

THIAGO RODRIGUES DUTRA

**INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO NA INDUÇÃO DE CELULASES E  
HEMICELULASES EM *Chrysosporthe Cubensis* CULTIVADO EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

D978i  
2013 Dutra, Thiago Rodrigues, 1986-  
Influência das fontes de carbono na indução de celulasas e  
hemicelulasas em *Chrysosporthe cubensis* cultivado em meio  
líquido / Thiago Rodrigues Dutra. – Viçosa, MG, 2013.  
xi, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.40-43.

1. *Chrysosporthe cubensis*. 2. Celulose. 3. Hemicelulose.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica  
e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.76

THIAGO RODRIGUES DUTRA

**INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO NA INDUÇÃO DE CELULASES E  
HEMICELULASES EM *Chrysosporthe Cubensis* CULTIVADO EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2013

---

Valéria Monteze Guimarães

---

Luciano Gomes Fietto

---

Lílian da Silva Fialho

---

Sebastião Tavares de Rezende  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, porque sem ele todo esforço seria em vão.

Aos meus pais, Walderson Lotério Dutra e Irene Rodrigues Dutra, por caminharem juntos comigo nessa empreitada.

Aos meus irmãos Douglas e Nayson por todo apoio e amizade.

A minha noiva Thamires, por todo amor e por ter estado comigo em todos os momentos e sempre me incentivar a ir em frente.

A minha avó Ercília, a quem admiro muito pela sua sabedoria, inteligência e força. Sou grato por todo o carinho e apoio.

Ao meu orientador Sebastião Tavares de Rezende e sua esposa Valéria Monteze Guimarães por terem aberto às portas do laboratório para mim. A eles sou grato pela oportunidade, pela paciência nos momentos árdus do trabalho, e por todo auxílio que me têm dado.

A Lílian da Silva Fialho, por toda a ajuda dada na execução dos experimentos, pelas orientações e pela amizade.

Ao Daniel Falkoski, por todo o auxílio e por ser um dos idealizadores deste trabalho.

A todos os meus amigos do grupo de pesquisa, por todo auxílio e ajuda e pelas trocas de experiências.

Ao professor Luciano Fietto, por aceitar participar da minha banca, a quem admiro como profissional e como pessoa.

A todos os meus amigos pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do DBB, por terem dado todo apoio quando necessitei. Em especial agradeço ao Jean, pela solicitude em ajudar e ao Eduardo por sempre resolver as questões burocráticas da melhor maneira possível.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por todos os ensinamentos, e por me ajudarem a crescer como estudante e profissional.

A Universidade Federal de Viçosa, pela excelência na qualidade do ensino.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

## **BIOGRAFIA**

Thiago Rodrigues Dutra, filho de Walderson Lotério Dutra e Irene Rodrigues Dutra, nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, no dia 15 de outubro de 1986. Concluiu o ensino fundamental em 2001, na Escola Municipal Maria Aparecida Martins Prado situada em Timóteo, Minas Gerais. Em dezembro de 2004 concluiu o ensino médio no Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais, em Ipatinga.

Em julho de 2011, graduou-se como Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Iniciou o programa de pós-graduação em bioquímica agrícola em agosto de 2011, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2013.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
2.1. Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivos específicos .....	2
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1. Biomassa Lignocelulósica e Parede Celular Vegetal.....</b>	<b>3</b>
3.1.1. Celulose .....	4
3.1.2. Hemicelulose .....	5
3.1.3. Lignina.....	7
<b>3.2. Degradação enzimática da biomassa lignocelulósica.....</b>	<b>8</b>
3.2.1. Celulases .....	8
3.2.2. Hemicelulases .....	9
<b>3.3. Celulases e Hemicelulases: Aplicações.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4. <i>Chrysosporthe cubensis</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>3.5. Processo de indução de celulases e hemicelulases em fungos .....</b>	<b>14</b>
3.5.1. Visão Geral.....	14
3.5.2. Moléculas Indutoras .....	15
3.5.3. Fatores e Elementos de Transcrição .....	17
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1. Materiais .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Microrganismo e cultivo .....</b>	<b>19</b>
4.2.1. Multiplicação e manutenção da cultura do fungo <i>Chrysosporthe cubensis</i> .....	20
<b>4.3. Determinação das atividades enzimáticas .....</b>	<b>20</b>
<b>4.4. Zimogramas .....</b>	<b>21</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>23</b>
<b>5.1. Indução da produção de celulases e hemicelulases por fontes de carbono complexas em <i>C. cubensis</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2. Indução da produção de celulases e hemicelulases por fontes de carbono simples em <i>C. cubensis</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>5.3. Análise qualitativa dos indutores (Zimogramas) .....</b>	<b>33</b>
5.3.1. $\beta$ - Glicosidases .....	33
5.3.2. Xilanases .....	36

