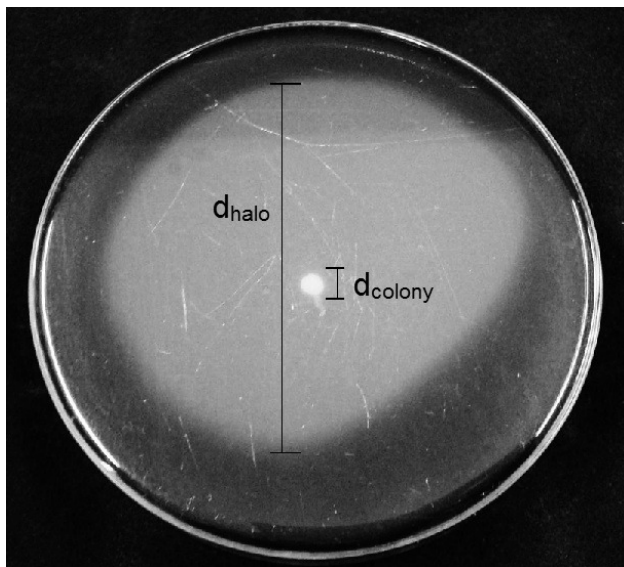


Figure 2.1. Halo of hydrolysis formed around the colony (strain named AAJ6) when grown for 96 hours at 30 °C.

Analyzing the Figure 2.1, it can be visualized a large halo of hydrolysis formed after 96 hours incubation on agar with carboxymethylcellulose (CMC), however, the colony showed little increase in the same period. A similar result was observed for Ruegger and Tauk-Tornisielo (2004), who studied different strains of fungi isolated from soil, and many microorganisms showed colonies with smaller diameter and large halo hydrolysis resulting in higher values of enzymatic activity index (EIA).

From a total of 390 previously isolated wild yeast strains, only 16 performed cellulose hydrolysis, verified by a colorless halo in the solid medium. Among these 16 strains, 5 stood out as presenting high levels of enzyme activity (studied in this article). These five strains presented distinguishable colorless halos around their colonies in both substrates (carboxymethylcellulose and cellulose).

Ruegger and Tauk-Tornisielo (2004) studied the cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of São Paulo, Brazil, and among the fungi studied 36 strains (45%) showed zones clearer around the colonies, this halo corresponds to the

degradation of CMC (carboxymethylcellulose). Enzymatic activity index (EAI) varied from 1.4 to 6.0; the best results obtained were with *Trichoderma hamatum* and *Penicillium herquei*.

The enzymatic activity index (EAI) was established based on the ratio between the halo diameter and the colony diameter. Colonies with the highest EAI are those with higher extracellular enzyme activity (Ceska, 1971; Ruegger and Tauk-Tornisielo, 2004; Oliveira *et al.*, 2006). The EAI is a semi-quantitative parameter commonly used to assess enzyme production by microorganisms in solid medium (Anagnostakis and Hankin, 1975; Lopes *et al.*, 2011). Microorganism selection considered enzyme producers based on the direct correlation between diameters of the degradation halo and degradative ability of microorganisms (Ceska, 1971; Chen *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2006).

Figure 2.2 shows values of enzymatic activity indices (EAI) recorded for the five selected strains when grown on solid medium containing carboxymethylcellulose or cellulose (SERVACEL[®]) as the single carbon sources for the different experiments.

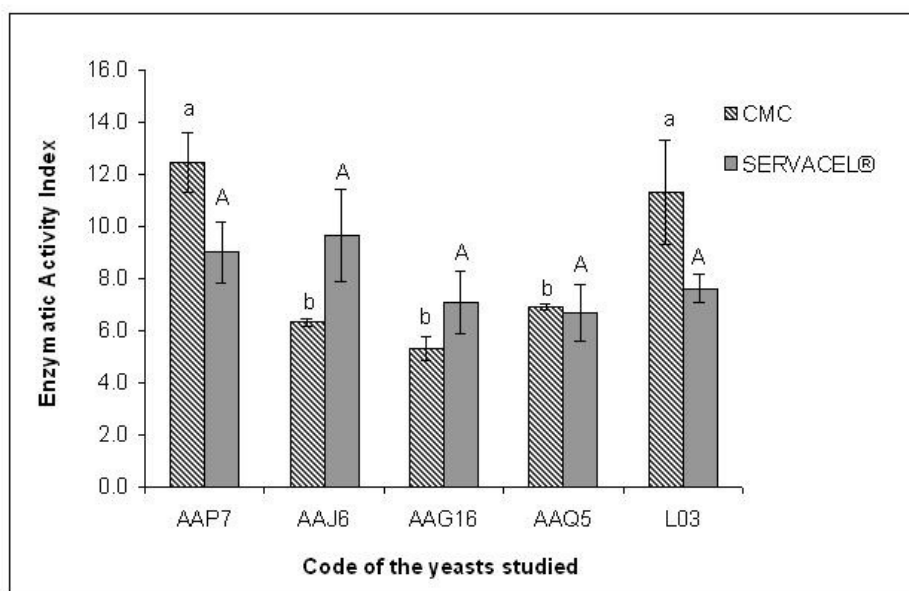


Figure 2.2. Enzymatic Activity Indices for the five yeast strains grown on solid medium.

*Different letters indicate significant difference at 5% level of significance ($p \leq 0.05$) among the strains, for both substrates (Carboxymethylcellulose and SERVACEL[®]). Capital letters were used for tests with SERVACEL[®] and lower-case letters used for tests with Carboxymethylcellulose (CMC), evaluated by the Tukey's test.

The experiments were performed in triplicate and data assessed according to the Tukey's test. Figure 2.2 shows the average enzymatic activity indices (EAI) for the five yeasts, in which the letters indicate if there is significant difference among strains at 5% significance for both substrates (carboxymethylcellulose and cellulose). Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

In experiments performed with carboxymethylcellulose as the sole carbon source, the yeast strains named AAP7 (isolated from the Cerrado) and L03 (isolated from the Pantanal) showed the highest enzymatic activity indices, 12.46 and 11.33, respectively. Both showed significant differences ($p \leq 0.05$) when compared with the other strains isolated from the Cerrado (AAJ6, AAG16 and AAQ5). Regarding the experiments with SERVACEL[®], the EAI for the five yeast strains showed no significant difference at 5% significance.

Some authors recommend an $EAI \geq 2.5$ for considering a microorganism as a producer of enzymes in solid medium (Peixoto, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2011). The five yeast strains selected showed EAI much higher than 2.5 (EAI 5 times greater than the minimum suggested). Therefore, these five were all considered cellulase producing strains and were assayed in liquid medium fermentations.

Values of the enzymatic activity index (EAI) found in this study were higher than those described in the literature because in this work the plates were incubated for 96 hours instead of 48 hours, as reported in the literature. Lopes *et al.* (2011) studied the screening of xylanase producing yeast non-conventional isolated from different Brazilian regions and reported enzymatic activity indices (EAI) varied from 2.5 to 6.7 for the yeast incubated for 48 hours at 30 °C and revealed using a congo red solution. However, in fact the intent this work was only use this method as a tool to screening cellulase producing microorganisms among the samples, and not to compare with data from the literature, so that the incubation time was in accordance with our needs.

2.3.2 Liquid Medium Selection

The fermentations were performed in medium containing SERVACEL[®] cellulose as the sole carbon source and monitored for 288h. Samples were collected every 48h for

further analysis of CMCase, FPase, Cellobiase activities, as shown in Figures 2.3, 2.4 and 2.5, for the five strains studied.

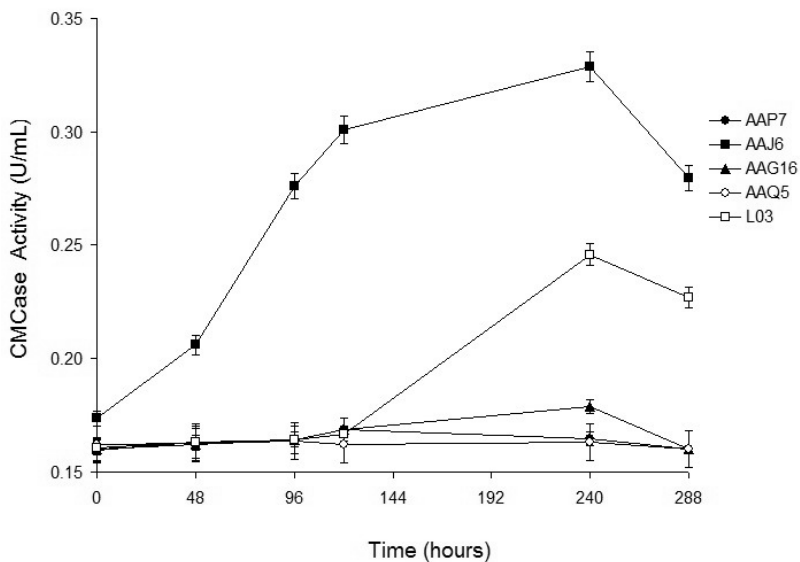


Figure 2.3. CMCase activity in relation to the fermentation time for the five strains studied.

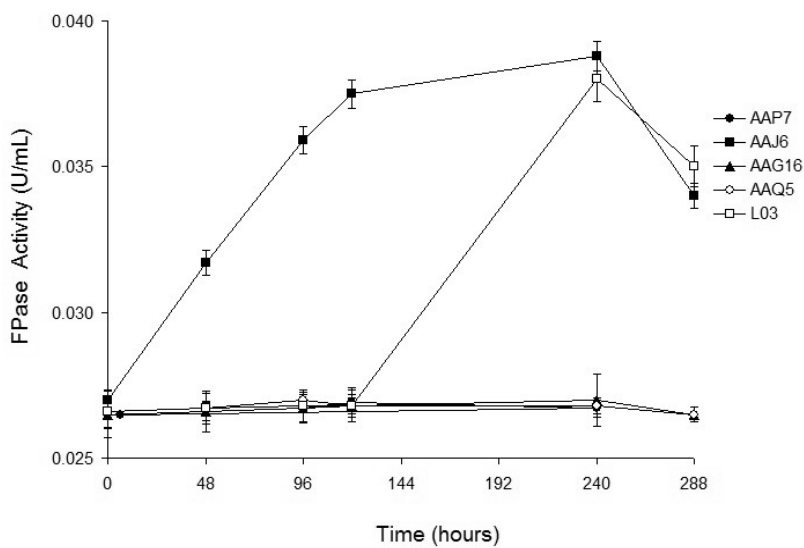


Figure 2.4. FPase activity in relation to the fermentation time for the five strains studied.

When analyzing Figures 2.3 and 2.4, it can be observed that there is a similar behavior for CMCase and FPase activities for all strains. The highest activities were observed at 240 hours of fermentation for both enzymes, and after 240 hours the enzymatic activity begins to drop. The strain AAJ6 stood out by producing the highest CMCase and FPase activities, 0.33 U/mL and 0.039 U/mL, respectively. These results are similar to those found for Ruegger and Tauk-Tornisielo (2004) who recorded an activity of CMCase 0.034 U/mL and FPase 0.016 U/mL for the microorganism *Penicillium purpurogenum* and CMCase of 0.036 U/mL and FPase of 0.018 U/mL for *Chloridium virescens* after 14 days of cultivation at 28 °C.

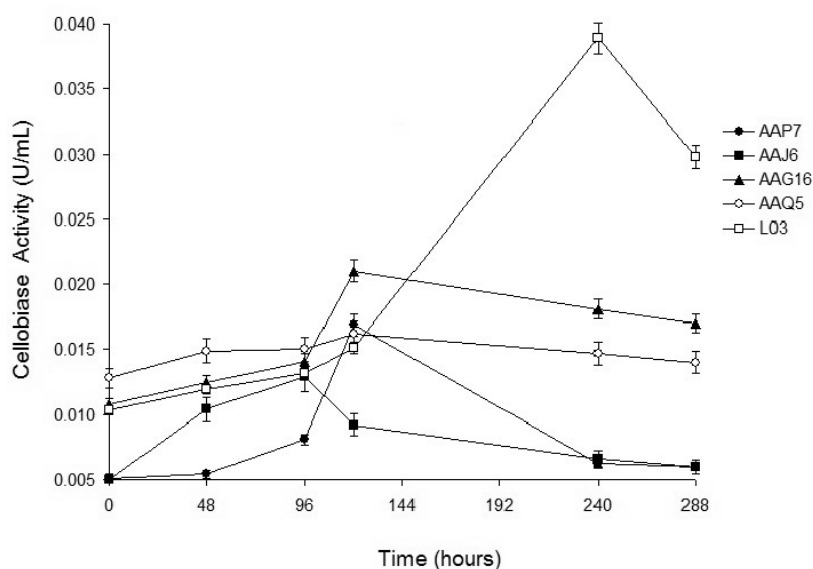


Figure 2.5. Cellobiase activity in relation to the fermentation time for the five strains studied.

Regarding cellobiase activity (Figure 2.5), the yeast strain L03 showed greatest activity of 0.039 U/mL after 240 h of cultivation, followed by the AAG16 strain (0.021 U/mL) at 120 h of cultivation. After 240 h of fermentation, the cellobiase activity from strain L03 begins to decrease and for the other strains the activity begins to fall at roughly 120 hours. Silva *et al.* (2009) evaluated the production of cellulases by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation using crystalline cellulose as an inducer, and the following results were obtained: CMCase activity of 0.57 U/mL, FPase

activity of 0.055 U/mL and cellobiase activity of 0.022 U/mL. Such results are similar to those found for the wild strains studied, although filamentous fungi have greater potential for cellulase production than yeasts.

Regarding the assays in solid and liquid medium, it is observed that the strain AAP7 showed the highest enzymatic activity index in solid medium, but didn't perform well in liquid medium; whereas the strains AAG16 and LO3, which performed relatively well in solid medium, reproduced cellobiase activity in the liquid medium. The strain AAJ6 showed good enzymatic activity index on solid medium and high enzymatic activities for CMCase (endoglucanase) and FPase. However, it can be concluded that the enzymatic activity index (EAI) in this study was not an appropriate parameter for comparative assessment of enzymatic activities between different strains, but can be used as an efficient and useful tool for selecting strains (Ruegger and Tauk-Tornisielo, 2004).

Additional liquid fermentations were performed with the AAJ6 and LO3 strains in order to confirm the previously obtained results and it was again observed that the activities of strain AAJ6 were superior. The AAJ6 strain (isolated from Cerrado) was selected as a potential producer of cellulases and was subjected to molecular identification.

2.3.3 Molecular Identification

Molecular identification was based on ribosomal targets: the ITS1-5.8S-ITS2 and D1-D2 domains of the RNA operon. In recent years, the number of ITS sequences available in public databases has increased significantly, and the expanding database may improve the quality and accuracy of fungal identification (Hinrikson *et al.*, 2005; Leaw *et al.*, 2006). The D1/D2 rDNA region has been sequenced for almost all known yeasts, including nonpathogenic species. As an identification tool, the sequencing of this region is relatively simple to apply and yields clear results (Kurtzman and Robnett, 1997; Leaw *et al.*, 2006). The BLAST searches, even as phylogenetic analysis, are used for identification by searching public databases for the closest known sequences to the unidentified yeast (Suh *et al.*, 2006).

A BLAST search in the NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) of the ITS1-5.8S-ITS2 sequenced fragment (545 bp) showed 100% sequence identity with

Acremonium strictum. Similarly, the D1/D2 sequenced fragment (584bp) also exhibit 100% sequence identity with this same fungal species.

Acremonium strictum also referred to as *Acremonium zeae*, *Cephalosporium sp.* and *Cephalosporium acremonium*, together with *Fusarium verticillioides*, are colonizers of freshly harvested corn (*Zea mays*). Infection by this fungus is asymptomatic and usually occurs in the embryo and endosperm of corn grains (Almeida, 2009).

Initially, the intention of this study was to identify wild cellulose producing yeast and not a filamentous fungus, due to the fact that the isolated strains were previously classified according to biochemical tests as yeasts. Although *Acremonium strictum* is commonly found as a filamentous fungus, this microorganism under the studied growth conditions showed a yeast-like form. This type of phenomenon, which is called dimorphism, is quite common among fungi and is based on the fact that the same microorganism can appear in different morphological forms, depending on the growth conditions imposed.

The fungi may have different morphology according to nutritional conditions and the temperature of development. Dimorphism is expressed by a mycelial growth between 22°C and 28°C and yeast from 35°C and 37°C (Hurtado and Rachubinski, 2002). In general, these forms are reversible and important in medical sciences, e.g. *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* (Pelczar *et al.*, 1997). Recently, it was demonstrated by DNA sequence analysis that the species *Acremonium strictum* displays a broad genetic polymorphism (Das *et al.*, 2010).

Like other strains isolated by Hernalsteens (2006) and that used in the present study, the strain AAJ6 is stable in the yeast form under the experimental conditions employed. This feature is extremely desirable for fermentation processes, since they grow predominantly in a unicellular form (Figure 2.6) and reproduce faster than mould. Moreover, they are normally easy to manipulate, the inoculum can be easily prepared, and yeast cells can be efficiently recycled in fermentation processes (Atala *et al.*, 2001).

The microorganism AAJ6 identified as *Acremonium strictum* showed significant potential for cellulase production. Currently, little is reported in literature regarding the production of cellulases from this genus, which permits numerous studies on novel

microorganisms in relation to production of enzymes of industrial interest. Thus, the results of this study stimulate new investigations, seeking applications in enzymatic hydrolysis for production of bioenergy.

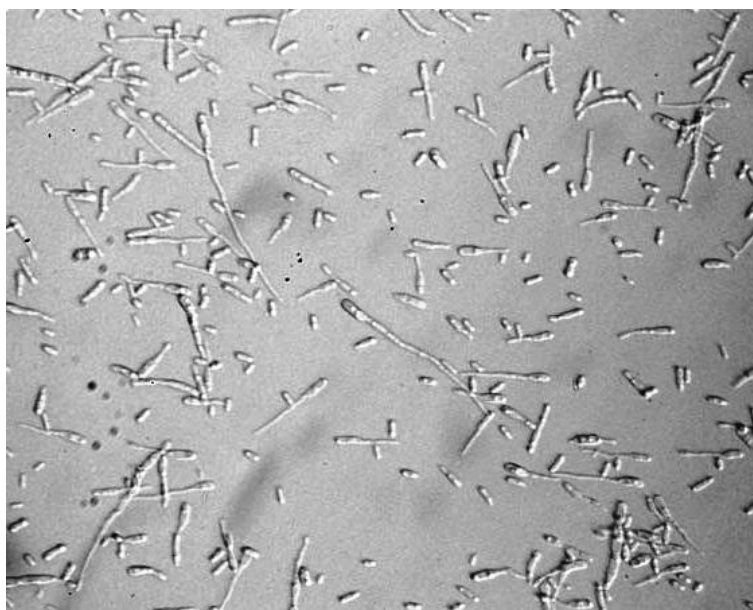


Figure 2.6. Morphology of *Acremonium strictum* (AAJ6 strain) grown on SERVACEL[®] during exponential growth phase. Two distinct cellular forms can be observed (120X): pseudo-mycelia and predominantly unicellular form (yeast-like).

2.4 CONCLUSION

From a total of 390 previously isolated wild yeast strains, 16 strains showed a halo of hydrolyzed substrate in the solid medium, and five stood out for having high levels of enzyme activity.

Considering the screening assays in liquid media, only one strain (AAJ6 - isolated from Cerrado) among the five pre-selected on solid medium, was selected as a potential producer of cellulase, which showed the highest hydrolytic activity on carboxymethylcellulose and filter paper. The microorganism was molecularly identified as *Acremonium strictum*, a dimorphic microorganism which will be subjected to further

studies involving cloning and heterologous expression, focusing on the production of bioethanol from lignocellulolytic material.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation) for the Ph.D scholarship and for the project funding. We acknowledge the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (LNLS) for the use of equipment MegaBACE (GE Healthcare) necessary for the molecular identification of the microorganism studied.

REFERENCES

- Almeida, M. N. (2009). Cellulases and Hemicellulases from Species of *Acremonium Endophytes*. M.S. Thesis. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, Brazil, p. 70.
- Anagnostakis, S. L.; Hankin, L. (1975). Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. *J. of Milk and Food Technol.* 38: 570-572.
- Atala, D. I. P.; Costa, A. C.; Maciel Filho, R.; Maugeri Filho, F. (2001). Kinetics of Ethanol Fermentation with High Biomass Concentration Considering the Effect of Temperature. *Applied Biochem. Biotechnol.* 91(3): 353-366.
- Castro, A. M.; Pereira, N. J. (2010). Production, Properties and Application of Cellulases in the Hydrolysis of Agroindustrial Wastes. *Quim. Nova.* 33(1): 181-188.
- Ceska, M. (1971). Enzyme catalysis of solidified media. *Eur. J. Biochem.* 71(22): 186-192.
- Chen, P. J.; Wei, T.C.; Chang, Y. T.; Lin, L. P. (2004). Purification and characterization of carboxymethylcellulase from *Sinorhizobium fredii*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 111-118.

- Das, S.; Saha, R.; Dar, S. A.; Ramachandran, V. G. (2010). *Acremonium* Species: A Review of the Etiological Agents of Emerging Hyalohyphomycosis. *Mycopathol.* 170(6): 361-375.
- Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Inter. J. of Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Henry, R. J.; Cannon, D. C.; Winkelman, J. (1974). *Clinical chemistry principles and techniques*. 2^a (Ed). Harper and Row Publishers Inc, New York, USA.
- Hernalsteens, S. (2006). Isolation, identification and characterization of oligosaccharide producing microorganisms collected from different regions of Brazil. Ph.D Thesis. Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Brazil, p. 186.
- Hernalsteens, S.; Maugeri, F. (2007). Screening of yeast strains for transfructosylating activity. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 49: 43-49.
- Hinrikson, H. P.; Hurst, S. F.; Lott, T.J.; Warnock, D.W.; Morrison, C. J. (2005). Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2092–2103.
- Hurtado, C. A. R.; Rachubinski, R. A. (2002). Isolation and Characterization of *YIBEM1*, a Gene Required for Cell Polarization and Differentiation in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eukaryotic Cell.* 4: 526-537.
- Kitagawa, T.; Kohda, K.; Tokuhira, K.; Hoshida, H.; Akada, R.; Takahashi, H.; Imaeda, T. (2011). Identification of genes that enhance cellulase protein production in yeast. *J. Biotechnol.* 151(2): 194-203.

- Kurtzman, C. P.; Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. of Clinical Microbiol.* 35: 1216-1223.
- Leaw, S. N.; Chang, H. C.; Sun, H. F.; Barton, R.; Bouchara, J. P.; Chang, T. C. (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 44: 693-699.
- Lee, S. J.; Lee, K. S.; Kim, S. R.; Gui, Z. Z.; Kim, Y. S.; Yoon, H. J.; Kim, I.; Kang, P. D.; Sohn, H. D.; Jin, B. R. (2005). A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: Gene structure, expression, and enzymatic activity. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 140(4): 551-560.
- Lopes, F. Motta, F.; Andrade, C. C. P.; Rodrigues, M. I.; Maugeri-Filho, F. (2011). Thermo-Stable Xylanases from Non Conventional Yeasts. *J. Microbial Biochem. Technol.* 3(3): 36-42.
- Mandels, M.; Sternberg, D. (1976). Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* 54: 267-286.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Ogawa, K.; Toyama, H.; Toyama, N. (1982). Native cellulose hydrolyzing cellulase of *Trichoderma reesei*. *J. Ferment. Technol.* 60: 349-355.
- Oliveira, N. A.; Oliveira, L. A.; Andrade, J. S.; Chagas Júnior, A. F. (2006). Extracellular hydrolytic enzymes in indigenous strains of rhizobia in Central Amazonia, Amazonas, Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26: 853-860.
- Pelczar, JR. M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. (1997). *Microbiology: Concepts and Applications*. 2^a (Ed). Makron Books Publishers Inc, São Paulo, Brazil.

- Peixoto, A. B. (2006). Study of the production of enzymes and gums by wild yeasts collected in various regions of Brazil. M.S. Thesis. Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Brazil, p. 84.
- Ruegger, M. J. S.; Tauk-Tornisielo, S. M. (2004). Cellulase activity of fungi isolated from soil of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. *Revista Brasil Bot.* 27(2): 205-211.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a (Ed). Cold Spring Harbor Publishers Inc, New York, USA.
- Suh, S. O.; Blackwell, M.; Kurtzman, C. P.; Lachance, M. A. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*. 98(6): 1006-1017.
- Silva, M. M. P.; Rocha, V.; Maeda, R. N.; Pereira, N. JR. (2009). Evaluation of cellulase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. In: Proceedings of 17th National Symposium Bioprocesses, Natal, Brazil.
- Zhou, J.; Wang, Y.; Chu, J.; Zhuang, Y.; Zhang, S.; Yin, P. (2008). Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresource Technol.* 99: 6826-6833.

CAPÍTULO 3

***CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF CELLULASES
PRODUCED BY *Acremonium strictum* ISOLATED
FROM BRAZILIAN BIOME***

**Artigo Submetido:
Bioprocess and Biosystems Engineering**

***CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF CELLULASES
PRODUCED by *Acremonium strictum* ISOLATED FROM BRAZILIAN
BIOME***

Goldbeck, R.¹; Andrade, C. C. P.¹; Pereira, G. A. G.²; Maugeri Filho, F.¹

¹Laboratory of Bioprocess Engineering, Faculty of Food Engineering,
University of Campinas – UNICAMP, 13083-862, Campinas-SP, Brazil

²Laboratory of Genomic and Expression, Institute of Biology,
University of Campinas – UNICAMP, 13083-870, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT

Cellulases are enzymes that form a complex capable of acting on cellulosic materials, promoting hydrolysis. These biocatalysts are highly specific enzymes that act in synergy to release sugars of which glucose is of greatest interest to industry because it can be easily converted to bioethanol. This work aimed to study the characterization and purification of cellulases produced by *Acremonium strictum* isolated from Brazilian biome. For the precipitation of enzymes methods with 70% ethanol and 60% acetone were tested, where the method using acetone had the highest percentage recovery, registering 80.67% for endoglucanases (CMCase), 65% for filter paper activity (FPase) and 25% for cellobiase. The enzymes, previously precipitated, were characterized according to their pH and temperature profiles. The optimal temperature and pH of the enzymes were determined using the Central Composite Rotational Design. For the purification of enzymes, two resins were tested, Streamline-DEAE and Q-Sepharose using Fast Protein Liquid Chromatography. The Q-Sepharose resin was more efficient in the purification of cellulases produced by *Acremonium strictum*. The enzymes purified on FPLC were subjected to trypsin digestion and then injected into liquid chromatograph coupled to mass spectrometer (ESI-TOF-QUAD), for identification of peptides present in the samples. Two potential cellulolytic enzymes were identified: endoglucanase of the family 74a and β -glucosidase.

Key words: Cellulases, Characterization, Purification, Peptides, *Acremonium strictum*.

3.1 INTRODUCTION

Cellulose is the primary product of photosynthesis in terrestrial environments, and the most abundant renewable bioresource produced in the biosphere (~100 billion dry tons/year) which can be hydrolyzed with acids and converted into glucose. However, biodegradation of cellulose is also performed by the enzymes produced by various microorganisms, and has encouraged the use of the cellulolytic fermentation processes [1].

A large variety of microorganisms are capable of degrading lignocellulosic biomass, especially fungi, able to degrade cellulose, hemicellulose and lignin in decaying plants utilizing a complex set of excreted hydrolytic and oxidative enzymes [2]. Although many bacteria and fungi degrade cellulose, the products are generally carbon dioxide and methane when grown in media containing such carbohydrates. Only a few fungi strains have shown to be major producers of enzymes, which can extensively degrade insoluble cellulose to soluble sugars [3].

Many studies have been published seeking new microorganisms to produce cellulolytic enzyme with higher specific activity and efficiency. Several strategies are available for improving the production and efficiency of cellulases, including optimization of the fermentation process, genetic modifications and mutagenesis. However, the task of finding a good producer of cellulases still arouses the interest of researchers at present [4, 5]. Currently, there is great interest in finding microorganism species that are not yet cataloged as interesting producers of inputs to industry in general, as well as optimizing production processes of these inputs from known microorganisms [6].

Cellulases are enzymes that form a complex capable of acting on cellulosic materials, promoting its hydrolysis. These biocatalysts are highly specific enzymes that act in synergy to release sugars of which glucose is of great interest to industry because it can be easily converted into ethanol [7].

The set of enzymes involved in degradation of cellulose is referred to as the cellulase complex. Most studies on the cellulase complex refer to microbial enzymes due to their potential to convert insoluble cellulosic material into glucose [1].

Classification of cellulases, according to their place of cleavage in the cellulosic substrate, divides them into three groups: endoglucanase which cleave internal cellulosic fiber bonds, exoglucanases which act on the outer region of the cellulose and β -glucosidases which hydrolyze soluble glucose oligosaccharides [7].

In recent years the interest in production of cellulases has increased due to several potential applications, such as the production of bioenergy and biofuels, and application in textile and paper industries [8]. The growing concerns about the shortage of fossil fuels, the emission of greenhouse gases and air pollution by incomplete combustion of fossil fuel have also resulted in an increasing focus on production of bioethanol from lignocellulosics, and especially the possibility of using cellulases to perform enzymatic hydrolysis of the lignocellulosic materials [4].

In the production process of 2nd generation bioethanol, the cost of the enzymes used for hydrolysis must be reduced and the efficiency of these enzymes improved in order to make the process economically feasible [8].

In the production of enzymes for biotechnological processes, depending on the application, purification operations after fermentation must be included in the final production cost. Considering that nearly 90% of biomolecule production costs can be attributed to downstream step [9]. To minimize these costs the selection of suitable methods for separation and purification is very important, as well as the study of optimization of these processes in order to obtain a commercially viable product [6, 10, 11]. Considering this scenario, the goal of the present work was to study the characterization and purification of cellulases present in the fermentation broth produced by *Acremonium strictum* isolated from Brazilian biome.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Microorganism

The *Acremonium strictum* strain (AAJ6) was isolated from Brazilian Biome and selected as a potential producer of cellulases based on previous screening [12]. This microorganism belongs to the bank of cultures in the Laboratory of Bioprocess Engineering (LEB) - FEA/UNICAMP.

3.2.2 Fermentation

The inoculums were cultivated in agar slants (GYMP medium: 2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 1.0% malt extract, 0.2% monobasic sodium phosphate, 2.0% agar and pH 5.5), at 30°C for 96h. Fermentations were performed in shake flasks at 30°C, 150rpm and monitored for 240h. The culture medium consisted of: AVICEL® 20.0g/L, yeast extract 0.60 g/L, KH₂PO₄ 7.0 g/L, K₂HPO₄ 2.0 g/L, MgSO₄.7H₂O 0.15 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, FeSO₄.7H₂O 0.01 g/L and KCl 0.50 g/L [13]. The pH was adjusted to 5.5 with HCl. After 240 hours of fermentation, the broth was centrifuged in a RC26 PLUS refrigerated centrifuge of the brand SORVALL® at 4°C and 18,200 x g for 10 minutes, and the supernatant (crude enzymatic extract) submitted to assays for determination of enzymatic activities.

3.2.2 Enzymatic Activities

3.2.2.1 Endoglucanase Activity

A carboxymethylcellulose (CMC, 1%) solution was prepared in 0.2M sodium acetate buffer (pH4.2). One mL of the CMC solution was incubated with 1 mL of the crude enzymatic extract at 50°C for 10min [14] and the amount of reducing sugar was measured by the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) reagent method according to Miller [15]. One unit of endoglucanase activity, also called CMC_{Case}, is defined as the amount of the enzyme that released 1µmol of glucose per minute from the original CMC at the experimental conditions.

3.2.2.2 Filter Paper Activity

Total cellulase activity was determined by the filter paper assay procedure [16]. The assay system had a total volume of 2 mL, consisting of 1 mL of crude enzymatic extract and 1 mL of 0.2M sodium acetate buffer (pH4.2) and 50 mg of Whatman filter paper N° 1, incubated for 60 min at 50 °C. The amount of reducing sugar was measured by the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) reagent method, according to Miller [15]. One unit of filter paper activity, also referred to as FPase, is defined as the amount of the enzyme that released 1 μ mol of glucose per minute from the original filter paper at the experimental conditions.

4.2.2.3 Cellobiase Activity

Cellobiase activity was measured according to a reaction mixture containing a solution of cellobiose in 20mm acetate buffer 0.2M, pH5.2. One mL of the cellobiose solution was mixed with 1 mL of crude enzymatic extract and incubated at 50 °C for 30 min. The amount of reducing sugar was then measured by a commercial enzymatic kit containing glucose oxidase [17]. One unit of cellobiase activity is defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of glucose per minute from the original cellobiose, at the experimental conditions.

3.2.2.4 β -glucosidase Activity

To determine the β -glucosidase activity was measured the method described by Afolabi [18] utilized a substrate solution containing 1mg/mL of pNPG (*p*-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside) in 0.2 M acetate buffer, pH 5.2. A volume of 0.1 mL of crude enzymatic extract added to 1.9 mL of substrate and incubated for 30 min at 50 °C. Subsequently, 0.5 mL of 2% sodium carbonate was added and the quantification performed in a spectrophotometer at 405 nm.

3.2.3 Determination of Proteins

The protein concentration was determined according to the methodology proposed by Lowry *et al.* [19] using bovine serum albumin (Sigma) as a standard. Readings were taken in a spectrophotometer at 750 nm.

3.2.4 Precipitation with 70% Ethanol

Ethanol precipitation was performed according to the methodology described in Santos [20]. Anhydrous alcohol with 99.3 % (v/v) stored at -20 °C was slowly added until reaching the concentration of 70 % (v/v) under gentle stirring, with the aid of magnetic stirrers (Hanna® HI 190M) and jacketed reactors water bath (Tecnal TE® 184) to maintain the temperature at 2 °C and to minimize enzyme denaturation. After the addition of ethanol, the solution was immediately centrifuged at 18,200 x g for 15 min from 4 to 6 °C in a RC26 PLUS refrigerated centrifuge brand SORVALL®. The precipitate containing the enzyme was resuspended in 0.2 M acetate buffer, pH 5.2, and analysis of enzyme activities was subsequently performed (Endoglucanase, Filter Paper and Cellobiase) as well as protein concentration as described above. Finally, the percentage of enzyme recovery and the purification factor were calculated according to Equations 1 e 2.

$$\% \text{ Enzyme Recovery} = \frac{\text{Total Activity (U)}}{\text{Initial Total Activity (U)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 01})$$

$$\text{Purification Factor} = \frac{\text{Specific Activity (U/mg)}}{\text{Initial Specific Activity (U/mg)}} \quad (\text{Eq. 02})$$

3.2.5 Precipitation with 60% Acetone

Precipitation with acetone was performed as was conducted with ethanol described in section 3.2.4. However, the acetone used had 99.5 % (v/v) and was added until reaching a saturation of 60 % (v/v), according to the methodology proposed by Mawadza *et al.* [21].

3.2.6 Concentration by Nanofiltration

The enzymatic extract was concentrated by nanofiltration in cylindrical cell under stirring, using a NP010 Microdyne Nadir membrane with average diameter of 1.4857 nm, molecular weight of 1 kDa and permeability of 6.47×10^{11} m/Pa.s. Initially the membrane was conditioned with Milli-Q water at a pressure of 3000 kPa and temperature of 2 °C. After conditioning of the membrane, 100 mL of the enzymatic extract were filtered using a pressure of 2000 kPa and temperature of 2 °C until collecting approximately 90 mL and retaining 10 mL. Tests were later performed on enzyme activities (Endoglucanase, Filter Paper and Cellobiase) and protein concentrations described above for determining the percentage recovery of the enzyme.

3.2.7 Characterization: Temperature and pH profile

The enzymes, previously precipitated (after determining the best recovery method), were characterized regarding their pH and temperature profile as function of enzyme activity. Optimal temperature and pH of the enzymes were determined using a Central Composite Rotational Design [22]. Four CCRD (Central Composite Rotational Design) were performed with two independent variables (temperature and pH) for the enzymatic activity studies. Enzymatic activities were determined as function of temperature and pH using the methodologies described previously. The software Statistic 6.0 was used to analyze the results. The ranges of parameters used in the CCRD were determined according to the literature, being the temperature range studied varied from 43 °C to 57 °C and the pH varied from 4.7 to 5.7, as can be seen in Table 3.1.

Table 3.1. Values used in the CCRD to determine the optimal temperature and pH of the enzymes from *Acremonium strictum*.

Levels	- 1.41	-1	0	+1	+1.41
Temperature (°C)	43	45	50	55	57
pH	4.7	4.9	5.2	5.5	5.7

3.2.8 Purification by FPLC

After defining the best recovery method (precipitation and/or concentration) and characterizing the enzymes with regards to their pH and temperature profiles as function of enzyme activity, the enzymes present in the precipitated enzymatic extract were purified by ion exchange chromatography using Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). Two resins were tested: Streamline-DEAE and Q-Sepharose, assembled as a 10 mL packed bed. Several tests were performed and the following operating conditions were established: injection of 10 mL of enzyme (60% acetone-precipitated and resuspended in 0.2 M acetate buffer, pH 5.2), a flow gradient from 0 to 1 M NaCl in 0.05 M phosphate buffer, pH 7, and collecting 2 mL fractions. Enzymatic activities were later determined (Endoglucanase, Cellobiase, β -Glucosidase) for construction of chromatography absorbance peaks (FPLC).

3.2.9 Electrophoresis SDS-PAGE

Electrophoresis SDS-PAGE was used to separate the proteins and to estimate their molecular weight. This process was performed in 10% (w/v) polyacrylamide gel according the protocol proposed by Laemmli [23].

3.2.10 Identification of Peptides by Mass Spectrometry

About 500 μ L of eluted fractions from chromatography (FPLC) were precipitated with 10% trichloroacetic acid and resuspended into 100 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate. Proteins were then digested with a trypsin solution 20 ng/ μ L in 1 mM calcium chloride and incubated for 16 hours at 37 °C. The reaction was stopped by adding 0.1% formic acid and stored at -20 °C. For the identification of peptides, samples were injected into liquid chromatograph coupled to mass spectrometer (ESI-TOF-QUAD), at a flow rate of 0.6 μ L/min. The gradient was 2% to 90% acetonitrile in 0.1% formic acid over 60 minutes. The spectra were acquired using the software MassLynx v.4.1 (Waters - Milford, MA, USA) and the raw data files were converted to a peak list format (mgf), without summing the scans, by the software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.). These were then searched against the CAZy Database using Mascot v.2.3.01 engine

(Matrix Science Ltd.), with carbamidomethylation as the fixed modification, oxidation of methionine as a variable modification, one trypsin missed cleavage and a tolerance of 0.1 Da for both precursors and fragment ions. Only peptides with a significance threshold of $p < 0.05$ (Mascot-based score) were considered as a product of peptide cleavage [24].

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Recovery: Precipitation and Concentration of Enzymes

The microorganism, *Acremonium strictum*, was subjected to fermentation in culture medium containing commercial cellulose (AVICEL®) to induce the production of the cellulase enzyme complex. After 240 hours, the fermentation broth was centrifuged to remove the biomass and subjected to studies of precipitation and concentration of enzymes present in the crude enzymatic extract.

For recovery of enzymes present in the crude enzymatic extract several methodologies were tested, including ethanol precipitation (saturation of 70%), acetone precipitation (saturation of 60%) and concentration by nanofiltration with membrane cut-off of 1 kDa (NP010). The results obtained by different methodologies were tested with regards to percentage of enzyme recovery and purification factor, as shown in Table 3.2.

Analyzing Table 3.2, it was verified that the methodology employing acetone (60% saturation) for the precipitation of enzymes presented the best results of enzyme recovery, registering 80.67% recovery of endoglucanases (CMCase), 65% of FPase and 25% of cellobiase. The calculated purification factor was the highest (8.88) recorded for endoglucanase activity and also presented the highest recovery percentage (80.67%).

These values obtained for acetone precipitation were quite satisfactory and superior to many reported in the literature. Mawadza *et al.* [21] used a methodology employing acetone (55% saturation) for precipitation of cellulases from *Bacillus sp.* For the particular strain of *Bacillus* CH43, a 59% recovery was obtained but with a purification factor of only 0.6. For the strain named HR68, the average recovery was 64.5% and purification factor 2.5.

Table 3.2. Results for different methods employed in the precipitation and recovery of the enzymes from *Acremonium strictum*.