5.3.3. Endoglicanases.....	38
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>

## RESUMO

DUTRA, Thiago Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Influência das fontes de carbono na indução de celulases e hemicelulases em *Chrysosporthe cubensis* cultivado em meio líquido.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Coorientador: Daniel Luciano Falkoski.

Resultados recentes obtidos em nosso grupo de pesquisa (Produção e Caracterização de Enzimas de Interesse Biotecnológico) têm demonstrado que *Chrysosporthe cubensis*, fungo patógeno de eucalipto, possui potencial para produção de enzimas para a sacarificação da biomassa lignocelulósica. Neste estudo o fungo foi cultivado em diversas fontes de carbono sob condições submersas, a fim de observar a produção de celulases e hemicelulases extracelulares. Foram testados como indutores de atividade enzimática fontes de carbono complexas como farelo de trigo, carboximetilcelulose – CMC, xilana *Birchwood* – XB, *Locust bean gum* – LBG, pectina de *citrus peel* – CP e também fontes de carbono mais simples como glicose, celobiose, lactose, galactose, manose, xilose e arabinose. *C. cubensis* produziu os maiores níveis de atividades celulolíticas e hemicelulolíticas quando crescido em farelo de trigo e CMC. Quando cultivado em farelo de trigo *C. cubensis* produziu as atividades  $\beta$ -glicosidase, endoglicanase e xilanase de 0,36 U/mL, 3,6 U/mL, 14,2 U/mL, respectivamente. Quando cultivado em CMC, *C. cubensis* produziu atividades de  $\beta$ -glicosidase, endoglicanase e xilanase de 0,48 U/mL, 2,8 U/mL, 10,7 U/mL, respectivamente. Quando *C. cubensis* cresceu em xilana *birchwood* apresentou atividade de xilanase de 9,9 U/mL, porém não foi eficaz na produção de celulases. Fontes de carbono simples apresentaram, de maneira geral, baixa capacidade de indução de celulases e hemicelulases em *C. cubensis*. Zimograma contendo substrato fluorescente metilumbelliferil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo, demonstrou que *C. cubensis* foi capaz de produzir atividade de  $\beta$ -glicosidase quando cultivado em todas as fontes de carbono, exceto em manose e galactose. Extratos produzidos por *C. cubensis* cultivado em fontes complexas, apresentaram uma  $\beta$ -glicosidase de 55,6 kDa. A presença de possíveis complexos de altos pesos moleculares, contendo atividade de  $\beta$ -glicosidase, também foi detectada. Dentre os extratos produzidos por *C. cubensis* em presença de fontes simples, o substrato lactose induziu a produção do mesmo grupo de  $\beta$ -glicosidases que as fontes de carbono complexas no fungo. Extratos produzidos pelo fungo cultivado tanto em