	Total Activity (U)	Specific Activity (U/mg)	Factor of Purification	Percent Recovery (%)
Crude Enzymatic Extract				
CMCase	4.00	0.139	1	100
FPase	0.60	0.021	1	100
Cellobiase	0.20	0.007	1	100
Precipitation: 70% Ethanol				
CMCase	0.49	0.225	1.62	12.25
FPase	0.07	0.032	1.54	11.67
Cellobiase	0.02	0.008	1.14	10.00
Crude Enzymatic Extract				
CMCase	3.00	0.119	1	100
FPase	0.40	0.016	1	100
Cellobiase	0.20	0.008	1	100
Precipitation: 60% Acetone				
CMCase	2.42	1.057	8.88	80.67
FPase	0.26	0.114	7.15	65.00
Cellobiase	0.05	0.022	2.75	25.00
Crude Enzymatic Extract				
CMCase	2.00	0.078	1	100
FPase	0.60	0.023	1	100
Cellobiase	0.10	0.004	1	100
Nanofiltration: NP010 (1 kDa)				
CMCase	0.70	0.203	2.61	35.00
FPase	0.14	0.041	1.74	23.33
Cellobiase	0.02	0.006	1.49	20.00

Kavian *et al.* [25] studied different precipitation methods for cellulases produced by *Lumbricus rubellus* and *Trichoderma viride*, utilizing precipitation with acetone and ammonium acetate. However, when employing acetone precipitation for the enzyme extract, purification factors of 2.24 and 4.75 were registered for *Lumbricus rubellus* and

Trichoderma viride, respectively. Both values were lower than those recorded for enzymes produced by the microorganisms in the present study (*Acremonium strictum*) where 60% acetone was used for precipitation of endoglucanases, whose purification factor was 8.88, 7.15 for total cellulase (FPase), and 2.75 for cellobiase. Thus, the precipitation process with acetone showed to be efficient and can be employed for recovery of cellulases produced by *Acremonium strictum*.

Precipitation with ammonium sulfate was also tested in different saturations (70, 80 and 90%), but in the condition studied it was not possible to verify the precipitation of enzymes. This method is very frequently cited in literature for precipitation of cellulases, however for the enzymes investigated it was not satisfactory. The enzyme precipitation methodology employing ethanol is also widely used in the recovery of several enzymes; however it showed the worst results of recovery for the enzymes under study, registering average recoveries of 12.25% for CMCcase, 11.67% for FPase and only 8% for cellobiase (Table 3.2). Among the two organic solvents tested for precipitation of cellulases from *Acremonium strictum*, results with acetone prevailed over those obtained using ethanol.

In the nanofiltration process, by not using solvent it was expected to obtain satisfactory values of enzyme concentration and recovery, but this was not verified. As can be seen in Table 3.2, in this process a recovery percentage of 35% was obtained for CMCcase, 23.33% for FPase and 20% for Cellobiase. These values are greater than those registered for precipitation with ethanol, however lower than those obtained for precipitation with acetone.

3.3.2 Characterization Enzymatic: Temperature and pH Profile

After determining the best recovery method (60% acetone), the previously precipitated enzymes were characterized with regards to their pH and temperature profiles. The optimal temperature and pH of the enzymes were determined using a Central Composite Rotational Design, as can be visualized in the Table 3.3 which presents the matrix of the CCRD.

Table 3.3. Matrix of the CCRD (Central Composite Rotational Design) to determine the optimal temperature and pH of the enzymes from *Acremonium strictum* precipitated with 60% acetone.

Tests	pH	Temperature (°C)	CMCase (U/mg)	FPase (U/mg)	Cellobiase (U/mg)	β-glucosidase (U/mg)
1	(-1) 4.9	(-1) 45	0.614	0.258	0.285	0.567
2	(+1) 5.5	(-1) 45	0.853	0.220	0.276	0.549
3	(-1) 4.9	(+1) 55	0.548	0.272	0.505	0.729
4	(+1) 5.5	(+1) 55	0.698	0.052	0.368	0.650
5	(-1.41) 4.7	(0) 50	0.455	0.314	0.342	0.644
6	(+1.41) 5.7	(0) 50	0.638	0.056	0.295	0.688
7	(0) 5.2	(-1.41) 43	0.398	0.038	0.239	0.585
8	(0) 5.2	(+1.41) 57	0.445	0.019	0.549	0.641
9	(0) 5.2	(0) 50	0.516	0.066	0.365	0.644
10	(0) 5.2	(0) 50	0.578	0.060	0.332	0.671
11	(0) 5.2	(0) 50	0.534	0.056	0.356	0.632

To analyze the effects of the Central Composite Rotational Design and verify that there was no significant difference at the 5% significance level ($p < 0.05$), Pareto charts were constructed (Figure 3.1).

The temperature and pH studied in the CCRD (Central Composite Rotational Design) did not influence the endoglucanase activity at 5% significance, as can be observed in Figure 3.1a, where the effects of the parameters were lower than the “critical t” (2.57). The critical t-value provides the cut-off probability for observation of a t-distribution at the significance level of 5% ($p < 0.05$). Thus, it can be verified for the pH range of 4.7 to 5.7 and temperature range of 43 to 57°C, the values obtained for CMCase activity of *Acremonium strictum* do not statistically differ ($p < 0.05$).

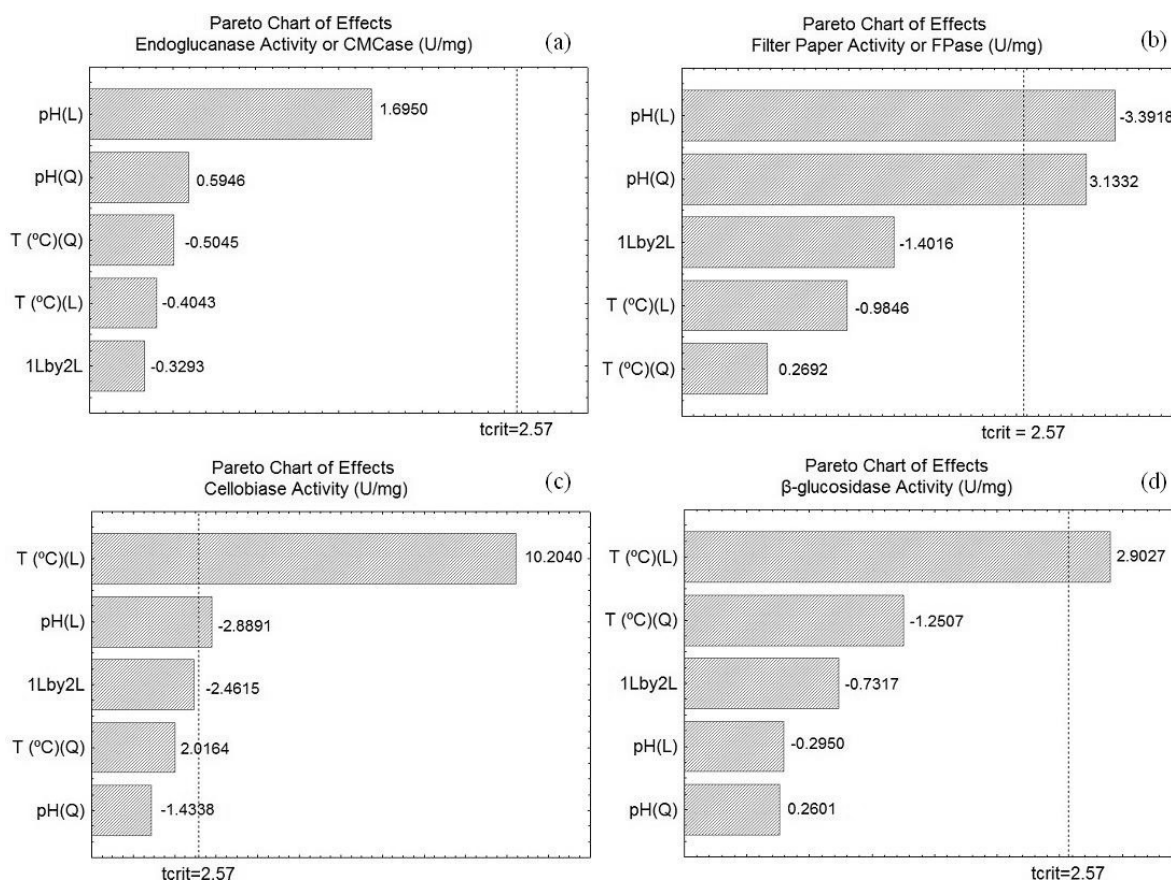


Figure 3.1. Pareto charts of the effects of pH and temperature (linear L and quadratic Q) on enzymatic activity by *Acremonium strictum*: a) endoglucanase activity or CMCase; b) filter paper activity; c) Cellobiase activity; d) β -glucosidase activity.

Observing Figure 3.1b, the linear pH and quadratic pH presented significant effects at the significance level of 5% for determining filter paper activity. The interaction of temperature and pH was not significant ($p < 0.05$), however when analyzing the results in Table 3.3 it is observed that enzyme activity at the axial points had an influence on the interaction of temperature and pH, not discarding this effect for the calculation of regression coefficients.

For cellobiase activity (Figure 3.1c), 3 parameters were considered significant ($p < 0.05$) for determining the regression coefficients, which are: temperature, linear pH and the interaction between pH and temperature. The parameters of quadratic pH and

temperature were ignored. Figure 3.1d presents the Pareto chart for analysis of the effects on β -glucosidase activity, registering significant effects at the level of 5% significance for only the linear temperature parameter.

To determine the regression coefficients, only significant effects ($p < 0.05$) were considered. In order to check the validity of the regression coefficients and mathematical models, an analysis of variance (ANOVA) for three enzymatic activities (filter paper, cellobiase and β -glucosidase activity) was performed (Table 3.4).

It can be observed that the value of F calculated for the regression, considering all enzymatic activities, was higher than the value of F tabulated, and the percentage of variation (R^2) explained for the 3 models was greater than 79.67, 89.73 and 52.52%, respectively. The first two models showed a very good coefficient of variation, and it can thus be concluded that the values predicted by the model fit to the experimental values, validating the models. However, the coefficient of variation for the third model (β -glucosidase activity), due to the very low value (52.52%), cannot be considered valid because it does not fit well to the predicted model.

Table 3.4. Analysis of variance (ANOVA) for three enzymatic activities (filter paper, cellobiase and β -glucosidase activity) that showed significant differences ($p < 0.05$) to pH and temperature profile.

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F_{cal}/F_{tab}	R^2
Filter Paper Activity					
Regression	0.0998	3	0.0333	2.102	79.67
Residual	0.0255	7	0.0036		
Total	0.1253	10			
Cellobiase Activity					
Regression	0.0801	3	0.0267	4.687	89.73
Residual	0.0092	7	0.0013		
Total	0.0893	10			
B-glucosidase Activity					
Regression	0.0126	1	0.0126	1.677	52.52
Residual	0.0132	9	0.0015		
Total	0.0279	10			

p -value < 0.00001 ; F_{cal} =F calculated; F_{tab} =F tabulated.

The valid models, with the coded variables, represent enzymatic activity (U/mg) as a function of temperature (°C) and pH for the enzymes from *Acremonium strictum* that are represented by the following equations, respectively:

$$\text{Filter Paper Activity} = 0.068 - 0.078 (\text{pH}) + 0.083 (\text{pH}^2) - 0.046 (\text{pH}) \times (\text{Temperature})$$

(Eq. 3)

$$\text{Cellobiase Activity} = 0.356 - 0.027 (\text{pH}) + 0.094 (\text{Temperature}) - 0.032 (\text{pH}) \times (\text{Temperature})$$

(Eq. 4)

Having defined the models, contour curves (Figure 3.2) were constructed in order to obtain the best temperature and pH conditions for the enzymatic reactions.

From these curves it can be observed that the optimal temperature and pH varies with the enzyme under consideration. In the present study the pH and temperature ranges were not excessively large, pH (4.7 to 5.7) and temperature (43 to 57°C), precisely the range that literature considers ideal, in order to verify even small variations can cause large differences to the process. According to Chi *et al.* [26], the optimal pH of purified cellulases from fungi is in the range of pH 5.0 to pH 6.0 and optimal temperature from 40 to 70°C.

Almeida [27] studied cellulases and hemicellulases from species of *Acremonium* endophytes and detected the greatest endoglucanase activity from *Acremonium sp. EA0810* at pH 5.0 and 70°C, since for FPase activity, optimal pH and temperature were pH 6.0 and temperature 55°C.

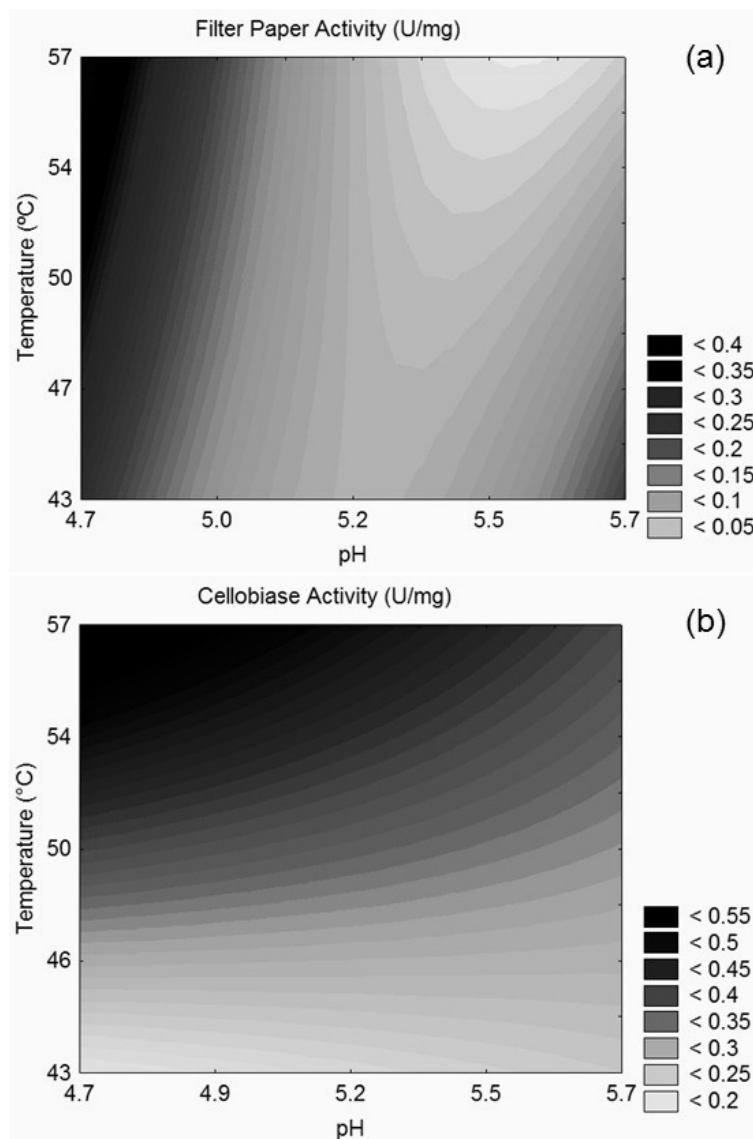


Figure 3.2. Contour curves for enzymatic activity of *Acremonium strictum* as a function of pH and temperature: (a) filter paper activity; (b) cellobiase activity; p-value < 0.00001.

Filter paper activity of cellulases produced by *Acremonium strictum* showed an optimum temperature range of approximately 50 to 57°C and pH of 4.7, as can be visualized in Figure 3.2a, where the highest enzymatic activity is in the darker region of the graph corresponding to values near 0.4 U/mg. To validate this result, a temperature of 55°C and pH of 4.7 were tested, obtaining an average (triplicate) FPase activity of 0.356 U/mg.

A similar behavior was observed for the cellobiase enzyme, whose optimum conditions were in the temperature range of 54 to 57°C and pH range of 4.7 to 4.9 (Figure 3.2b). Assays in triplicate of cellobiase activity at a temperature of 55°C and pH of 4.7 were also performed to validate the results, observing an average activity of 0.562 U/mg. These results are similar to the values found by Qui *et al.* [28] who studied the purification and characterization of endoglucanases of *Trichoderma reesei* and obtained an optimum pH range of 4.6 to 5.0 and optimum temperature of 50°C.

Regarding β -glucosidase produced by *Acremonium strictum*, the model was not considered valid and therefore it was not possible to analyze the contour curve, however, when analyzing the results obtained in the Pareto chart (Figure 3.1d) and the results of Table 3.3, it is understood that the only parameter that directly influence β -glucosidase activity was temperature. Higher temperatures are required for greater enzyme efficiency, from 54 to 57°C, while the pH range studied did not affect β -glucosidase activity at the significance level of 5%.

As can be observed, the contour curves (Figures 3.2a and 3.2b) for both cellulolytic enzymes presented optimum temperatures which were at the maximum of the temperature range studied in the experimental design. Regarding pH, there is a predominance of more acid pH levels. This directs further studies for characterizing these enzymes which should utilize higher temperatures and more acidic pH levels. This characteristic of cellulases presenting activity at high temperatures may be of interest to the textile and detergent industries because it can be easily inactivated at room temperature after utilization [26]. In general, cellulases produced by filamentous fungi have optimal pH values in the acidic range (3.6 to 5.0), and optimum temperature around 50°C [7].

3.3.3 Purification of Enzymes

Cellulolytic microorganisms produce complex enzyme systems which present considerable fractionation problems. Ion-exchange chromatographic methods have been used most often. In this work, the enzymes present in the previously precipitated enzymatic

extract were purified by ion exchange chromatography using Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), and two resins were tested: Streamline-DEAE and Q-Sepharose.

Figures 3.3a and 3.3b exhibit the chromatograms obtained by FPLC during purification of enzymes present in the enzymatic extract (precipitated with acetone 60%) using the Streamline-DEAE and Q-Sepharose resins, respectively.

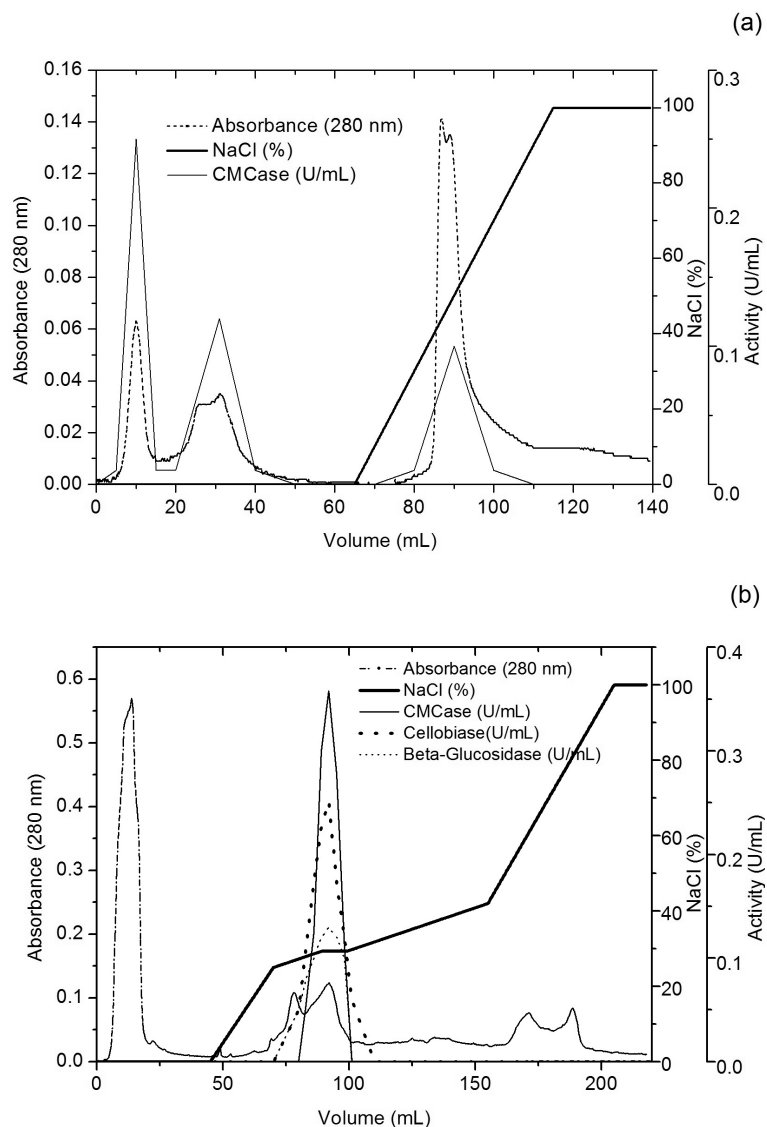


Figure 3.3. Chromatogram obtained by FPLC for purification of the enzymes from *Acremonium strictum* present in the enzymatic extract (precipitated with acetone 60%):
a) Streamline-DEAE resin; b) Q-Sepharose resin.