xilose quanto em arabinose também apresentaram bandas de atividades com elevados pesos moleculares. Extratos produzidos por *C. cubensis* cultivado em xilose apresentaram ainda uma  $\beta$ -glicosidase de 74 kDa. Já os extratos produzidos por cultivos em arabinose apresentaram, além de complexos com alto peso molecular, duas bandas para atividade de  $\beta$ -glicosidase; uma banda de 48 kDa e outra de 55,6 kDa. Extratos produzidos por *C. cubensis* crescidos em glicose apresentaram duas bandas de atividades de  $\beta$ -glicosidase, sendo uma banda de 106,8 kDa e outra de 48 kDa. Zimograma contendo xilana *birchwood* (XB-SDS-PAGE) como substrato, demonstrou que *C. cubensis* foi capaz de produzir uma xilanase constitutiva de 19 kDa quando crescido em todas as fontes testadas. A metodologia de XB-SDS-PAGE mostrou que *C. cubensis* foi capaz de produzir uma xilanase constitutiva de 19 kDa, quando crescido em qualquer uma das fontes testadas. Extratos produzidos pelo fungo crescido em farelo de trigo, CMC e xilana *Birchwood*, apresentaram, no gel de zimograma, uma região bem definida de atividade de xilanase entre 97 e 39 kDa de massa molecular. *Locust bean gum* e *citrus peel* foram capazes de induzir a produção de uma xilanase de 37,3 kDa. Xilose induziu a produção de duas xilanases, uma de 53,2 kDa e outra de 47,9 kDa. O extrato produzido pelo fungo crescido em arabinose apresentou um padrão de bandas semelhante ao encontrado no extrato oriundo do crescimento em xilose. Extratos oriundos do crescimento de *C. cubensis* em glicose, lactose, galactose e manose apresentaram somente a atividade da xilanase expressa constitutivamente de 19 kDa. Zimograma contendo CMC como substrato, demonstrou que apenas em extratos produzidos por *C. cubensis* crescidos em manose e xilose não foi possível observar atividade de endoglicanase. Farelo de trigo, CMC e xilana *Birchwood* induziram em *C. cubensis* a produção de duas endoglicanases, uma de 38 kDa e outra de 55,6 kDa. Quando *C. cubensis* cresceu em glicose, LBG, CP, lactose, galactose, arabinose e celobiose foi possível visualizar a produção de uma endoglicanase de 38 kDa. Analisando os resultados das atividades enzimáticas juntamente com as análises em zimograma, é patente que fontes complexas como farelo de trigo, CMC e xilana *Birchwood*, possuem elevado potencial indutor quanto à produção das enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa em *C. cubensis*. Já os extratos produzidos por *C. cubensis* cultivados em presença de fontes de carbono simples, apesar de não apresentarem, quantitativamente, valores

expressivos de atividade de celulasas e hemicelulasas, apresentaram, de maneira qualitativa, atividades de celulasas e hemicelulasas quando analisados através de zimogramas. Isto comprova que fontes de carbono simples podem estar envolvidas na ativação da produção tanto de celulasas quanto de hemicelulasas em *C. cubensis*.

## ABSTRACT

DUTRA, Thiago Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Influence of carbon sources on induction of cellulase and hemicellulase in *Chrysosporthe cubensis* grown in submerged culture.** Adviser: Sebastião Tavares de Rezende. Co-adviser: Daniel Luciano Falkoski.

Results obtained recently in our research group (Production and Characterization of biotechnological interest Enzyme) have demonstrated that *Chrysosporthe cubensis*, fungal pathogen of eucalyptus, has showed potential for producing enzymes involved in saccharification of lignocellulosic biomass. In this work *C. cubensis* was cultivated in several carbon sources with the view to observe the production of cellulases and hemicellulases. Complex carbon sources such as wheat bran, carboxymethylcellulose – CMC, Birchwood xylan – XB, Locust bean gum – LBG, citrus peel – CP and also simpler carbon sources such as glucose, cellobiose, lactose, galactose, mannose, xylose and arabinose were tested as enzymatic activity inducers. *C. cubensis* produced greater levels of cellulolytic and hemicellulolytic activities when added with wheat bran and CMC. When cultivated in wheat bran *C. cubensis* reached values for  $\beta$ -glucosidase, endoglucanase and xylanase activities of 0,36 U/mL, 3,6 U/mL, 14,2 U/mL, respectively. When cultivated in CMC, *C. cubensis* produced  $\beta$ -glucosidase, endoglucanase and xylanase activities of 0,48 U/mL, 2,8 U/mL, 10,7 U/mL, respectively. When cultivated in birchwood xylan extracted produced by *C. cubensis* presented xylanase activity of 9,9 U/mL, however it was not efficient for inducing cellulases. Simpler carbon sources generally presented low inducing capacity in *C. cubensis*. Zimograms were made with the aim to analyze qualitatively the enzymes present in extracts produced by fungus *C. cubensis*. Zimogram containing fluorescent substrate of 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, has demonstrated that *C. cubensis* was able to produce  $\beta$ -glucosidase activity, when cultivated in all sources of carbon, except in mannose and galactose. Extracts produced by *C. cubensis*, cultivated in complex sources, presented a  $\beta$ -glucosidase of 55,6 kDa. Presences of possible complexes of high molecular weight, containing  $\beta$ -glucosidase activity were also detected. Among extracts produced in the presence of simpler sources, lactose induced the same group of  $\beta$ -glucosidases as complex sources. Xylose and arabinose also showed activity bands with high molecular weights. Xylose also induced a  $\beta$ -glucosidase of 74