Analyzing the chromatogram of Figure 3.3a we can observe five recorded absorbance peaks, of which three peaks were recorded in the washing step. Following the initiation of NaCl gradient, in the saturation range of 40-50% 2 more peaks were detected. Subsequently the fractions were analyzed for the activities of endoglucanase (CMCase) as shown in Figure 3.3a, where the major peaks of activity were recorded in the washing step, demonstrating that most of the enzymes did not adhere to the resin under study (Streamline-DEAE) and were eliminated during the washing step. The resolution the chromatogram during implementation of the NaCl gradient was also not satisfactory, since two peaks were partially overlapped. This demonstrates the low efficiency of Streamline DEAE resin for purification of cellulases present in the enzymatic extract produced by *Acremonium strictum*.

The second resin tested was Q-Sepharose. This resin presented good results in the initial tests, however several assays were performed to generate a satisfactory degree of purity. As can be observed in Figure 3.3b, in the fractions collected by FPLC the three enzymatic activities were analyzed (endoglucanase, cellobiase and β -glucosidase) where all presented peaks in activity with 29% NaCl saturation, with no significant losses during washing which indicates the adherence of the enzyme to the resin employed (Q-Sepharose).

Quin *et al.* [28], studied the purification of endoglucanases of *Trichoderma reesei* using ion-exchange chromatography (CM-Sepharose resin), obtained a separation profile very similar to that recorded in the chromatogram of this study (Figure 3.3b), presenting a single peak of CMCase activity and retaining 80% of the original CMCase activity.

Considering Figure 3.3b), not only the CMCase activity was determined, but it was also possible to determine the activity of β -glucosidase and cellobiase. With analysis of fractions collected by chromatography, it was possible to observe that the enzymes showed maximum activity in a single absorbance peak. Other tests were performed to extend the period of the salt gradient, however the same pattern was always observed. Thus, we can note that the enzymes analyzed presented a very similar molecular weight.

To better visualize these results and estimate the molecular weight of enzymes, gel electrophoresis SDS-PAGE was carried out, as can be visualized in Figure 3.4.

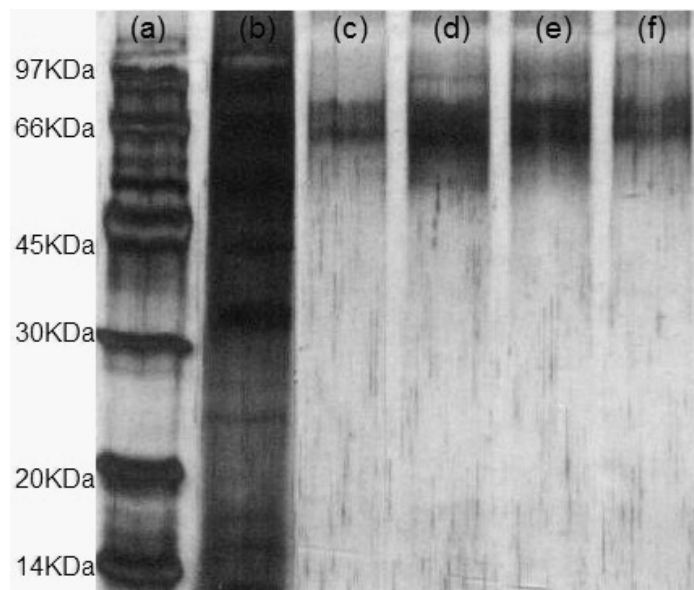


Figure 3.4. Electrophoresis Gel used to separate the enzymes from *Acremonium strictum* according to molecular weight. (a) standard, (b) crude enzymatic extract, (c to f) fractions of 2 mL collected from the chromatograph (FPLC) when using the Q-Sepharose resin, where maximum enzymatic activity was recorded.

Analyzing Figure 3.4, one can see that the fractions collected by chromatography, although quite thick, appeared in only a single band, different from what occurred with the crude enzymatic extract which was very concentrated. This caused the dark color of the gel, but even so it is possible to observe the presence of many bands. However, it can be concluded that the ion-exchange chromatography was a very efficient method for the purification of proteins present in the enzymatic extract produced by *Acremonium strictum*.

From the electrophoresis gel used to separate the enzymes according to molecular weight, it is possible to determine the approximate molecular weight of the cellulase complexes present in the extract produced by *Acremonium*, which was approximately 70 kDa. Almeida [27] performed the zymogram analysis of the crude enzyme from *Acremonium sp. EA0810* and detected endoglucanases of approximately 61.6 kDa and xylanases of about 27.8 kDa.

Zhou *et al.* [8] studied the identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* and found a wide variation range of

molecular weights (21 kDa to 110 kDa) and the pI (isoelectric point) ranged from 4.2 to 6.2. Among the enzymes identified for this authors, the Cel7a (celobiohidrolase) presented weight molecular of 67 kDa and pI 4.2. The variations in molecular weight and pI are closely linked to the family of which the enzymes belong for example, β -glucosidase typically has a higher molecular weight than endo or exoglucanase.

3.3.4 Identification of Peptides

The enzymes purified on FPLC were subjected to trypsin digestion and then injected into liquid chromatograph coupled to mass spectrometer (ESI-TOF-QUAD) for the identification of peptides present in the samples. The spectra were analyzed by Mascot Ions-Search Software (Matrix Science, London, GB, UK) for protein identification using a database containing all non-redundant proteins derived from the CAZy website [29], a specialized database (up to 67,000 protein sequences) that describes the families of structurally related catalytic and carbohydrate-binding modules (or functional domains) of enzymes that degrade, modify or create glycosidic bonds. After spectra acquisition, using a stringent cut-off (cut-off >32; significant at $p < 0.05$) allowed the explicit assignment of 9 unique peptides as glycoside hydrolases (GHs) and hypothetical proteins from microorganisms near the phylogeny (Table 3.5).

For identification of peptides present in the samples was using a confidence criterion of two or more unique peptides of different peptide sequences [30]. Two potential cellulolytic enzymes were identified using the CAZy database: endoglucanase of the family 74a and β -glucosidase. The sequence of peptide R.TDIGGLYR.L presented the confidence criterion for identification of peptides and was reported in the literature as member peptide of endoglucanase of the family 74a from *Hypocrea jecorina*. Since the sequences K.LVYTIAK.S and K.HYILNEQELNR.E are reported in the literature as members peptides of β -glucosidase (~78 kDa) found in microorganisms *Hypocrea jecorina* and *Trichoderma viride*, also presented to the confidence criterion mentioned above.

Chhabra and Kelly [31] studied the biochemical characterization of *Thermotoga maritima* endoglucanase of the family 74a, and reported that Cel74a is encoded by an open

reading frame of 2124 bp corresponding to a polypeptide of 79 kDa with a signal peptide at the amino-terminus.

Table 3.5. Peptides identified into liquid chromatograph coupled to mass spectrometer (ESI-TOF-QUAD) using a database containing all non-redundant proteins derived from the CAZy website.

Peptide	Protein	Number
K.LVYTIAK.S	β -D-glucoside glucohydrolase (<i>Hypocrea jecorina</i>)	AAA18473
	β -D-glucoside glucohydrolase (<i>Trichoderma viride</i>)	AAQ76093
	β -D-glucoside glucohydrolase I (<i>Trichoderma viride</i>)	ACS93768
	β -glucosidase (<i>Trichoderma SP. SSL</i>)	ACH92574
K.HYILNEQELNR.E	β -D-glucoside glucohydrolase (<i>Hypocrea jecorina</i>)	AAA18473
	β -D-glucoside glucohydrolase (<i>Trichoderma viride</i>)	AAQ76093
	β -D-glucoside glucohydrolase I (<i>Trichoderma viride</i>)	ACS93768
R.TDIGGLYR.L	endoglucanase family 74a (<i>Hypocrea jecorina</i>)	AAP57752
	hypothetical protein (<i>Podospora anserina</i>)	CAP66717
	Hypothetical protein (<i>Magnaporthe grisea</i>)	EAA48924
R.HFDANGIEPR.F	β -glucosidase (<i>Schizophyllum commune</i>)	AA33925
R.LESYNYPGR.Y	putative glycosylhydrolase (<i>Streptomyces scabei</i>)	CGB68787
R.TLLESVESR.L	putative protein glucan (<i>Diaprepes abbreviatus</i>)	AAV68692
R.ALFGMLWAFPGR.K	1,4-alpha-glucan branching enzyme (<i>Azoarcus sp. BH72</i>)	CAL94413
R.KGDTDIFR.T	glycosidase hydrolase family 57 (<i>Denitrovibrio acetiphilus</i>)	ADD67236
R.EAEFTLPEK.L	oligo-1,6-glucosidase (<i>Paenibacillus sp.</i>)	AAQ91295

Cairo *et al.* [24] performed the metaproteomic analysis from the whole body of the lower termite *C. gestroi*. The proteomic approach identified a large number of polypeptides in the *C. gestroi* digestome. Potential cellulolytic enzymes were identified using the same criterion used in our study, such as the match to probable β -glucosidase (family GH3) from *Dictyoglomus turgidum*, two GH7 protein matches, one derived from *Pleurotus sp.* and another from the uncultivated symbiotic protist *Hodotermopsis sjoestedti*,

as well matches to GH9, from *Reticulitermes flavipes* and *C. formosanus*, which are endogenous cellulases from termites.

3.4 CONCLUSION

In the studies of enzyme concentration, the method utilizing 60% acetone for enzyme precipitation presented the best recovery percentages, registering 80.67% for endoglucanases (CMCase), 65% for filter paper activity (FPase) and 25% for cellobiase.

Characterization of the previously precipitated enzymes showed that for endoglucanase activity, temperature and pH had no significant difference at the significance level of 5%. Regarding the enzymes FPase and cellobiase, the optimum temperature range was 54 to 57 °C and optimum pH was 4.7. For the β -glucosidase enzyme, only temperature significantly influenced enzyme activity, favoring higher temperatures (54 to 57 °C).

In relation the enzyme purification, the Q-Sepharose resin was more efficient than the Streamline-DEAE resin for separation and purification of enzymes making up the cellulase complex present in the fermented broth of *Acremonium strictum*. Ion-exchange chromatography was a very efficient method for purification of proteins present in the enzymatic extract produced by *Acremonium strictum*, for which the molecular weight of the cellulase enzyme complex was approximately 70 kDa.

In the identification of peptides present in the proteins produced by *Acremonium strictum*, two potential cellulolytic enzymes were identified: endoglucanase of the family 74a and β -glucosidase.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation) for the Ph.D scholarship and for funding the project.

REFERENCES

1. Zhang, P. H. Y., Himmel, M. E., Mielenz, J.R. (2006). *Biotechnology Advances*, 24, 452-481.
2. Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., Pitarelo, A. P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Bom, E. P. S., Moraes, L. M. P., Araújo, J. M., Torres, F. A.G. (2010). *Bioresource Technology*, 101, 4820-4825.
3. Lee, S. J., Lee, K. S., Kim, S. R., Gui, Z. Z., Kim, Y. S., Yoon, H. J., Kim, I., Kang, P. D., Sohn, H. D., Jin, B. R. (2005). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 140, 551–560.
4. Kitagawa, T., Kohda, K., Tokuhira, K., Hoshida, H., Akada, R., Takahashi, H., Imaeda, T. (2011). *Journal of Biotechnology*, 151(2), 194-203.
5. Sorensen, A., Teller, P. J., Lubeck, P. S., Ahring, B. K. (2011). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 164, 1058-1070.
6. Hernalsteens, S. (2006). Ph.D Thesis, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Brazil.
7. Castro, A. M. and Pereira, N. JR. (2010). *Quim. Nova*, 33(1), 181-188.
8. Zhou, J., Wang, Y.H., Chu, J., Zhuang, Y. P., Zang, S. L., Yin, P. (2008). *Bioresource Technology*, 99, 6826-6833.
9. Moraes, C. C., Mazutti, M. A., Rodrigues, M. I., Maugeri Filho, F. (2009) *J. Chromatogr. A*, 1216, 4395-4401.
10. Atala, D. I. P., Costa, A. C., Maciel Filho R., Maugeri Filho, F. (2001). *Applied Biochem. Biotechnol.*, 91(3), 353-366.

11. Forte, M. B. S., Mazutti, M. A., Maugeri-Filho, F., Rodrigues, M. I. (2011). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16, 1223-1230.
12. Goldbeck, R., Andrade, C. C. P., Maugeri Filho, F. (2010). In: Proceedings of 8th European Symposium on Biochemical Engineering Science - ESBES, Bologna, Italy.
13. Peixoto, A. B. (2006). M.S. Thesis. Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Brazil.
14. Ogawa, K., Toyama, H., Toyama, N. (1982). *J. Ferment. Technol.*, 60(4), 349-355.
15. Miller, G. L. (1959). *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
16. Mandels, M., Sternberg, D. (1976). *J. Ferment. Technol.*, 54, 267-286.
17. Henry, R. J. Cannon, D. C., Winkelman, J. (1974). *Clinical chemistry principles and techniques*, 2nd ed., Harper and Row Publishers Inc, N.Y.
18. Afolabi, O. A. (1997). M.S. Thesis, The University of Akron, Akron, OH.
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.*, 75, 193-265.
20. Santos, A. M. P. (2002). Ph.D Thesis, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Brazil.
21. Mawadza, C.; Hatti-Kaul, R., Zvaunya, R., Mattiasson B. (2000). *J. Biotechnol.*, 83, 177-187.
22. Rodrigues, M. I. and Iemma, A. F. (2005). *Design of Experiments and Process Optimization*, 1nd ed., Casa do Pão Publishing House, Campinas.
23. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680-685.

24. Cairo, J. P. L. F., Leonardo, F. C., Alvarez, T. M., Ribeiro, D. A., Buchli, F., Costa-Leonardo, A. M., Carrazzole, M. F., Costa, F. F., Leme, A. F. P., Pereira, G. A. G., Squina, F. M. (2011). *Biotechnology for Biofuels*, 50(4), 1-10.
25. Kavian, M. F., Ghatnekar, S. D., Kulkarni, P. R. (1999). *Bioresource Technology*, 69, 161-165.
26. Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., Wang, X. (2009). *Biotechnol. Adv.*, 27, 236-255.
27. Almeida, M. N. (2009). M.S. Thesis, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
28. Quin, Y., Wei, X., Liu, X., Wang, T., Qu, Y. (2008). *Protein Expression & Purification*, 58, 162-167.
29. Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009). *Nucleic Acids Res.*, 37, 233-238.
30. Marcotte, E. M. (2007). *Nat. Biotechnol.*, 25, 755-757.
31. Chhabra, S. R., Kelly, R. M. (2002). *FEBS Letters*, 531, 375-380.

CAPÍTULO 4

***CELLULASE PRODUCTION FROM A NEW STRAIN
Acremonium strictum ISOLATED FROM BRAZILIAN BIOME
USING DIFFERENT SUBSTRATES***

**Artigo Submetido:
Bioresource Technology**

CELLULASE PRODUCTION FROM A NEW STRAIN *Acremonium strictum* ISOLATED FROM THE BRAZILIAN BIOME USING DIFFERENT SUBSTRATES

Goldbeck, R.¹; Ramos, M. M.¹; Pereira, G. A. G.²; Maugeri Filho, F.¹

¹Laboratory of Bioprocess Engineering, Faculty of Food Engineering,
University of Campinas – UNICAMP, 13083-862, Campinas-SP, Brazil

²Laboratory of Genomic and Expression, Institute of Biology,
University of Campinas – UNICAMP, 13083-870, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT

Cellulases are enzymes that form a complex capable of acting on lignocellulosic materials, promoting their hydrolysis. These enzymes are highly specific biocatalysts of great industrial interest, especially for the production of bioethanol. The objective of the present study was to evaluate the production of cellulolytic enzymes by the microorganism *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian biome, using different substrates in submerged fermentation. Fermentations were initially carried out using commercial substrates, including microcrystalline cellulose of different brands (AVICEL® and SERVACEL®) and carboxymethylcellulose (CMC). This was followed by fermentations performed using lignocellulosic biomass: sugarcane bagasse (without pretreatment) and bagasse subjected to others three different pretreatments, and also employing the commercial cellulose AVICEL® in parallel, for which the best results of the commercial celluloses were previously obtained. The fermentations were carried out in shakers at 150 rpm and 30°C, with duration of 240 h. To evaluate the cellulolytic activity, four enzyme activities were determined: endoglucanase activity (CMCase), filter paper activity (FPase), cellobiase and β -glucosidase activity. Among the substrates used, results showed that the sugarcane bagasse submitted to mild pretreatment was that which induced the

microorganism under study to produce greater cellulolytic activities. This substrate was then employed in the optimization study of cellulase production by *Acremonium strictum*.

Key words: cellulase, sugarcane bagasse, submerged fermentation, *Acremonium strictum*.

4.1 INTRODUCTION

Around the world the recent return of increasing oil prices, prospects of depletion of nonrenewable resources, geopolitical risks resulting from dependence on oil from politically unstable countries and environmental concerns related to emission of substances that harm the environment have again stimulated interest in alternative energy sources. Currently, biodiesel, hydrogen fuel cells, and especially ethanol became part of the agenda of governments and policies of virtually all country (Bastos, 2007; Soccol *et al.* 2010; Limayem and Ricke, 2012).

The new concept of ethanol (or bioethanol) corresponds to its production utilizing lignocellulosic biomass as a raw material. These raw materials obtained from wastes and residues of natural products (such as corn cobs and straw, and sugarcane bagasse, leaves and straw) are critical to the significant amplification of ethanol production, since production is already nearly limited by the availability of planted area, either by competing with food production or due to relative prices compared to oil and the food itself. The main advantage of ethanol production from sugarcane bagasse in Brazil is the fact that it utilizes a residue which accounts for nearly 10% of total production (Soccol *et al.*, 2010).

Ethanol production from lignocellulosic biomass is performed via chemical (using acids) or enzymatic (using enzymes) for breaking down cellulose and producing sugars, which are then converted to ethanol by conventional alcohol fermentation. The use of biotechnology to convert cellulose into ethanol provides opportunities for companies in the field of enzyme development, especially cellulases and hemicellulases (Peixoto, 2006; Singhania *et al.*, 2010).

Cellulases are glycosyl hydrolases (GH) that play an important role in the bioconversion of cellulosic materials into biofuels (Zhang *et al.*, 2006). They are classified into three major groups according to the location in which they act on the cellulosic

substrate: endoglucanases (EnG), which cleave internal cellulosic fiber bonds; exoglucanases (ExG), which act on the outer region of the cellulose; and β -glucosidases (BG), which hydrolyze soluble oligosaccharides into glucose (Castro and Pereira, 2010).

In recent years the interest in producing cellulases has increased significantly due to several potential applications, such as application in the textile and paper industry, but especially in the production of bioenergy and biofuels (Zhou *et al.*, 2008).

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 reductions in costs of commercial enzymes (claimed by industry), production know-how remains a strategic issue to be considered during the development of a sustainable process for ethanol production from biomass. Moreover, the effectiveness of the enzymatic mixture for hydrolysis is highly dependent on the feedstock and the pretreatment that it receives (Delabona *et al.*, 2012).

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 (Delabona *et al.*, 2012). Moreover, cultivation of the microorganism using the same lignocellulosic material that is intended to be hydrolyzed could be a method of selecting enzymes that are optimal for hydrolysis of that specific material (Jorgensen and Olsson, 2006; Sorensen *et al.*, 2011). Therefore, the objective of the present study was to evaluate the production of cellulolytic enzymes by the microorganism *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian biome. Different substrates were used including commercial microcrystalline cellulose, carboxymethylcellulose and sugarcane bagasse pretreated at different intensities. Optimized conditions were also encountered for cellulase production by *Acremonium strictum*.

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Microorganism

The strain *Acremonium strictum* was selected as a potential producer of cellulases based on previous screening (Goldbeck *et al.*, 2010). This microorganism belongs to the bank of cultures in the Laboratory of Bioprocess Engineering (LEB) - FEA/UNICAMP.

4.2.2 Submerged Fermentations

Inocula were cultivated on agar slants (GYMP medium: 2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 1.0% malt extract, 0.2% monobasic sodium phosphate, 2.0% agar and pH 5.5) at 30°C for 96h. The microorganism was cultivated in submerged fermentation using different substrates in the specific experiments.

Fermentations were initially carried out using commercial substrates, such as microcrystalline cellulose (AVICEL® and SERVACEL®) and carboxymethylcellulose (CMC). Later, fermentations were performed using lignocellulosic biomass: raw sugarcane bagasse (without pretreatment) and bagasse submitted to mild, average and strong pretreatments, and in parallel the commercial cellulose AVICEL® was used, for which the best results were obtained among the commercial celluloses previously studied.

The pretreatment performed on sugarcane bagasse (*Sccharum officinarum*) was steam explosion, where the bagasse was heated to high temperatures under pressure to facilitate access of enzymes to the cellulose fiber. Three treatment conditions were used: mild (12 kgf/cm²; 188.5°C), average (15 kgf/cm²; 198°C) and strong (19 kgf/cm²; 210.4°C), according to the treatment intensity.