kDa and the arabinose was able to induce the production of a  $\beta$ -glucosidase of 48 kDa and other of 55,6 kDa. Glucose induced a  $\beta$ -glucosidase of 106,8 kDa and other of 48 kDa. Zimogram containing birchwood xylan as substrate, has demonstrated that *C. cubensis* was able of producing a xylanase constitutive of 19 kDa when added in all sources tested. XB-SDS-PAGE has shown that *C. cubensis* was able to produce a constitutive xylanase of 19 kDa, when grown in any sources tested. Extracts produced by wheat bran, CMC and birchwood xylan, presented a well defined region activity of xylanase between 97 and 39 kDa. *Locust bean gum* and *citrus peel* were able to induce the production of a xylanase of 37,3 kDa. Xylose has induced the production of two xylanases, one of 53,2 kDa and other of 47,9 kDa. The extract produced by the fungus added in arabinose, presented a band standard similar to what is found in the extract from grown in xylose. Glucose, lactose, galactose and mannose showed only the basal activity of 19 kDa xylanase. Zimogram containing CMC as substrate has demonstrated that only extract produced by *C. cubensis* added in mannose and xylose, it was not possible to observe the activity of endoglucanase. Wheat bran, CMC and *Birchwood* xylan induced the production of two endoglucanases, one of 38 kDa and other of 55,6 kDa. When *C. cubensis* grew in glucose, LBG, CP, lactose, galactose, arabinose and cellobiose it was possible to view the production of one endoglucanase of 38 kDa. Analyzing results of enzymatic activities together with zimogram analysis, it is clear that complex sources as wheat bran, CMC and Birchwood xylan have high inducing potential in relation to the production of enzymes involved with biomass scarification. Simpler sources, on the other hand, although they do not present meaningful values of enzymatic activities, may trigger production of cellulases as much as hemicellulases, albeit in discrete level.

## 1. INTRODUÇÃO

Celulases e hemicelulases são grupos de enzimas que catalisam a hidrólise da celulose e da hemicelulose, respectivamente, transformando estes polímeros, presentes na parede celular vegetal, em açúcares de menores massas moleculares. Celulases são compostas principalmente por três tipos principais de enzimas. As endoglicanases (E.C. 3.2.1.4), que atacam de maneira aleatória as ligações glicosídicas no interior das cadeias de celulose, gerando cadeias menores, com extremidades redutoras e não redutoras. As celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91), que atuam nas extremidades redutoras e não redutoras liberando moléculas de celobiose que, por fim, serão hidrolisadas com o auxílio das enzimas  $\beta$ -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) à glicose. As hemicelulases são compostas por uma ampla gama de enzimas. Dentre as mais conhecidas estão as xilanases (E.C. 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), mananases (E.C. 3.2.1.78),  $\alpha$ -arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55) e as  $\alpha$ -galactosidases (E.C. 3.2.1.22). Estas enzimas atuam de maneira cooperativa e sinérgica com as celulases no processo de despolimerização da celulose e hemicelulose da biomassa.

Celulases e hemicelulases são enzimas que possuem uma ampla aplicação biotecnológica, podendo ser empregadas na indústria de alimentos e rações, indústria têxtil, indústria de celulose e papel e em processos de sacarificação da biomassa para produção do etanol lignocelulósico. Em especial, a produção economicamente viável do etanol a partir da biomassa lignocelulósica é ainda um objetivo não alcançado, principalmente devido aos altos custos na produção das enzimas empregadas no processo.

Sistemas celulolíticos completos podem ser produzidos por diferentes gêneros e espécies de fungos e bactérias. A produção de celulases e hemicelulases já foram descritas em uma ampla variedade de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, que têm sido organismos tradicionais para a produção destas enzimas.

Conhecendo as potenciais aplicações das celulases e hemicelulases, bem como a necessidade de desonerar o processo de produção do etanol lignocelulósico, a investigação de como vias metabólicas dos fungos são induzidas ou reprimidas

quanto a capacidade de produção de tais enzimas é de fundamental importância. Através do conhecimento de moléculas indutoras e repressoras pode-se condicionar o fungo a produzir altos níveis das enzimas desejadas, por meio de uma simples manipulação do meio de crescimento.

Resultados recentes obtidos por nosso grupo de pesquisa (Produção e caracterização de Enzimas de Interesse Biotecnológico) têm demonstrado que *Chrysosporthe cubensis*, fungo patógeno de eucalipto, tem apresentado potencial para produção de enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa lignocelulósica.

O objetivo deste trabalho foi investigar várias fontes de carbono que podem estar relacionadas na inibição ou indução da produção de celulases e hemicelulases pelo fungo *Chrysosporthe cubensis*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi analisar diversas fontes de carbono quanto a capacidade de ativar ou inibir a produção de celulases e hemicelulases em *C. cubensis*.

### **2.2. Objetivos específicos**

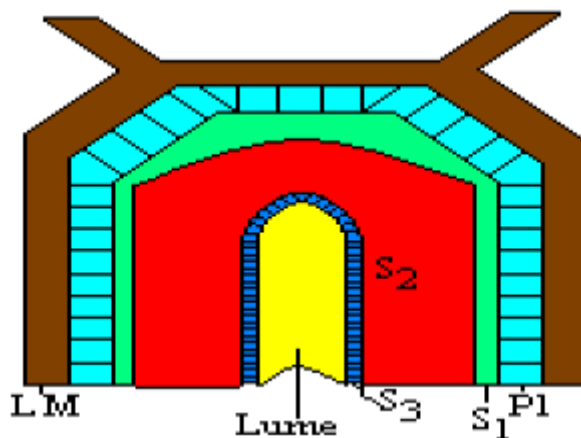
- Averiguar a produção de celulases e hemicelulases pelo fungo *C. cubensis*, quando cultivado nas seguintes fontes de carbono: Farelo de trigo, carboximetilcelulose (CMC), xilana *Birchwood*, *citrus peel* (CP), *Locust bean gum* (LBG), glicose, celobiose, xilose, lactose, galactose, arabinose e manose.
- Analisar as taxas de consumo das fontes de carbono para glicose, arabinose e xilose.
- Fazer análise em zimograma e observar o perfil de atividades nos extratos produzidos por *C. cubensis* quando crescidos em cada fonte de carbono.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Biomassa Lignocelulósica e Parede Celular Vegetal

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes da biosfera, representando cerca de 50% de toda a biomassa terrestre. Estes materiais são oriundos da parede celular encontrada nas células vegetais, portanto, compreender a constituição da parede celular vegetal é de suma importância para um conhecimento mais aprofundado acerca destes materiais (Bon *et al.*, 2008).

A parede celular vegetal é constituída por uma matriz dura e fibrosa que confere proteção e resistência às células que envolvem, sendo composta principalmente por fibras flexíveis de celulose, hemicelulose e pectina, que estão embebidas em uma matriz polifenólica chamada lignina (Bon *et al.*, 2008). Com o advento da microscopia eletrônica, entre as décadas de 1930 e 1970, uma maior compreensão das estruturas das paredes celulares foi alcançada, e observou-se que em geral esta é formada por três camadas: lamela média, parede celular primária e parede celular secundária, conforme Figura 1.



**Figura 1** – Desenho esquemático representando estrutura da parede celular vegetal. LM: Lamela média, P1: Parede celular primária, S (S1, S2 e S3): Parede celular secundária. Fonte: Klock (6)

A lamela média é uma fina camada, com espessura variando de 0,2 a 1,0  $\mu\text{m}$ , rica essencialmente em lignina, que une as células vegetais entre si formando o tecido. Esta apresenta substâncias pécticas, principalmente em seu estado inicial de formação (Klock *et al.*, 2005).

A parede celular primária contém quantidades limitadas de celulose. As fibrilas de celulose são arrançadas em finas camadas que se cruzam formando um aspecto de rede. Além da celulose, esta camada contém hemiceluloses, pectina e proteínas envolvidas numa matriz de lignina e possui espessura entre 0,1 a 0,2  $\mu\text{m}$  (Klock *et al.*, 2005).