The culture medium was composed of 20 g/L of the substrates reported above (in distinct experiments); 0.60 g/L yeast extract; 7 g/L KH₂PO₄; 2 g/L K₂HPO₄; 0.15 g/L MgSO₄.7H₂O; 1 g/L (NH₄)₂SO₄; 0.01 g/L FeSO₄.7H₂O and 0.50 g/L KCl, pH 5.0 (Peixoto, 2006). Fermentations were performed in shakers at 150 rpm and 30°C for 240 h, where samples were acquired at 48 hour intervals. The samples collected were centrifuged in a refrigerated centrifuge at 4°C and 18,200 x g, followed by discarding the precipitate

(microbial cells) and the supernatant (crude enzyme) was submitted to analyses for determination of enzyme activities.

4.2.3 Enzymatic Activities

Endoglucanase Activity or CMC Case Activity: A carboxymethylcellulose (CMC, 1 %) solution was prepared in 0.2M sodium acetate buffer (pH4.2). One mL of the CMC solution was incubated with 1 mL of the crude enzymatic extract at 50°C for 10 min (Ogawa, 1982) and the amount of reducing sugar was measured by the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) reagent method according to Miller (1959).

Filter Paper Activity: Total cellulase activity was determined by the filter paper assay procedure (Mandels, 1976). The assay system had a total volume of 2 mL, consisting of 1 mL of crude enzymatic extract, 1 mL of 0.2M sodium acetate buffer (pH 4.2) and 50 mg of Whatman filter paper N° 1, incubated for 60 min at 50°C. The amount of reducing sugar was measured by the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) reagent method, according to Miller (1959).

Cellobiase Activity: Cellobiase activity was measured using a reaction mixture containing a solution of cellobiose in 20 mm acetate buffer 0.2M, pH5.2. One mL of the cellobiose solution was mixed with 1 mL of crude enzymatic extract and incubated at 50°C for 30 min. The amount of reducing sugar was then measured using a commercial enzymatic kit containing glucose oxidase (Henry, 1974).

β -glucosidase Activity: To determine the β -glucosidase activity, the method described by Afolabi (1997) utilized a substrate solution containing 1 mg/mL of pNPG (*p*-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside) in 0.2 M acetate buffer, pH 5.2. A volume of 0.1 mL of crude enzymatic extract was added to 1.9 mL of substrate and incubated for 30 min at 50 °C. Subsequently, 0.5 mL of a 2% sodium carbonate was added and quantification performed in a spectrophotometer at 405 nm.

One unit (U) of endoglucanase, filter paper, and cellobiase or β -glucosidase activity is defined as the amount of the enzyme that released 1 μ mol of glucose per minute from the substrate, at the three experimental conditions described above.

4.2.4 Optimization of Enzyme Production

For optimization of cellulase production a Plackett & Burman design was carried out with 12 trials and three repetitions of the central point, totaling 15 trials, in order to assess the effects of the major process variables (Rodrigues and Iemma, 2005). The ranges of the independent variables used in the design were determined according to the literature and are shown in Table 4.1. In the Plackett & Burman Design was added to the variable Molasse concentration, in order to verify if the inrequecimento culture medium with this nutrient (sugar cane molasses) encourage increasing of the cellulolytic activity produced by *Acremonium strictum*. Process responses (dependent variables) were the activities of CMC_{Case} and β -glucosidase. The analysis of the effects of each independent variable was analyzed with the aid of the software Statistic 9.0.

Table 4.1. Independent variables and levels used in the Plackett & Burman Design for optimization of cellulases production by *Acremonium strictum*.

Variables	Levels		
	-1	0	1
Bagasse concentration (g/L)*	16	33	50
Molasse concentration (g/L)**	2	6	10
Agitation (rpm)	100	150	200
pH	5	6	7
Temperature ($^{\circ}$ C)	25	28	30

* Moisture content (d.b.) of the bagasse used was 65% (p/p).

** The concentration of total reducing sugars in the molasses used was 20% (p/v).

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Fermentations: Commercial Cellulose

Activities of CMCCase, FPase, cellobiase and β -glucosidase were recorded over the 240 hours of fermentation of *Acremonium Strictum*, employing three different inductors: microcrystalline cellulose of different brands (AVICEL® and SERVACEL®) and carboxymethylcellulose (CMC), as can be observed in Figures 4.1a to 4.1d.

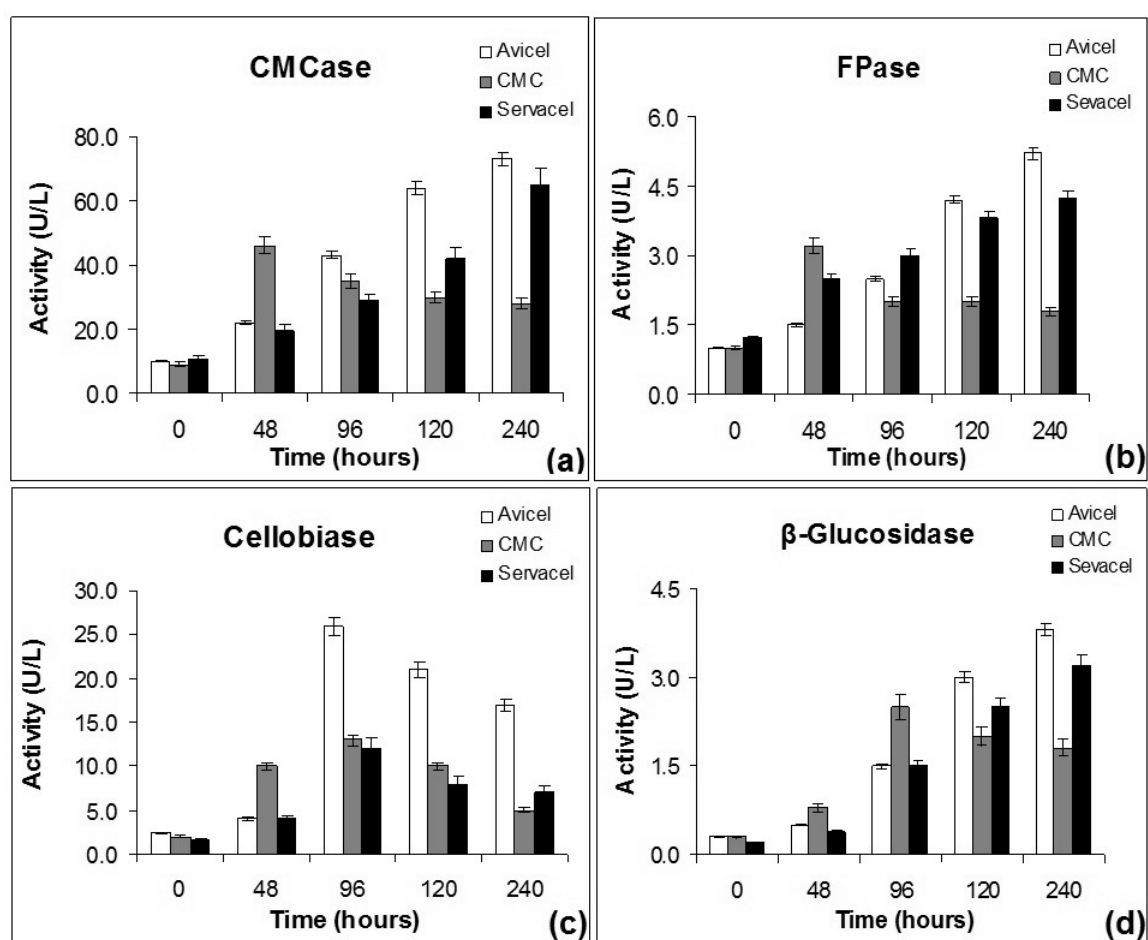


Figure 4.1. Comparison of the enzyme activities from *Acremonium strictum* using commercial substrates, such as microcrystalline cellulose (AVICEL® and SERVACEL®) and carboxymethylcellulose (CMC) during 240 hours of fermentation: a) CMCCase activity, b) FPase activity, c) Cellobiase activity d) β -glucosidase activity.

Analyzing Figures 4.1a and 4.1b, it is observed that the highest activities encountered for CMCase and FPase are obtained when cultivated using the microcrystalline cellulose AVICEL® as an inducer after 120 and 240 hours of fermentation, respectively. However, in the cultivation using carboxymethylcellulose (CMC) in the first 48 hours there is a peak of hydrolytic activity for both CMCase as well as FPase. This same behavior was observed by Castro (2006), who compared the production of endoglucanases by *Trichoderma reesei* and *Humicola grisea* using insoluble (AVICEL®) and soluble substrates (CMC). In this study, it was found that slower kinetics of enzyme production were registered when using insoluble sources due to an initial acclimation period of the cells to the substrate. When cultured using carboxymethylcellulose (CMC) as the carbon source, the corresponding times for maximum enzyme production were anticipated in about 50 hours.

Regarding the production of cellobiase (Figure 4.1c) in different substrates (AVICEL®, SERVACEL®, CMC), the greatest results of enzymatic activity were recorded after 96 hours of cultivation and later cellobiase activity subsequently began to decrease in all substrates employed. Enzyme activities were two times higher when cultivated in AVICEL® compared to cultivation in SERVACEL® and carboxymethylcellulose (CMC).

β -glucosidase activity was also determined (Figure 4.1d) and a gradual activity increase was observed until reaching a maximum value of 3.8 U/L for cultivation employing AVICEL® and 3.2 U/L for cultivation employing SERVACEL® after 240 hours of fermentation. This can be justified by the fact that the rate of β -glucosidase hydrolysis increases proportionally with decreasing substrate size (Whitaker, 1994). In cultivation with carboxymethylcellulose (CMC) the maximum activity recorded was 2.5 U/L after 96 hours of fermentation. Because it is a shorter molecule than cellulose, it is assumed that this substrate is reduced in less time, thus justifying the anticipated activity peak.

Champagne (2007) studied the production of cellulase enzymes by submerged fermentation utilizing the filamentous fungus *Penicillium funiculosum*, investigating the best cellulosic substrate. Among the substrates, microcrystalline cellulose (AVICEL®) was

that which resulted in the greatest enzymatic activities. For the microorganism of the present study, *Acremonium strictum*, of the three commercial inductors studied in the production of cellulases, AVICEL® was also that which showed the greatest hydrolytic activity, registering maximum activities of CMCCase (73 U/L), FPase (2.5 U/L) and β -glucosidase (3.8 U/L) after 240 hours of fermentation. As for the activity of cellobiase, a maximum of 26 U/L was reported after 96 hours of cultivation. Studies such as this indicated that cellulase production is directly dependent on the type of substrate used, thus justifying the use of large quantities of commercial microcrystalline cellulose (AVICEL®) for the induction of cellulolytic enzymes.

In a second step, lignocellulosic biomass was employed in order to verify which is the best inducer of cellulolytic enzymes from *Acremonium strictum* compared to commercial cellulose.

4.3.2 Fermentations: Lignocellulosic Biomass

The conversion of lignocellulosic biomass into glucose requires the use of cellulolytic enzymes. It is well established that hydrolytic efficiency is a result of synergistic action of a multicomponent enzyme system consisting of at least three main groups: endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases (Maeda *et al.*, 2011).

In this step, five different substrates were studied in the production of cellulolytic enzymes by *Acremonium strictum*, namely: raw sugarcane bagasse (without pretreatment) and bagasse subjected to mild (12 kgf/cm²; 188.5°C), average (15 kgf/cm²; 198°C) and strong pretreatment (19 kgf/cm²; 210.4°C), and employed in parallel was the commercial cellulose AVICEL®, for which the best results were obtained among the commercial celluloses studied previously. In order to evaluate the cellulolytic activity of the microorganism under study (*Acremonium strictum*) grown on different substrates, 4 enzymatic activities during the fermentation were assessed: CMCCase, FPase (Figures 4.2a and 4.2b), cellobiase and β -glucosidase (Figures 4.3a and 4.3b).

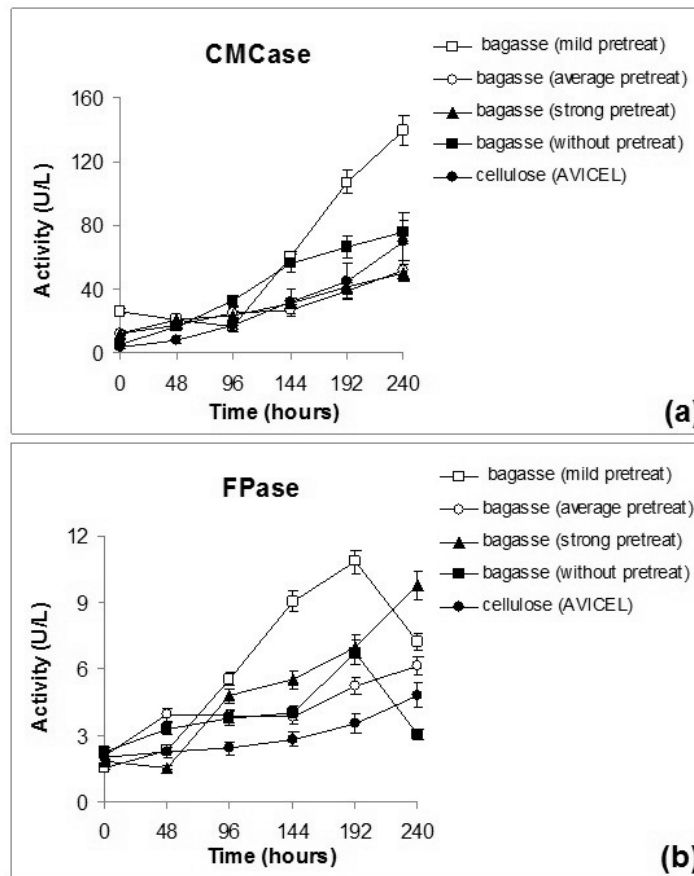


Figure 4.2. CMCCase activity (a) and FPase activity (b) of *Acremonium strictum* in relation to fermentation time using sugarcane bagasse pretreated with different intensities and microcrystalline cellulose (AVICEL®).

Analyzing Figure 4.2a, it is observed that the greatest results of CMCCase activity (endoglucanase) were registered when the microorganism (*Acremonium strictum*) was cultivated in sugarcane bagasse subjected to a mild steam explosion pretreatment, where the maximum CMCCase activity recorded was 139.42 U/L at 240 hours of fermentation. This was followed by cultivation with raw sugarcane bagasse (untreated) with maximum CMCCase activity (75.39 U/L) also after 240 hours of fermentation. Almeida (2009) studied the production of cellulases and hemicellulases from endophytic *Acremonium* and reported similar results for endoglucanase activity for *Acremonium sp.* when grown on sugarcane

bagasse (150 U/L), but when grown on corn straw endoglucanase activity was slightly higher (180 U/L) after 216 hours of fermentation.

In laboratory conditions, filter paper is often used as an inducer substrate for production of exo-glycosidases to measure total cellulolytic activity of the complex (Ruegger and Tauk-Tornisielo, 2004). FPase activities recorded for cultivation on mild sugarcane bagasse (mild treatment) and raw sugarcane bagasse (without treatment) showed the same behavior, registering maximum activities at 192 hours of fermentation, corresponding to 10.82 U/L and 6.74 U/L, respectively, as can be seen in Figure 4.2b. In the case of cultivation on sugarcane bagasse subjected to the strong pretreatment, maximum FPase activity was record at 240 hours of fermentation, corresponding to 9.76 U/L. Ruegger and Tauk-Tornisielo, (2004) studied the cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of São Paulo, Brazil, and among the fungi studied 64 strains (80%) showed FPase activity between 14 U/L and 23 U/L after 14 days of fermentation, where the best results was that obtained with *Scopulariopsis carbonaria*.

In relation to cellobiase activity (Figure 4.3a) all fermentations behaved very similarly, where the maximum cellobiose activity was recorded after 96 hours of cultivation and after this period activity began to decline. The best results were obtained using mild bagasse (mild pretreatment) as the substrate, followed by fermentation employing the commercial microcrystalline cellulose AVICEL®, where after 96 hours of fermentation maximum cellobiase activities of 27.72 U/L and 21.40 U/L were obtained, respectively.

Silva *et al.* (2009) studied the production of cellulases by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation and observed a cellobiase activity of 22 U/L when grown on microcrystalline cellulose AVICEL® after 72 hours of fermentation. Because microcrystalline cellulose is a substrate with predominantly crystalline structure, it may better induce the production of cellobiohydrolases, whose product is cellobiose, a substrate easily hydrolyzed by β -glucosidases also referred to as cellobiases. Composed of only two glucose molecules, in only one hydrolysis step cellobiose releases the monosaccharide of interest of the cells (Zhang and Lynd, 2004).

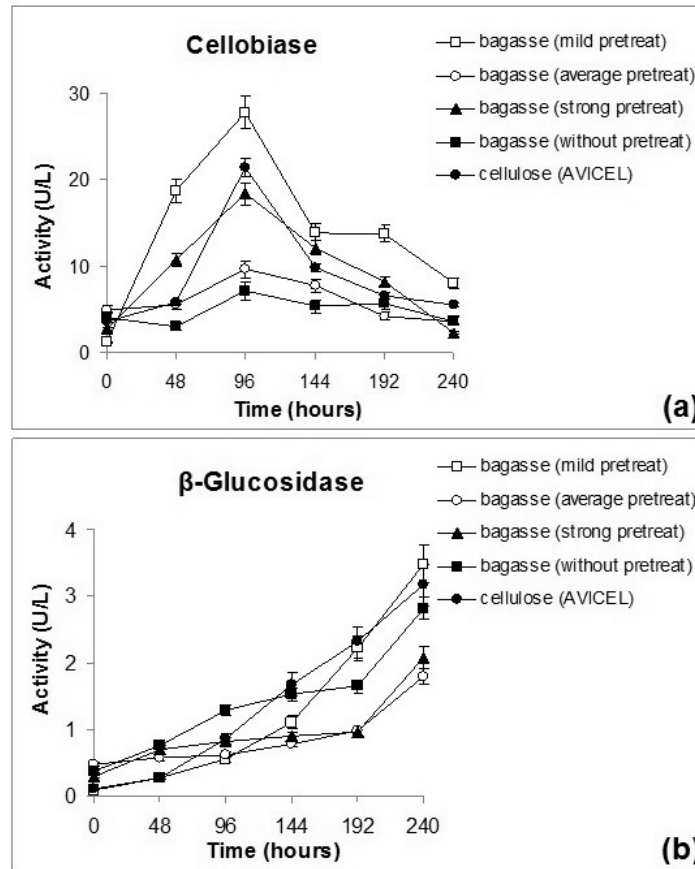


Figure 4.3. Cellobiase activity (a) and β -glucosidase activity (b) of *Acremonium strictum* in relation to fermentation time using sugarcane bagasse pretreated with different intensities and microcrystalline cellulose (AVICEL®).

β -Glucosidase activity was also evaluated in fermentations performed by *Acremonium strictum* on different substrates. As can be observed in Figure 4.3b, the β -glucosidase activity peak was similar in all cultivations, being obtained after 240 hours of fermentation. Cultivation on sugarcane bagasse with mild pre-treatment presented the best results, indicating a maximum β -glucosidase activity of 3.48 U/L at 240 hours of fermentation. The fermentation using AVICEL®, as reported in the production of cellobiase, also presented better results than the fermentations using sugarcane bagasse subjected to average and strong pretreatment, registering a β -glucosidase activity of 3.12

U/L at 240 hours of fermentation. Almeida (2009) observed a higher β -glucosidase activity for *Acremonium sp.* when grown on sugarcane bagasse (10 U/L), however this activity was only achieved after 23 days of fermentation.

Among the enzymes analyzed, β -glucosidase was that which is found in smaller activities. According to the results encountered, it can be considered that *Acremonium strictum* showed a predominance of endoglucanase production due to the higher CMC_{ase} activities and lower β -glucosidase production among the enzymes studied. According to Maeda *et al.* (2011), a natural microorganism capable of producing an optimal enzyme composition needed for degradation of lignocellulosic biomass has not yet been encountered. Therefore, if a certain microorganism presents a lack of a specific enzyme activity, this activity can be supplemented with native or recombinant enzymes for use in particular biotechnology applications.

Analyzing the results of enzyme activities recorded during fermentation of the 5 substrates employed, it can be observed that cultivation on sugarcane bagasse submitted to mild intensity pretreatment was that which resulted in the highest cellulolytic activities (CMC_{ase}, FPase, Cellobiase and β -glucosidase) from the microorganism *Acremonium strictum*, compared with those grown on the microcrystalline cellulose AVICEL®. The enzyme-substrate interaction is fundamentally dependent on accessibility of the enzyme to the substrate. For lignocellulosic biomass the pretreatment was essential to permit this interaction and promote enzyme activity.

Cellulose accessibility refers to the intra-intermolecular interactions of nitrogen. The more accessible, the more interactions can occur among cellulose and various factors such as water, microorganisms and feature of the substrate. The surfaces of crystalline cellulose are more accessible, but the rest of the structure is not. Most non-crystalline cellulose polymers would be accessible, but because this structure is surrounded with lignin and hemicellulose, their accessibility becomes limited (Rowell *et al.*, 2005). To enable the removal of lignin and hemicellulose, and also increase the biomass contact area for attack of cellulases, various mechanical, physical and physicochemical treatments have been developed (Almeida, 2009).

Mild bagasse (mild pretreatment) was selected as one of the parameters to be studied in optimization of cellulase production by *Acremonium strictum*.

4.3.3 Optimization of Enzymes Production

A Plackett & Burman design was used to optimize cellulase production from *Acremonium strictum*. The design, expressed in Table 4.2, was used to evaluate the effects of the main process variables, analyzing the concentrations of bagasse and molasses, agitation, pH and temperature. The level of cellulase expression is determined by the composition of the medium and the growth conditions. Metabolic processes of the microorganisms are greatly influenced by changes in temperature, pH, substrate, aeration and inoculum concentration. Optimal culture conditions vary significantly among species of the same organism (Delabona *et al.*, 2012).

In the design the response variables analyzed were CMCase and β -glucosidase activity after 240 hours of fermentation, where sugarcane bagasse submitted to mild pretreatment was used as the substrate. The Plackett & Burman design matrix is shown in Table 4.2, which consists of 12 experiments with three repetitions of the central point, totaling 15 assays.

According to Table 4.2, a variation in CMCase activity was observed from 12.64 U/L (test 7) to 179.43 U/L (test 9). Comparing the parameters studied in these experiments, it appears that the maximum activity is obtained when decreasing the concentration of molasses added to the culture medium, decreasing agitation to 100 rpm and increasing the temperature to 30°C. Regarding β -glucosidase activity, the lowest activity recorded was 5.68 U/L in assay 11 and the maximum activity was 13.21 U/L in assay 10. Comparing all assays, it is observed that the peak of β -glucosidase activity is due to decreases in molasses and bagasse concentrations in the culture medium, as well as alteration of temperature to 30°C. However, to verify if these variations are statistically important at the significance level of 10% ($p < 0.10$), Pareto charts were constructed to analyze the effects of the variables studied (Figures 4.4a and 4.4b).

Table 4.2. Matrix of the Plackett & Burman Design and their responses (CMCase and β -glucosidase activity) after 240 hours of fermentation by *Acremonium strictum*.

Tests	Bagasse concentration (g/L)	Molasses concentration (g/L)	Agitation (rpm)	pH	Temperature (°C)	CMCase Activity (U/L)	β -glucosidase Activity (U/L)
1	(+1) 50	(-1) 2	(+1) 200	(-1) 5	(-1) 25	83.40	12.20
2	(+1) 50	(+1) 10	(-1) 100	(+1) 7	(-1) 25	74.13	6.59
3	(-1) 16	(+1) 10	(+1) 200	(-1) 5	(+1) 30	25.72	10.22
4	(+1) 50	(-1) 2	(+1) 200	(+1) 7	(-1) 25	74.10	11.50
5	(+1) 50	(+1) 10	(-1) 100	(+1) 7	(+1) 30	58.97	9.89
6	(+1) 50	(+1) 10	(+1) 200	(-1) 5	(+1) 30	39.59	12.37
7	(-1) 16	(+1) 10	(+1) 200	(+1) 7	(-1) 25	12.64	10.64
8	(-1) 16	(-1) 2	(+1) 200	(+1) 7	(+1) 30	62.76	9.38
9	(-1) 16	(-1) 2	(-1) 100	(+1) 7	(+1) 30	179.43	11.79
10	(+1) 50	(-1) 2	(-1) 100	(-1) 5	(+1) 30	48.86	13.21
11	(-1) 16	(+1) 10	(-1) 100	(-1) 5	(-1) 25	21.06	5.68
12	(-1) 16	(-1) 2	(-1) 100	(-1) 5	(-1) 25	91.82	9.62
13	(0) 33	(0) 6	(0) 150	(0) 6	(0) 28	45.91	8.07
14	(0) 33	(0) 6	(0) 150	(0) 6	(0) 28	43.18	8.12
15	(0) 33	(0) 6	(0) 150	(0) 6	(0) 28	47.59	8.06

In the analysis of parameters studied by the Pareto chart, the critical “t” calculated was 1.83, and only the parameter of molasses concentration for both response variables (Figures 4.4a and 4.4b) was statistically significant ($p < 0.10$), *i.e.*, the calculated “t” value for this parameter was higher than the critical “t”. This means that of the five parameters studied (bagasse concentration, molasses concentration, agitation, pH and temperature), only the parameter of molasses concentration significantly influenced ($p < 0.10$) both CMCase and β -glucosidase activities.

The parameter of molasses concentration had a negative influence on CMCase and β -glucosidase activity because its effect was negative. This means that by increasing the molasses concentration the enzymatic activity decreases and vice versa. Sugarcane molasses is a byproduct of the sugar industry, rich in nutrients and reducing sugars. However, studies have found that the use of glucose as a carbon source is not an inducer of cellulase production, and also strongly represses enzyme production even in the presence of inducers (Nisizawa *et al.*, 1972). The greatest productivity is obtained when using pure

(crystalline) or complexed cellulose. Therefore, the negative effect of molasses on cellulolytic activity can be justified due to the elevated concentration of glucose in the medium.

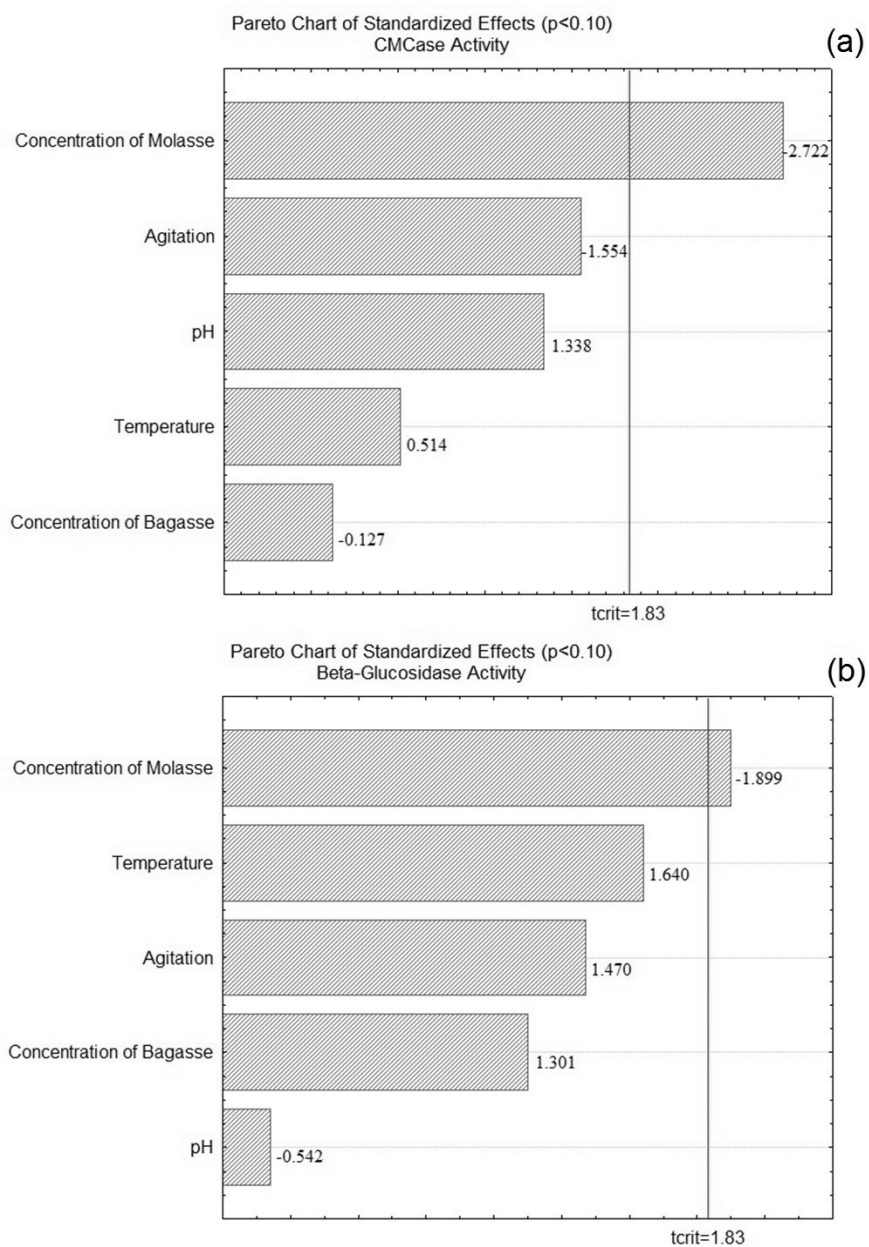


Figure 4.4. Pareto charts of the effects of the five parameters studied: bagasse concentration, molasses concentration, agitation, pH and temperature on enzymatic production by *Acremonium strictum*: a) CMCase activity; b) β -glucosidase activity.

From the Pareto analysis it could be concluded that only the molasses concentration had a significant influence at 10% and the other parameters did not statistically influence enzymatic activity. Therefore, the parameter values were fixed at the level where the maximum activity of each enzyme was obtained and this condition validated by repeating the experiments in triplicate.

For the production of CMC_{Case} by *Acremonium strictum* the best culture condition determined by the Plackett & Burman design was 16 g/L of sugarcane bagasse submitted to mild pretreatment (12 kgf/cm²; 188.5°C), 2 g/L of molasses, 100 rpm, pH 7.0 and 30°C, registering an average activity of 170 U/L after validation in triplicate. For the production of β-glucosidase by *Acremonium strictum*, the best culture condition was 50 g/L of the mild pretreated sugarcane bagasse, 2 g/L of molasses, 100 rpm, pH 5.0 and 30°C, registering an average activity of 12,5 U/L (triplicate).

4.4 CONCLUSIONS

Of the three commercial inductors studied in the production of cellulases from *Acremonium strictum*, the microcrystalline cellulose AVICEL® was that which induced the highest hydrolytic activity compared with the other sources studied, SERVACEL® and carboxymethylcellulose (CMC);

Among the lignocellulosic biomasses used in the fermentations, the sugarcane bagasse subject to a mild pretreatment was that which best induced the microorganism under study, *Acremonium strictum*, to produce the highest cellulolytic activities compared to the bagasse samples pretreated with different intensities and the commercial microcrystalline cellulose AVICEL®;

In the optimization study of cellulase production by *Acremonium strictum* only the molasses concentration was statistically significant ($p < 0.10$), having a negative effect due to the elevated concentration of reducing sugars. The greater the addition of molasses to the medium, lower is the enzymatic activity and vice versa.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*) for the doctorate scholarship and project financing. We also thank the CTC (*Centro de Tecnologia Canavieira*) for providing the pretreated sugarcane bagasse, and the company *Virgolino de Oliveira S/A Açúcar e Álcool* for providing the molasses, both used as substrates in the fermentations performed herein.

REFERENCES

- Afolabi, O. A., 1997. Wastepaper hydrolysate as substrate and inducer for cellulase production. M.S. Thesis, The University of Akron, Akron, OH.
- Almeida, M. N., 2009. Cellulases and Hemicellulases from Species of *Acremonium Endophytes*. M.S. Thesis, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil, pp. 70.
- Bastos, V. D., 2007. Ethanol, alcohol chemistry and biorefineries. BNDES Setorial, 25, 5-38.
- Castro, A. M. 2006. Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). M.S. Thesis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- Castro, A. M., Pereira, N. JR., 2010. Production, Properties and Application of Cellulases in the Hydrolysis of Agroindustrial Wastes. *Quim. Nova*, 33, 181-188.
- Champagne, P. Feasibility of producing Bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective. *Resoucers Conversation & Recycling*, 50, 211-230, 2007.
- Delabona, P. S., Farinas, C. S., Silva, M. R., Azzoni, S. F., Pradella, J. G. C., 2012. Use of new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated

- sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technol.*, 107, 517-521.
- Goldbeck, R., Andrade, C. C. P., Maugeri Filho, F., 2010. Screening of Wild Yeast Cellulases From Brazil Biomes. In: Proceedings of 8th European Symposium on Biochemical Engineering Science - ESBES, Bologna, Italy, p. 239-239.
- Henry, R. J., Cannon, D. C., Winkelman, J., 1974. *Clinical chemistry principles and techniques*. 2^a (Ed). Harper and Row Publishers Inc, New York, pp. 1288.
- 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.
- Limayem, A., Ricke, S., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 449-467.
- Maeda, N. R., Serpa, V. I., Rocha, V. A. L., Mesquita, R. A. A., Santanna, L. M. M., Castro, A. M., Driemeier, C. E., Pereira, N. JR., Polikarpor, I., 2011. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochem.* 46, 1196-1201.
- Mandels, M., Sternberg, D., 1976. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* 54, 267-286.
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Nisizawa, T., Suzuki, H., Nisizawa, K., 1972. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.*, 71, 999-1007.
- Ogawa, K.; Toyama, H.; Toyama, N., 1982. Native cellulose hydrolyzing cellulase of *Trichoderma reesei*. *J. Ferment. Technol.* 60, 349-355.

- Peixoto, A. B., 2006. Study of the production of enzymes and gums by wild yeasts collected in various regions of Brazil. M.S. Thesis. Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil, pp. 84.
- Rodrigues, M. I., Iemma, A. F. 2005. Design of Experiments and Process Optimization. 1^a (Ed). Casa do Pão Publishing House, Campinas, pp. 326.
- Rowell, M. R., Pettersen, R., Han, J. S., Rowell, J. S., Tshabalala, M. A., 2005. Handbook of wood chemistry and wood composites. Chapter 3: Cell wall chemistry. CRC Press, pp. 487.
- Ruegger, M. J. S., Tauk-Tornisielo, S. M., 2004. Cellulase activity of fungi isolated from soil of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. *Revista Brasil. Bot.* 27, 205-211.
- Silva, M. M. P., Rocha V., Maeda, R. N., Pereira, N. JR, 2009. Evaluation of cellulase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. In: Proceedings of 17th National Symposium Bioprocesses, Natal, Brazil.
- 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 and Microbial Technology*, 46, 541–549.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., Pitarelo, A. P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Bom, E. P. S., Moraes, L. M. P., Araújo, J. M., Torres, F. A. G., 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technol.* 101, 4820-4825.
- 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.

- Whitaker, J. R., 1994. Principles of Enzymology for Food Sciences. 2^a (Ed). Marcel Dekker Inc, New York, pp. 625.
- Zhang, Y. H. P., Lynd, L. R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797-824.
- Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., Mielenz, J. R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24, 452-481.
- Zhou, J., Wang, Y. H., Chu, J., Zhuang, Y. P., Zang, S. L., Yin, P., 2008. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresource Technol.* 99, 6826-6833.

CAPÍTULO 5

***IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CLONAGEM
DE GENES DE CELULASES DE *Acremonium strictum* EM
*Escherichia coli****

IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CLONAGEM DE GENES DE CELULASES DE *Acremonium strictum* EM *Escherichia coli*

Goldbeck, R.¹; Netto, O. V. C.²; Teixeira, G. S.²; Carazzolle, M. F.²; Adelantado, N.³;
Pereira, G. A. G.²; Ferrer, P.³; Maugeri Filho, F.¹

¹Laboratory of Bioprocess Engineering, Faculty of Food Engineering,
University of Campinas – UNICAMP, 13083-862, Campinas-SP, Brazil

²Laboratory of Genomic and Expression, Institute of Biology,
University of Campinas – UNICAMP, 13083-870, Campinas-SP, Brazil

³Department of Chemical Engineering, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat
Autònoma de Barcelona – UAB, 08193, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain

RESUMO

Com a divulgação em quase todos os meios de comunicação dos primeiros resultados do Projeto Genoma Humano e o grande interesse sobre os transgênicos, a engenharia genética passou a ser alvo de atenção como ciência moderna. A Engenharia genética abrange o conjunto de técnicas capazes de permitir a identificação, manipulação e multiplicação de genes dos organismos vivos. O sequenciamento de Genoma Completo é uma técnica utilizada para determinar virtualmente as sequências de todas as bases do DNA de uma determinada amostra. Esse tipo de ensaio é classicamente utilizado para determinar o genoma de espécies ainda não estudadas, comparar geneticamente organismos em classificações taxonômicas baseadas em relações evolutivas, identificar genes de interesse, entre outras diversas aplicações. Este trabalho teve como objetivo a identificação, isolamento e clonagem de genes de celulases presentes no genoma do micro-organismo silvestre *Acremonium strictum* isolado do bioma brasileiro. Inicialmente foi realizado o sequenciamento 454 do genoma do micro-organismo em estudo e os genes de celulases preditos foram isolados a partir do cDNA e clonados em *Escherichia coli* através do vetor pGEM-T Easy. Com o sequenciamento 454, 2 genes foram preditos: o *contig* 006, que

prediz um gene com 2764 pb, que apresentou 66% de identidade a endoglucanase da família 74a de *Trichoderma virens* quando realizado BLASTx, e o *contig* 249, que prediz um gene com 2666 pb, e apresentou 69% de identidade a β -glicosidade de *Trichoderma reesei*.

Palavras-Chave: celulases, identificação, genes, clonagem, *Escherichia coli*.

5.1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em processos biotecnológicos é anterior à sua descoberta, pois desde 3000 a.C. havia produção de pão e vinho e não se tinha conhecimento destas moléculas, o que só veio a ser conhecido na década de 30 do século XIX, com a diastase, encontrada na cevada por Anselme Payen e Jean-Francois Persoz em 1833, e a pepsina encontrada no suco gástrico por Schwann em 1836 (Buchner, 1907). Portanto, a tecnologia enzimática definida em 1971 por Lemuel Wingard como “aquele ramo da engenharia de processos que se ocupa da análise, desenho e operação de processos para a produção e utilização de enzimas” (Illanes, 1994) precede inclusive a descoberta dos biocatalisadores.

Como se sabe, muito se evoluiu no conhecimento e manipulação das enzimas. Hoje, são empregadas técnicas de alta performance (*highthroughput*) para descobrimento de novos biocatalisadores, caracterização e mutagênese (Robertson e Steer, 2004; Schmidt e Bornscheuer, 2005). A tendência atual é que novos biocatalisadores serão identificados por metagenômica, não necessitando cultivar os micro-organismos (Cowan *et al.*, 2004; Lorenz e Eck, 2005; Ranjan *et al.*, 2005), ou mesmo criados e modificados para uma determinada reação específica por biologia molecular e engenharia de proteínas (Dwyer *et al.*, 2004).

A busca pelo “biocatalisador ideal”, que é definido como aquela enzima que se enquadra idealmente em um processo otimizado – não mais o processo ficaria restrito às características e limitações do biocatalisador, mas este seria “projetado por encomenda” respeitando as características do processo (Burton *et al.*, 2002; Cowan *et al.*, 2004; Lorenz e Eck, 2005) – requer a definição das variáveis de processo, e, portanto, de um conjunto de parâmetros da enzima como: especificidade por substratos, regio-enantiosseletividade, estabilidade frente a solventes, pH e temperatura ótimos (Burton *et al.*, 2002; Lorenz e Eck,

2005). Em última análise, sob o ponto de vista deste novo paradigma de desenvolvimento de processos enzimáticos, estes parâmetros poderão ser manipulados até se encontrar ou desenvolver o “biocatalisador ideal”.

A celulase é um complexo multienzimático, constituído por endoglucanase (E.C.3.2.1.4), exoglucanase (E.C.3.2.1.91) e β -glicosidase (E.C.3.2.1.21) responsável pela hidrólise da cadeia β -glicosídica (Lynd *et al.*, 2002; Zhang *et al.* 2006; Maeda *et al.*, 2011).

A celulase é amplamente utilizada em diversos ramos da indústria, como por exemplo, na indústria têxtil e de detergentes, na preparação do malte da cerveja, em processos de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos e amido. Na área de alimentação animal, é comercializado como componentes indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibra de celulose. Na área energética, essas enzimas vêm sendo empregadas em plantas piloto para a obtenção de hidrolisado de celulose, que são utilizados na fermentação visando á fabricação de produtos de interesse, como o etanol (Zhou *et al.*, 2008; Rodrigues, 2008).