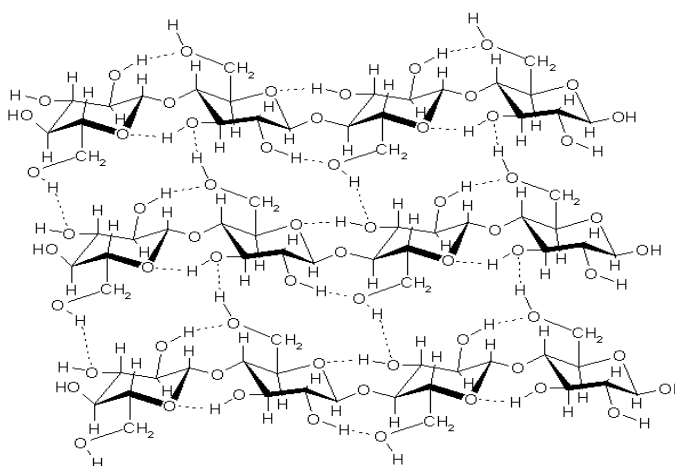
A parede celular secundária é a porção mais espessa da parede celular, podendo variar de 1 a 10  $\mu\text{m}$ . Esta pode ser constituída por 90% ou mais de fibras de celulose. A parede celular secundária pode ser separada basicamente em três camadas. A camada S1 é a camada mais externa que faz contato com a parede celular primária. Esta possui espessura de 0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$ , contendo microfibrilas orientadas aproximadamente de maneira transversal ao comprimento da célula. Esta camada é mais lignificada, assemelhando-se a parede primária, sendo, portanto, mais resistente ao ataque de fungos que a camada S2 (Klock *et al.*, 2005). A camada S2 da parede celular secundária é a camada mais espessa da parede celular, com espessamento variando entre 1 a 9  $\mu\text{m}$ . A camada interior de S2 tem um conteúdo mais elevado em celulose enquanto a parte exterior, próxima a S1, é relativamente rica em hemicelulose. As microfibrilas de celulose nesta camada estão orientadas em posição longitudinal em relação ao comprimento da célula. Finalmente, a camada S3 da parede celular secundária, também conhecida como parede celular terciária, possui elevado teor de celulose e fibrilas de celulose orientadas de maneira aproximadamente transversal ao comprimento da célula (Klock *et al.*, 2005).

Já conhecendo as estruturas que compõem a parede celular vegetal, nos tópicos seguintes serão abordadas de maneira mais aprofundada as três principais macromoléculas encontradas em sua composição; a celulose, a hemicelulose e a lignina.

### **3.1.1. Celulose**

A celulose é o principal componente da parede celular dos vegetais. É um homopolímero constituído de resíduos de D-glicose, ligados através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 podendo ter cerca de 15000 resíduos por cadeia (Nelson *et al.*,

2002). As cadeias de celulose podem estabelecer interações de hidrogênio, tanto intramoleculares quanto intermoleculares, que fazem com que as cadeias de celulose sejam agregadas na forma de microfibrilas, na qual regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas interagem entre si para formar as fibrilas, e estas, por fim, dão origem às fibras celulósicas. Como consequência, a supraestrutura celulósica possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (Klock *et al.*, 2005; Bon *et al.*, 2008). A Figura 2 apresenta as diversas interações de hidrogênio que ocorrem entre os resíduos de glicose presentes nas cadeias celulósicas.



**Figura 2** - Estrutura da molécula de celulose destacando-se as ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares entre os resíduos de glicose. *Fonte:* [http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F09\\_2.html](http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F09_2.html)

### 3.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses (polioses) são misturas de heteropolímeros encontrados na parede celular de plantas, que estão intimamente associadas à celulose e à lignina. Enquanto a celulose é constituída apenas por resíduos de D-glicose, a composição das polioses é bastante heterogenea e variada, podendo ser encontrados os seguintes açúcares: xilose, manose, glicose, arabinose, galactose, ácido galactourônico, ácido glicourônico e ácido metilglicourônico (Klock *et al.*, 2005). Outras diferenças encontradas nas hemiceluloses em relação à celulose são a presença de cadeias ramificadas, e o menor grau de polimerização da molécula, apresentando entre 100 e 200 unidades glicosídicas por polissacarídeo (Bon *et al.*, 2008). É importante ressaltar que o termo hemicelulose não designa um composto

químico definido, mas sim uma classe de polímeros encontrados em vegetais, cada qual possuindo características peculiares. O teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses variam amplamente de espécie para espécie, e até mesmo de árvore para árvore, dentro de uma mesma espécie.