A celulase vem sendo estudada por vários pesquisadores com intuito de entender melhor o seu mecanismo de atuação visando diminuir custos de produção da enzima. A descoberta de novas celulasas pode abrir novas possibilidades de exploração da biomassa lignocelulolítica (Rodrigues, 2008).

Estudos de engenharia genética e biologia molecular são de extrema relevância, pois o conhecimento dos genes envolvidos nas rotas de biossíntese é fundamental para modificar os micro-organismos com a finalidade de elevar a produtividade no processo fermentativo (Padilha, 2003). A engenharia genética pode ser definida como o conjunto de técnicas capazes de permitir a identificação, manipulação e multiplicação de genes dos organismos vivos (Griffiths *et al.*, 2006).

Em face disto, este trabalho teve como objetivo a identificação, isolamento e clonagem de genes de celulasas presentes no genoma do micro-organismo silvestre *Acremonium strictum* isolado do bioma brasileiro. Primeiramente foi realizado o sequenciamento 454 do genoma do micro-organismo em estudo e os genes de celulasas preditos foram isolados a partir do cDNA do micro-organismo e clonados em *Escherichia coli* através do vetor pGEM-T Easy.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Micro-organismo

O micro-organismo *Acremonium strictum* foi selecionado como potencial produtor de celulases conforme descrito em trabalhos anteriores (Goldbeck *et al.*, 2010). Esse micro-organismo pertence ao banco de culturas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) - FEA / UNICAMP.

5.2.2 Extração de DNA

Primeiramente foi isolada uma colônia de *Acremonium strictum* e cultivada em 4 mL de meio 2% YEPD (Yeast Extract Peptona Dextrose), durante 14 horas, sob agitação, a 30 °C. Posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200 µL de tampão de quebra para extração do DNA conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

5.2.3 Sequenciamento 454 do Genoma de *Acremonium strictum*

Amostras de DNA (500 ng) foram fragmentadas por nebulização com N₂ líquido de maneira que os fragmentos gerados tivessem um tamanho médio de aproximadamente 700 pb. As extremidades dos fragmentos foram polidas e reparadas utilizando as enzimas T4 DNA polimerase e T4 polinucleotídeo quinase. A reação de polimento foi incubada em um termociclador por 20 min a 12 °C, 20 min a 25 °C e por 20 min a 75 °C. Posteriormente, foi feita a ligação de adaptadores para sequenciamento com a enzima T4 DNA. Todas as enzimas e adaptadores foram fornecidos no kit *Rapid Library Preparation Kit*® (Roche).

Para a remoção de fragmentos pequenos (restos de primers, dímeros de adaptadores e fragmentos pequenos da nebulização), as amostras foram purificadas pelo método SPRI (*solid phase reversible immobilization*), utilizando-se o reagente AMPure® (Agencourt) e um concentrador de partículas magnéticas (Invitrogen). As amostras foram incubadas com partículas magnéticas que se ligam ao DNA, mas não a fragmentos pequenos de DNA. Após a retenção das partículas magnéticas por uma placa imantada, essas foram lavadas

para remoção dos fragmentos pequenos não ligados. Por último, o DNA foi eluído das partículas magnéticas. A biblioteca obtida ao fim desse procedimento foi analisada no *Bioanalyzer DNA High Sensitivity chip*® (Agilent).

Após o preparo de biblioteca, o DNA obtido foi imobilizado através da ligação da sequência de seus adaptadores a *beads*. Essas *beads* contendo DNA foram processadas para o preparo de uma PCR em emulsão (emPCR) utilizando o kit *GS FLX Titanium LV emPCR Kit Lib-L*® (Roche). As condições foram ajustadas para que cada *bead* continha apenas uma molécula de DNA. Dessa maneira, após a emPCR cada *bead* continha milhões de cópias da mesma molécula de DNA. São essas *beads* que foram utilizadas para o sequenciamento 454.

As *beads* contendo DNA foram sequenciadas individualmente por meio da técnica de pirosequenciamento no equipamento GS FLX (Roche), pela qual os desoxinucleotídeos são apresentados separadamente à polimerase. Caso o nucleotídeo seja incorporado à molécula nascente, há a liberação de pirofosfato em quantidade proporcional ao número de desoxinucleotídeos adicionados. A ATP-sulfurilase converte pirofosfato em ATP, a presença do qual permite que a luciferase converta luciferina em oxiluciferina, emitindo luz. O pico de luz produzido é captado por uma câmera e convertido em dados pelo software de captura. A presença e a intensidade dos picos são utilizadas para a determinação da sequência das moléculas individualmente.

5.2.4 Predição dos Genes de Celulases no Genoma de *Acremonium strictum*

As sequências obtidas no pirosequenciamento/sequenciamento 454 geraram uma cobertura de dados de 10x o tamanho do genoma (*genome size* ~35 Mb). A montagem do genoma foi realizada utilizando o software Newbler, e a predição gênica (*ab-initio gene prediction*) foi realizada utilizando *training sets* de micro-organismos próximos a filogenia. Foi realizado vários tBLASTx no genoma, para identificar os *contigs* que possuíam alta identidade em aminoácidos com essas sequências. O *Contig* 006 (região do genoma entre 154000 e 162000 bp) foi o que apresentou uma alta identidade com a enzima

endoglucanase Cel74a, e o *Contig* 249 (região do genoma entre 22000 e 29000 pb) apresentou mais alta identidade com genes de β -glicosidase.

5.2.5 Isolamento dos Genes Preditos

Para isolar os genes de celulase preditos foi primeiramente realizada uma fermentação do micro-organismo *Acremonium strictum*, com intuito de extrair o RNA do micro-organismo no momento que o mesmo estava com alta atividade de expressão gênica.

O meio de cultivo foi composto de 10 g/L de carboximetilcelulose (CMC); 0,60 g/L de extrato de levedura; 7 g/L de KH_2PO_4 ; 2 g/L de K_2HPO_4 ; 0,15 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,50 g/L de KCl, pH 5,5 (Peixoto, 2006). A fermentação foi conduzida em shaker agitado a 150 rpm e temperatura controlada de 30°C.

Após a fermentação o caldo fermentado foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 4°C e 18.200 x g, sendo o sobrenadante (caldo enzimático) descartado, e o precipitado (biomassa) armazenado em eppendorfs à -80°C.

Para a extração de RNA total, o *pellet* armazenado a -80°C foi ressuspendido em 2 mL de tampão (0,1 M de EDTA, 1 M Sorbitol, 0,1% β -mercaptoetanol e *Lyticase* 50 U) e incubado por 30 minutos a 30°C sob agitação de 150 rpm e posteriormente o RNA foi extraído segundo Kit *RNeasy Mini Kit Quiagen* (Quiagen, Valencia, CA, USA).

Extraído o RNA, 1 μg de RNA foi tratado com 1 μL RQ1 DNase (1U/ μg), 1 μL de RNAout, 1 μL de RQ1 *buffer* 10X e água DEPC (Dietilpirocarbonato) até completar o volume de 10 μL . Incubado por 30 minutos a 37°C e posteriormente adicionado 1 μL de RQ1 *stop solution*. Para inativação foi incubado por 15 minutos a 65°C.

A síntese de cDNA foi realizada conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), empregando a enzima *Super Script II Reverse Transcriptase* (Invitrogen).

5.2.6 Amplificação e Purificação do cDNA

A mistura reacional para o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) continha 100 ng de cDNA de *Acremonium strictum* como molde, *Buffer Colorless* 5X, 6 μL ; dNTPs (dioxinucleotídeos) 10 mM cada, 0,6 μL ; MgCl_2 25 mM, 2,4 μL ; Primer Forward 10 μM ,

1,5 µL; Primer Reverse 10 µM, 1,5 µL; GoTaq®Polimerase 5U/µL (Promega), 0,30 µL e água Milli-Q autoclavada até completar 30µL. A reação de PCR foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems*), e as temperaturas utilizadas no programa foram: 94°C por 2 minutos (desnaturação), 35 ciclos de : 94°C por 20 segundos, 58°C por 60 segundos (anelamento) e 72°C por 2 minutos e 30 segundos (extensão), por fim mais 5 minutos a 72°C.

Dois conjuntos de Primers foram usados: um para o *contig* 006, que amplifica uma endoglucanase da família 74a com 2199 pb , e outro para o *contig* 249, que amplifica uma β-glicosidase com 2172 pb, sendo eles:

Contig 006: Primer Forward (5'ATGAAGGCCGTTGCTGTTC3')

Primer Reverse (5'TCACTTCACAAGTCTTGACAGC3')

Contig 249: Primer Forward (5'ATGTATCACAAGACTCTCGCAG3')

Primer Reverse (5'TCAAACAACACTAGGCTGCCTTC 3')

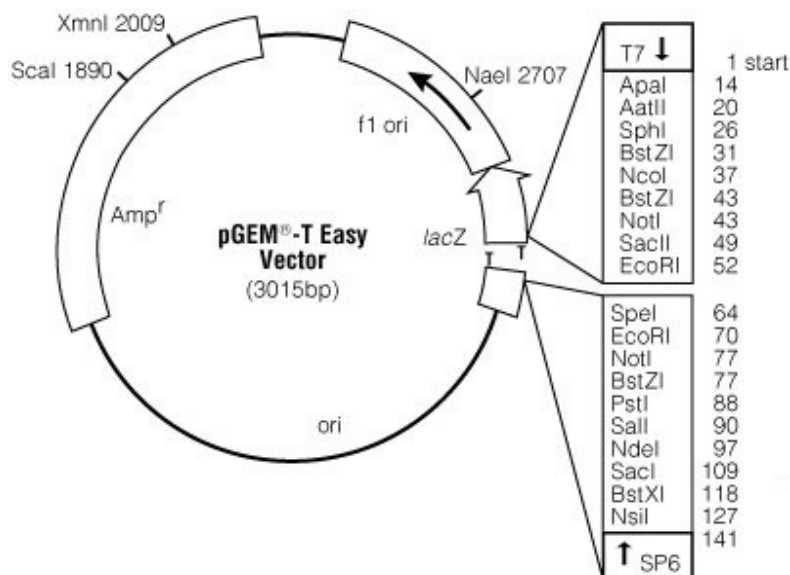
Os fragmentos amplificados foram então analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em TAE (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA), conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). O marcador utilizado foi de 1 kb DNA Ladder (Invitrogen).

As purificações dos produtos de PCR foram realizadas utilizando-se o kit *Wizard* ®*SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) através do seguinte protocolo: as bandas de cDNA foram retiradas do gel utilizando-se um bisturi estéril de forma que a pequena fatia de gel nunca apresentou massa superior a 300mg. As fatias foram pesadas em um tubo de microcentífuga de 1,5 mL. 10 µL de *Membrane Binding Solution* foram adicionados para cada 10 mg das fatias, misturou-se vigorosamente e incubou-se a 65°C até que a agarose estivesse totalmente solubilizada. Depois da solubilização, a mistura foi aplicada em uma pequena coluna por aproximadamente 1 min, ao término do qual a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 16.000 x g, e a solução que percolou pela coluna foi descartada. A coluna foi então lavada com 700 µL de *Membrane Wash Solution*, centrifugada novamente por 60 segundos a 16.000 x g e, novamente, a solução que passou através da coluna foi descartada. Repetiu-se a lavagem com 400 µL de *Membrane Wash Solution*. Posteriormente, 30 µL de água ultrapura *Nuclease-Free* foram aplicados à coluna para eluição do cDNA, deixou-se

aproximadamente 1 min em repouso à temperatura ambiente e centrifugou-se por 1 min a 16.000 x g, recuperando-se o cDNA purificado na solução aquosa.

5.2.7 Clonagem em *Escherichia coli*

Para clonagem em *E. coli* foi utilizado o vetor pGEM-T Easy (3015 pb) que pode ser visualizado na Figura 5.1. A reação de ligação ocorreu a 16°C, *overnight*, empregando a enzima T4 DNA Ligase (Roche). A transformação ocorreu segundo protocolo descrito por Nishimura *et al.* (1990), onde 100 µL de células competentes de *E. coli*, que estavam previamente estocadas a -80°C, foram descongeladas e misturadas com 10 ng da reação de ligação e incubados por 20 minutos no gelo. Foram aquecidas a 42°C por 60 segundos e novamente incubadas por 2 minutos no gelo. Foi adicionado 1 mL de meio LB (1% (p/v) de triptona, 0,5% (p/v) de extrato de lêvedo e 0,5% (p/v) de NaCl) e incubadas a 37°C por 1 a 2 horas. Posteriormente 50, 100 e 200 µL foram plaqueados em Agar LB contendo ampicilina (100 µg/mL), 80 µL de X-Gal (20mg/mL) e 100 µL de IPTG (100 mM) espalhados sobre o meio e incubadas a 37°C durante 14 horas.



Fonte: Promega (2010).

Figura 5.1. Mapa do vetor pGEM-T Easy.

O vetor pGEM-T Easy é linear e suas extremidades 5' possuem timidina, as quais viabilizam a ligação de produtos de PCR diretamente, pois a enzima Taq polimerase acrescenta uma adenina na extremidade 3' dos produtos de PCR, que pareiam com as timidinas do vetor, possibilitando a ligação. Além disso, este vetor, como pode ser visto na Figura 5.1, traz o gene *lacZ* da β -galactosidase, possibilitando a identificação das colônias que apresentam o plasmídeo recombinante de interesse, pois, quando o produto do PCR é ligado ao vetor, o gene da β -galactosidase fica interrompido e a enzima, por isso, fica inativa, gerando colônias brancas. Do contrário, o gene fica contínuo e a enzima funcional, de forma que, quando expressa, catalisa a reação de hidrólise do X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactosídeo), um análogo cromogênico da lactose, formando colônias azuis (Almeida, 2005).

5.2.8 Mini-Preparação de DNA Plasmidial

Uma colônia isolada da bactéria, contendo o plasmídeo de interesse, foi inoculada em 5 mL de meio LB, contendo ampicilina (100 μ g/mL). Após incubação a 37°C por 16 h sob agitação moderada, 1,5 mL da cultura foi centrifugado a 5000 x *g* por 3 min a 25°C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa sedimentada foi utilizada na preparação de DNA plasmidial segundo instruções do Kit *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega). Ao final, o DNA plasmidial obtido foi ressuscitado em 50 μ L de água ultrapura autoclavada e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) à $\lambda=260$ nm.

5.2.9 Sequenciamento dos Clones

A reação de sequenciamento ocorreu com 300 ng de plasmídeo, 1 μ L de Big Dye, 1 μ L de Tampão 5X, 3,2 μ L de Primer universais M13 5 μ M (Forward 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3') e (Reverse 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') em reações distintas, e água Milli-Q autoclavada até completar o volume de 10 μ L. As temperaturas utilizadas no termociclador foram: 94°C por 2 minutos para desnaturação e 35 ciclos de:

94°C por 20 segundos, 58°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos. Posteriormente foi realizada a precipitação, onde foram adicionadas as amostras 40 µL de isopropanol 75%, homogeneizado em vortex e deixado repousar por 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 18.000 x g por 20 minutos e descartado o sobrenadante. Em seguida foram adicionados 200 µL de álcool 70%, homogeneizado em vortex e centrifugado por 10 minutos a 18.000 x g. As amostras foram evaporadas para completa eliminação do etanol, diluídas em 10 µL de formamida, desnaturadas à 95°C por 5 minutos e sequenciadas em sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando o método de terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos fluorogênicos. As sequências obtidas foram alinhadas no programa de múltiplo alinhamento ClustalX 2.0, que produz alinhamentos de acordo com as identidades, similaridades e diferenças entre as sequências (Thompson *et al.*, 1997).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Identificação e Isolamento dos Genes de Celulases

Em relação ao gênero *Acremonium* pouco é relatado na literatura quanto aos genes relacionados à degradação da celulose. Para identificação dos genes de celulases de *Acremonium strictum*, partiu-se para o sequenciamento 454 do genoma do micro-organismo, uma técnica bastante moderna e eficiente.

No sequenciamento 454 emprega-se a técnica de pirosequenciamento, pela qual os desoxinucleotídeos são apresentados separadamente à polimerase. A ATP-sulfurilase converte pirofostato em ATP, a presença do qual permite que a luciferase converta luciferina em oxiluciferina, emitindo luz. O pico de luz produzido é captado por uma câmera e é convertido em dados pelo software de captura. A presença e a intensidade dos picos são utilizadas para a determinação da sequência das moléculas individualmente (Griffiths, 2006).

As sequências geradas no sequenciamento foram tratadas por análises computacional de bioinformática e comparadas através de tBLASTx (*Basic Local*

Alignment Search Tool) com banco de dados da literatura do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e dois *contigs* foram montados: *Contig 006* e *Contig 249*.

O *Contig 006* representa uma sequência genômica de 2764 pb, enquanto que o CDS (*coding sequences*) corresponde a 2199 pb. O CDS nada mais é, que a mesma sequência genômica, no entanto, livre dos íntrons (sequências de bases nitrogenadas no DNA que são irrelevantes no processo de transcrição e são suprimidos na formação do RNA mensageiro) (Snustad e Simmons, 2001). O RNA mensageiro (mRNA) é responsável pelo direcionamento da síntese de proteínas nos ribossomos e representa apenas cerca de 2% do RNA total (Griffiths, 2006).

A partir do CDS foi possível prever a sequência de aminoácidos presentes na proteína, onde cada trinca de bases nitrogenadas é capaz de codificar um aminoácido de uma proteína (Griffiths, 2006). A partir do *contig 006* (2199 pb) foi possível prever a proteína presente no genoma de *Acremonium strictum* com 733 aminoácidos, e que apresentou 66% de identidade com a endoglucanase da família 74a de *Trichoderma virens* quando realizado BLASTx frente às sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A Figura 5.2 apresenta o alinhamento entre as sequências do DNA genômico (2764 pb) e as sequências do RNA mensageiro (2199 pb) do *Contig 006* predito após sequenciamento 454 do genoma de *Acremonium strictum*.

Conforme pode ser visualizado na Figura 5.2, no alinhamento entre as sequências do DNA genômico e as sequências do RNA mensageiro 3 regiões apresentaram 100% de identidade, sendo elas: as coordenadas genômicas de 220 a 446 pb; 494 a 2439 pb e 2520 a 2545 pb. Essas regiões de similaridade são os éxons, que são as sequências genômicas efetivamente responsáveis pela codificação de proteínas. Durante a transcrição do DNA, os íntrons são removidos, editando assim o RNA mensageiro, para a posterior produção de proteínas (Snustad e Simmons, 2001)

A Remoção dos íntrons para a construção do RNA mensageiro se faz necessário, pois a partir do RNA mensageiro será sintetizado o cDNA (DNA complementar) que será utilizado para o isolamento e amplificação deste material genômico.

Alignment is on plus strand of genomic sequence and on plus strand of mRNA sequence

mRNA coverage: 100%

Overall percent identity: 100.0%



	Genomic coordinates	mRNA coordinates	length	identity	mismatches	gaps	Donor site	Acc. site
<u>Exon 1</u>	220-446	1-227	227	100.0%	0	0	d	
<u>Exon 2</u>	494-2439	228-2173	1946	100.0%	0	0	d	a
<u>Exon 3</u>	2520-2545	2174-2199	26	100.0%	0	0		a

Figura 5.2. Alinhamento entre as sequências do DNA genômico e as sequências do RNA mensageiro do *Contig 006* predito no sequenciamento 454 do *Acremonium strictum*.

O segundo *Contig* gerado na montagem do sequenciamento 454 foi o *Contig 249* que apresentou uma sequência genômica de 2666 pb. O CDS (*coding sequences*) resultou em 2172 pb, onde 494 pb (íntrons) foram removidos da sequência genômica inicial. A partir do CDS foi possível predizer a sequência de aminoácidos presentes na proteína, onde o *contig 249* (2172 pb) apresentou uma sequência de 724 aminoácidos com 69% de identidade com a β -glicosidade de *Trichoderma reesei* quando realizado BLASTx frente às sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A Figura 5.3 apresenta o alinhamento entre as sequências do DNA genômico (2666 pb) e as sequências do RNA mensageiro (2172 pb) do *Contig 249* predito após sequenciamento 454 do genoma de *Acremonium strictum*.