Existem quatro grupos principais de hemiceluloses, baseadas na composição da cadeia principal. São elas as xilanas, mananas,  $\beta$ -glucanas e xiloglucanas.

As xilanas são heteropolímeros cuja cadeia principal é constituída de resíduos de xilose unidos por ligações  $\beta$ -1,4. Existem diversos tipos de xilanas na natureza, dentre elas se destacam as glicouroxilanas e as arabinoglicouroxilanas (Bordenave, 2009). As glucouranoxilanas são encontradas nas madeiras de folhosas, onde é o principal componente hemicelulósico, cujo teor varia entre 20 a 35 % de sua massa seca (Klock et al., 2005). Possuem uma cadeia linear de D-xilose com unidades de ácido D-glicourônico e grupos acetila ligadas à cadeia principal, possuindo um grau de polimerização entre 50 e 300 (Junior, 2007). As arabinoglicouranoxilanas são polímeros de glicouranoxilanas com ramificações ou terminações de L-arabinose. Este polímero possui grau de polimerização entre 80 e 270.

Mananas são heteropolímeros cuja cadeia principal contém resíduos de D-manose e glicose ligados através de ligações  $\beta$ -1,4. Dois principais tipos de mananas são encontrados na natureza, as galactoglicomananas e as glicomananas (Bordenave, 2009). As galactoglicomananas podem ocorrer em até 20% na madeira de coníferas. São polímeros constituídos por unidades de glicose e manose na cadeia principal, contendo ramificações de galactose ao longo da cadeia (Klock et al., 2005). As glicomananas são juntamente com as galactoglicomananas os principais constituintes da porção hemicelulósica de coníferas. Estas são compostas por resíduos de manose e glicose ocorrendo na proporção de 3 resíduos de manose para 1 de glicose.

As xiloglucanas apresentam cadeia principal composta por resíduos de glicose ligados por ligações  $\beta$ -1,4 contendo ramificações de xilose ligadas na posição 6 da cadeia principal. É altamente associada às microfibrilas celulósicas na parede celular de plantas, através de interações de hidrogênio.

$\beta$ -glicanas apresentam resíduos de glicose na cadeia principal ligados tanto por ligação  $\beta$ -1,4 quanto por ligações  $\beta$ -1,3. Esta hemicelulose é encontrada em grãos de cereais e são as principais moléculas associadas às microfibrilas de celulose durante o crescimento celular (Bordenave, 2009).

### 3.1.3. Lignina

A lignina, juntamente com as hemiceluloses e a pectina preenche os espaços entre as fibras de celulose e atua como material ligante entre os componentes da parede celular. Esta é um polímero de natureza aromática formada por unidades de fenil-propano, com substituintes metoxil no anel aromático, unidas entre si por ligações éter e ligações carbono-carbono. É uma estrutura tridimensional altamente complexa e variada, possuindo massa molecular bastante elevada. A lignina é formada pela polimerização de três tipos de monomeros, que se diferenciam quanto aos substituintes ligados ao anel aromático. São eles o álcool cumárico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico.

A lignina confere a madeira propriedades de resistência e elasticidade bastante únicas, além de ser um selante estrutural e conferir grande resistência ao ataque microbiano às plantas (Klock *et al.*, 2005; Bon *et al.*, 2008). A Figura 3 apresenta a estrutura polimérica da lignina de coníferas.