Alignment is on plus strand of genomic sequence and on plus strand of mRNA sequence

mRNA coverage: 100%

Overall percent identity: 100.0%

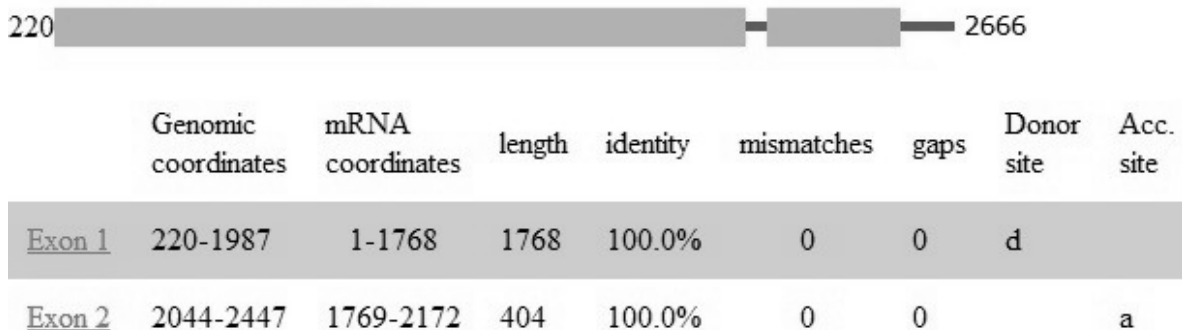


Figura 5.3. Alinhamento entre as sequências do DNA genômico e as sequências do RNA mensageiro do *Contig* 249 predito no sequenciamento 454 do *Acremonium strictum*.

Ao observar a Figura 5.3, 2 regiões de similaridade são visualizadas no alinhamento entre as sequências do DNA genômico e as sequências do RNA mensageiro do *contig* 249, sendo as coordenadas genômicas: 220 a 1987 pb e 2044 a 2447 pb. Essas sequências que formam o RNA mensageiro são as sequências responsáveis pela codificação de proteínas e são fundamentais para amplificação dos genes de interesse neste trabalho.

Identificados 2 genes de celulases (uma endoglucanase e uma β -glicosidase) presentes em *Acremonium strictum* através do sequenciamento 454 (*contigs*) foram desenhados conjuntos de primers para sua amplificação a partir das extremidades das sequências geradas.

Antes de partir-se para a extração de RNA e síntese de cDNA, foi realizada a amplificação do DNA genômico para determinação das condições de anelamento dos primers (Figura 5.4). Para ambos os *contigs* (006 e 249), a melhor temperatura de anelamento foi 60°C.

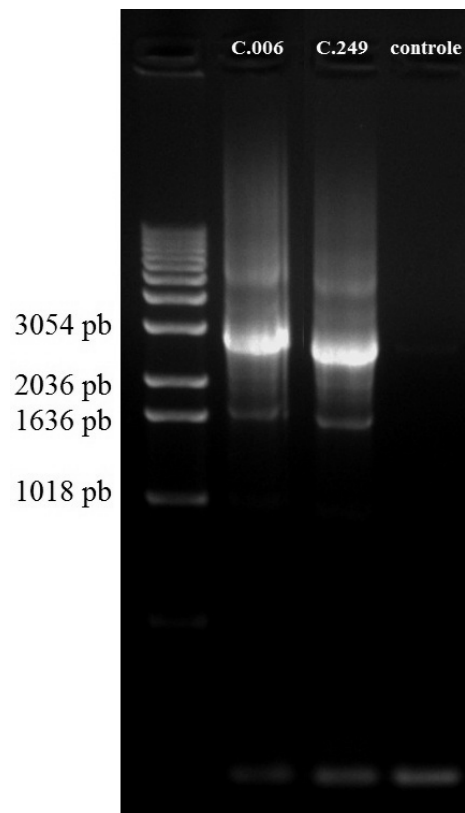


Figura 5.4. Gel de agarose (1%) da amplificação do DNA genômico de *Acremonium strictum* usando os primers desenhados a partir dos *contigs* (006 e 249) montados através do sequenciamento 454.

Conforme pode-se visualizar na Figura 5.4, o DNA genômico de *Acremonium strictum* quando amplificado a 60°C a partir dos primers procedentes dos *contigs* 006 e 249 apresentou bandas de aproximadamente 2800 a 2700 pb respectivamente, dentro do que se esperava, pois a sequência genômica para o *contig* 006 é de 2764 pb enquanto que para o *contig* 249, o DNA genômico apresenta uma sequência um pouco só mais inferior, com 2666 pb.

Amplificado o DNA genômico, foi realizada uma fermentação para extração do RNA justamente no momento em que o micro-organismo iniciava sua atividade enzimática (elevada taxa de expressão gênica ~120 horas de cultivo) para posterior síntese de cDNA.

O cDNA foi amplificado empregando os mesmos primers utilizados para amplificar o DNA genômico. Conforme pode ser visualizado na Figura 5.5, para ambos os *contigs* (006 e 249) bandas de 2100 ± 2200 pb foram amplificadas. Este resultado foi muito próximo ao esperado, pois as sequências construídas (CDS) através das análises de bioinformática dos resultados obtidos no sequenciamento do genoma predisseram *contig* 006 com 2199 pb e *contig* 249 com 2172 pb.

Frente aos resultados encontrados é imprescindível ressaltar a importância da bioinformática na manipulação dos dados biológicos. A Bioinformática pode ser definida como uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação, através da combinação de procedimentos e técnicas da matemática, estatística e ciência da computação (Borém e Santos, 2003).

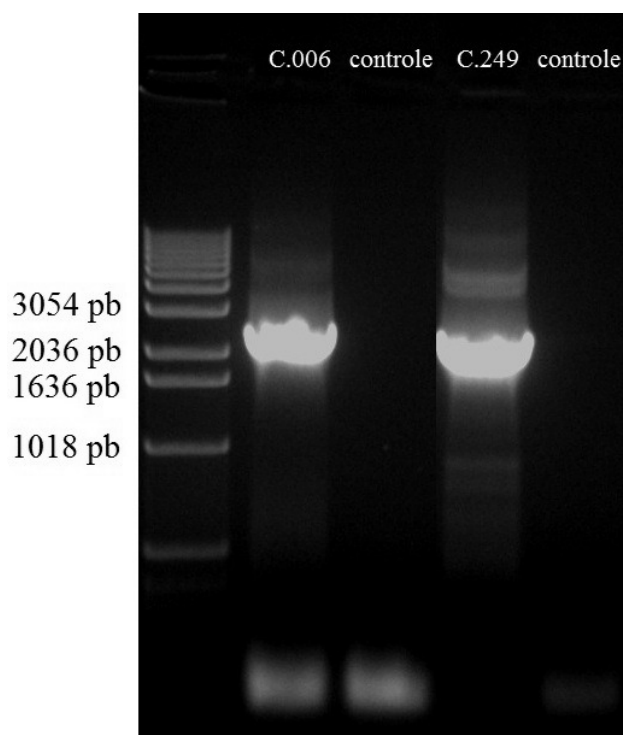


Figura 5.5. Gel de agarose (1%) da amplificação do cDNA de *Acremonium strictum* usando os primers desenhados a partir dos *contigs* (006 e 249) montados através do sequenciamento 454.

5.3.2 Clonagem em *Escherichia coli*

Após amplificação do cDNA os fragmentos foram purificados e clonados em *Escherichia coli*. Para a clonagem foi utilizado o vetor pGEM-T Easy. Clonagem em biotecnologia refere-se aos processos usados para criar cópias de fragmentos de DNA (Clonagem molecular), células (Clonagem Celular), ou organismos (Snustad e Simmons, 2001).

A Figura 5.6 apresenta o gel de agarose (1%) dos plasmídeos amplificados contendo os insertos (*contigs* 006 e 249) utilizando primers universais M13. Os primers M13 são primers universais utilizados para amplificar insertos clonados em vetores como pGEM-T Easy. No entanto estes primers além de amplificar os insertos amplificam também 198 pb a mais, que correspondem as extremidades do vetor onde os fragmentos estão inseridos.

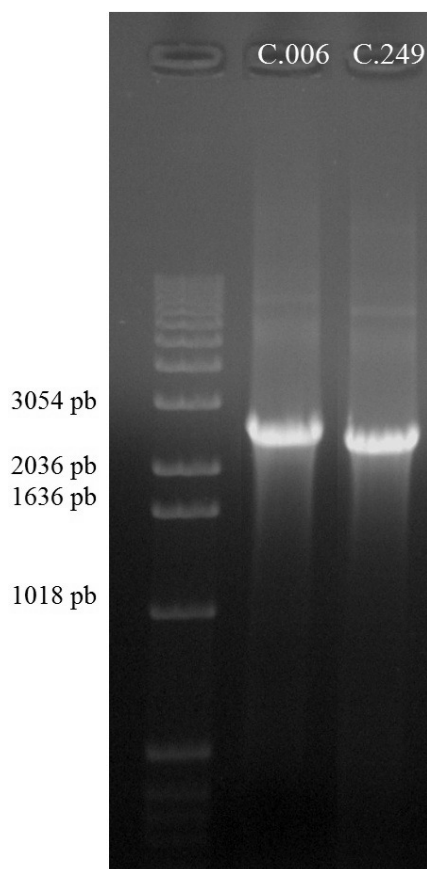


Figura 5.6. Gel de agarose (1%) dos plasmídeos de *E. coli* contendo os insertos (*contigs* 006 e 249) amplificados com os primers universais M13.

A Figura 5.6 comprova que a clonagem foi realizada de forma eficiente e que os clones apresentaram o tamanho de pares de bases esperados. Para ambos os *contigs* a banda amplificada foi de aproximadamente 2400 pb, visto que o *contig* 006 (gene de endoglucanase da família 74a) foi predito com um tamanho de 2199 pb, logo, com mais 198 pb referente aos primers M13, corresponde a um total de 2397 pb. Para o *contig* 249 (gene de β -glicosidase) foi predito um tamanho de 2172 pb, com mais 198 pb correspondentes aos primers M13, totaliza 2370 pb.

Li *et al.* (2009) clonou e expressou em *E. coli* dois genes de celulases de *Bacillus subtilis* empregando o vetor pGEM-T Easy para a clonagem. O primeiro gene foi identificado como uma celulase de 1470 pb, 490 aa e 54 kDa e a segunda como uma β -glucan hidrolase com 741 bp, 237 aa e 27 kDa.

Atualmente, ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em sequências gênicas vêm sendo utilizadas cada vez mais. A engenharia genética utiliza técnicas capazes de permitir a identificação, manipulação e multiplicação de genes dos organismos vivos (Rodrigues, 2008).

Estudos de engenharia genética e biologia molecular são cada vez mais de extrema importância, para o conhecimento dos genes envolvidos nas rotas de biossíntese e assim poder realizar modificações nos micro-organismos com a finalidade de elevar a produtividade dos processos industriais. Culturas recombinantes contendo múltiplos genes pode ser uma eficiente estratégia para a degradação da celulose e aumento da produção do bioetanol (Li *et al.*, 2009).

5.4 CONCLUSÃO

No sequenciamento 454, 2 *contigs* foram montados: O *Contig* 006 que contém 2199 pb, 733 aminoácidos e apresentou 66% de identidade a endoglucanase da família 74a de *Trichoderma virens* quando realizado BLASTx, e o *Contig* 249 que contém 2172 pb, 724 aminoácidos e apresentou 69% de identidade a β -glicosidase de *Trichoderma reesei* quando realizado BLASTx;

A clonagem dos genes de celulases de *Acremonium strictum* em *E. coli* foi realizada de forma eficiente empregado o vetor pGEM-T Easy (3015pb), os fragmentos clonados apresentaram o tamanho esperado;

Produtos de expressão podem ser agora estudados a partir dos genes clonados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto. Gostaríamos de agradecer também o Laboratório de Gênômica e Expressão (LGE) do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e também o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Engenharia Química, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, R. V. Clonagem, Expressão, Caracterização e Modelagem Estrutural de uma Esterase Termoestável de *Pyrococcus Furius*. Tese de Doutorado em Ciência e Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 109 p., 2005.

Borém, A.; Santos, F. R. Biotecnologia Simplificada. 2 ed. Minas Gerais: Suprema, 306p., 2003.

Buchner, E. Cell-free fermentation. Nobel Lecture, 1907.

Burton, S. G.; Cowan, D. A.; Woodley, J. M. The Search for the Ideal Biocatalyst. Nature Biotechnology, v. 20, p. 37-45, 2002.

Cowan, D. A.; Arslanoglu, A.; Burton, S. G. Metagenomics, Gene Discovery and the Ideal Biocatalyst. Biochemical Society Transactions, v. 32, p. 298-302, 2004.

- Dwyer, M. A.; Looger, L. L.; Hellinga, H. W. Computational Design of a Biologically Active Enzyme. *Science*, v. 304, p. 1967-1971, 2004.
- Goldbeck, R.; Andrade, C. C. P.; Maugeri Filho, F. Screening of Wild Yeast Cellulases From Brazil Biomes. In: Proceedings of 8th European Symposium on Biochemical Engineering Science - ESBES, Bologna, Italy, p. 239-239, 2010.
- Griffiths, A. J. F.; Wessler, S. R.; Lewontin, R. C.; Gelbart, W. M.; Suzuki, D. T; Miller, J. H. *Introdução à Genética*. 8ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 743 p., 2006.
- Illanes, A. *Introducción: Biotecnología de Enzimas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Capítulo 1, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.
- Li, W.; Huan, X.; Zhou, Y.; Ma, Q.; Chen, Y. Simultaneous cloning and expression of two cellulase genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 383, p. 397-400, 2009.
- Lorenz, P., Eck, J. Metagenomics and Industrial Applications. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 510-516, 2005.
- Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 66, p. 506-577, 2002.
- Maeda, N. R.; Serpa, V. I.; Rocha, V. A. L.; Mesquita, R. A. A.; Santanna, L. M. M.; Castro, A. M.; Driemeier, C. E.; Pereira, N. JR.; Polikarpor, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochem.*, v. 46, p. 1196-1201, 2011.
- Nishimura, A.; Morita, M.; Nishimura, Y.; Sugino, Y. A rapid and highly efficient method for preparation of *Escherichia coli* cells. *Nucleic acids research.*, v. 18, n. 20, p. 6169-6169, 1990.

- Padilha, F. F. Produção de biopolímeros por microrganismos modificados geneticamente. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 84 p., 2003.
- Promega. pGEM®-T and pGEM®-T EasyVector Systems. Disponível em: <<http://www.promega.com>> Acesso em: 05/08/2012. Publicado em dezembro de 2010.
- Ranjan, R.; Grover, A.; Kapardar, R. K. Isolation of Novel Lipolytic Genes from Uncultured Bacteria of Pond Water. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 335, p. 57-65, 2005.
- Robertson, D. E.; Sterr, B. A. Recent Progress in Biocatalyst Discovery and Optimization. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 8, p. 141-149, 2004.
- Rodrigues, G. Prospecção de Genes de Celulase presentes em Biblioteca Metagenômica. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de Campinas, Jaboticabal, 47 p., 2008.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª (Ed). Cold Spring Harbor Publishers Inc, New York, USA, 1989.
- Schmidt, M.; Bornscheuer, U. T. High-Throughput Assays for Lipases and Esterases. *Biomolecular Engineering*, v. 22, p. 51-56, 2005.
- Snustad, P.; Simmons, M. J. *Fundamentos de Genética*. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 756 p., 2001.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.
- Zhang, P. H. Y.; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 452-481, 2006.

Zhou, J.; Wang, Y.; Chu, J.; Zhuang, Y.; Zhang, S.; Yin, P. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresource Technol.*, v. 99, p. 6826-6833, 2008.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES GERAIS

SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS

6.1 CONCLUSÕES GERAIS

A seleção de linhagens produtoras de enzimas do complexo celulase, a partir de um banco de 390 micro-organismos silvestres pertencentes ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – FEA/UNICAMP, resultou em 5 cepas com notável índice de atividade enzimático (IAE) em meio sólido;

Dentre as 5 cepas pré-selecionadas, a linhagem nomeada AAJ6 (isolada do Cerrado) foi a que apresentou a maior atividade hidrolítica em carboximetilcelulose e papel de filtro, quando cultivada em meio líquido, sendo considerada como um micro-organismo potencial produtor de celulases;

O micro-organismo selecionado foi molecularmente identificado como *Acremonium strictum* e considerado dimórfico, devido o fato de se apresenta na forma leveduriforme em condições operacionais, no entanto é um fungo filamento;

Nos estudos de recuperação de enzima, o método utilizando acetona 60% para a precipitação da enzima foi o que apresentou as melhores percentagens de recuperação, registrando 80,67% para as endoglucanases (CMCase), 65% para a atividade de papel de filtro (FPase) e 25% para celobiase;

Na caracterização enzimática, a faixa de temperatura e o pH estudados não tiveram diferença significativa ($p < 0.05$), em relação à atividade de endoglucanase (CMCase). Já para a atividade de FPase e celobiase, a faixa de temperatura ótima foi de 54 a 57 °C e o pH ótimo foi de 4,7. Para a enzima β -glicosidase, apenas a temperatura foi significativa, favorecendo temperaturas mais elevadas (54 a 57 °C) para a atividade enzimática;

Em relação à purificação, a resina Q-Sepharose foi mais eficiente que a resina Streamline-DEAE para a separação e purificação das enzimas que compõem o complexo celulase presentes no caldo fermentado produzido por *Acremonium strictum*;

A cromatografia por troca iônica foi um método muito eficiente para a purificação de proteínas presentes no extrato enzimático produzido por *Acremonium strictum*. A massa molecular das enzimas presentes no complexo celulase foi de aproximadamente 70 kDa;

Na identificação de peptídeos presentes nas proteínas produzidas por *Acremonium strictum*, duas potenciais enzimas celulolíticas foram identificadas: uma endoglucanase da família 74a e uma β -glicosidase;

Nos estudos de produção de celulases de *Acremonium strictum* a partir de diferentes substratos, a celulose microcristalina AVICEL® foi a que induziu a maior atividade hidrolítica em comparação com as outras fontes comerciais estudadas, SERVACEL® e carboximetilcelulose (CMC);

Entre a biomassa lignocelulósica utilizada na produção de celulases, o bagaço de cana submetido a um pré-tratamento leve (12 kfg/cm², 188,5 °C) foi o que melhor induziu o micro-organismo em estudo a produzir as maiores atividades celulolíticas em comparação às outras amostras de bagaço pré-tratados com diferentes intensidades e a celulose microcristalina comercial AVICEL®, registrando valores máximos de CMC_{Case} de 134,42 U/L, 10,82 U/L de FPase, 27,72 U/L de celobiase e 3,48 U/L de β -glicosidase;

No estudo de otimização da produção de celulase por *Acremonium strictum*, nas condições empregadas, apenas a concentração de melação no meio de cultura foi estatisticamente significativa ($p < 0,10$), tendo um efeito negativo, devido à elevada concentração de açúcares redutores. Quanto maior for a adição de melação no meio, menor é a atividade enzimática e vice-versa;

Para a produção de CMC_{Case} por *Acremonium strictum* as melhores condições de cultivo determinadas através do Plackett & Burm foram: 16 g/L de bagaço de cana submetido à um pré-tratamento suave (12 kgf/cm²; 188.5°C), 2 g/L de melação de cana, 100 rpm de agitação, pH 7.0 e temperatura de 30°C. Para a produção de β -glucosidase por *Acremonium strictum*, as melhores condições de cultivo foram: 50 g/L de bagaço de cana

(submetido à um pré-tratamento suave), 2 g/L de melação de cana, 100 rpm de agitação, pH 5.0 e temperatura de 30°C;

No sequenciamento 454 do genoma de *Acremonium strictum*, 2 contigs foram montados: O Contig 006 que contém 2199 pb, 733 aminoácidos e apresentou 66% de identidade a endoglucanase da família 74a de *Trichoderma virens* quando realizado BLASTx, e o Contig 249 que contém 2172 pb, 724 aminoácidos e apresentou 69% de identidade a β -glicosidade de *Trichoderma reesei* quando realizado BLASTx;

A clonagem dos genes de celulasas de *Acremonium strictum* em *E. coli* foi realizada de forma eficiente empregando o vetor pGEM-T Easy (3015pb) e os fragmentos clonados apresentaram o tamanho esperado. A partir daí, futuros trabalhos de expressão em *Saccharomyces cerevisiae* visando à produção de bioetanol de 2ª geração podem ser agora realizados.

6.2 SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, seria interessante dar continuidade a este trabalho, já que produtos de expressão podem agora ser estudados a partir dos genes clonados e identificados, e serem então expressos em *Saccharomyces cerevisiae*;

Posteriormente o processo fermentativo deve ser re-estudado utilizando o micro-organismo geneticamente modificado, para sacarificação e fermentação simultânea, visando a produção de bioetanol de 2ª geração, bem como otimizar as condições de cultivo;

Estudos mais aprofundados de caracterização enzimática, relacionados a estabilidade térmica e estabilidade de pH também são sugeridos.