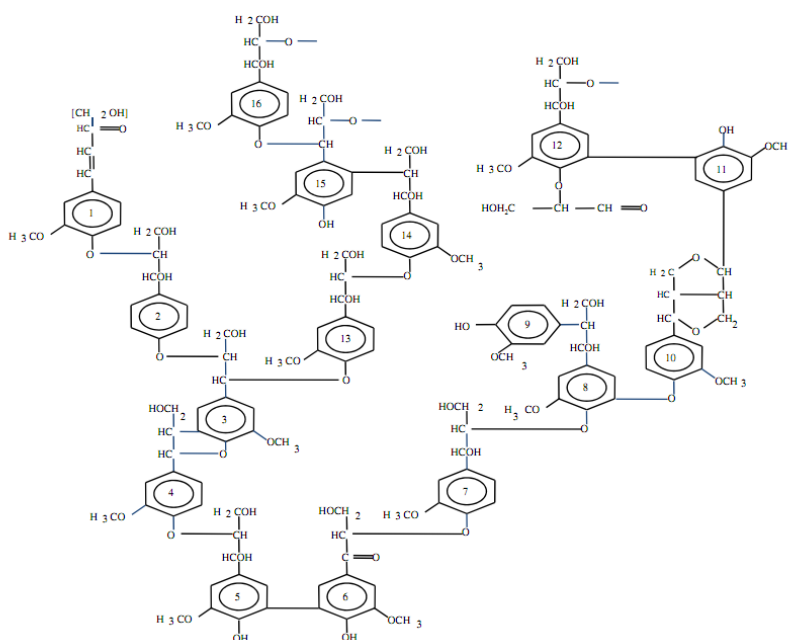


Figura 3 - Estrutura da lignina de conífera (Gomide, 2011).

## 3.2. Degradação enzimática da biomassa lignocelulósica

### 3.2.1. Celulases

Uma eficiente hidrólise da celulose requer a presença de três grupos de enzimas que atuam de maneira sinérgica na completa despolimerização da macromolécula. As enzimas celulolíticas são divididas em três classes, são elas as endoglicanases (EG), as celobiohidrolases (CBH) e as  $\beta$ -glicosidases (BG).

As endoglicanases - endo-1,4- $\beta$ -D-glicanases (EG) (EC 3.2.1.4) – atuam hidrolisando randomicamente regiões internas da cadeia de celulose. Esta enzima tem maior afinidade por regiões amorfas, devido a maior acessibilidade, e através da hidrólise da celulose produz celo-oligossacarídeos que serão hidrolizados pelas CBH (Jørgensen *et al.*, 2007, Bon *et al.*, 2008).

As celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91) atuam nos celo-oligossacarídeos hidrolizando-os em suas extremidades. Estas atuam movendo-se de maneira processiva ao longo da cadeia liberando moléculas de celobiose, e possuem em suas estruturas, além do sítio catalítico, uma região responsável pela ligação da enzima ao substrato, CBD (*cellulose binding domain*) que confere processividade a enzima. As celobiohidrolases são divididas em dois grupos, as celobiohidrolases do tipo 1 (CBH1) e as celobiohidrolases do tipo 2 (CBH 2). As CBH1 atuam nas extremidades redutoras das cadeias de celulose, e as CBH 2 atuam nas extremidades não redutoras dos celo-oligossacarídeos. O produto da catálise das CBH, a celobiose é inibidor deste grupo de enzimas (Bon *et al.*, 2008).

$\beta$ -glicosidases - 1,4- $\beta$ -d-glicosidases (EC 3.2.1.21) - são as enzimas que finalizam o processo de despolimerização da celulose, catalisando a hidrólise da celobiose à glicose. Estas enzimas possuem papel fundamental no processo de sacarificação da celulose, já que ao hidrolisar a celobiose a duas moléculas de glicose, é retirado do meio um importante inibidor do processo, além de finalizar o processo de sacarificação, produzindo glicose. Tem sido reportado que as  $\beta$ -glicosidases sofrem inibição por glicose (Bon *et al.*, 2008).

### 3.2.2. Hemicelulases

As hemicelulases são compostas por uma variada gama de enzimas, que atuam na hidrólise das diferentes ligações encontradas nos diversos polímeros contidos na hemicelulose.

Muitas hemicelulases são proteínas modulares e além de seus domínios catalíticos podem possuir outros domínios funcionais em suas estruturas (Shallom *et al.*, 2003).

As hemicelulases podem ser ou glicosil-hidrolases (GH), que hidrolisam ligações glicosídicas, ou carboidrato estereases (CE), que hidrolisam ligações ester de grupos acetato ou grupos laterais de ácido ferrúlico. Baseando-se na homologia da sequência primária dos domínios catalíticos, as enzimas podem ser separadas em famílias classificadas por números (e.g. GH7 para glicosil hidrolase da família 7). Algumas famílias que possuem o enovelamento global similar são agrupadas em clãs, que são identificados alfabeticamente (e.g. GH-A). A seguir, serão descritas algumas das principais hemicelulases, bem como suas características.

Xilanases (E.C. 3.2.1.8) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4 no interior das cadeias principais de xilana, liberando xilooligossacarídeos. Estas enzimas, em sua maioria, pertencem às famílias GH10 e GH11, mas também existem algumas xilanases nas famílias 5, 8 e 43 (Shallom *et al.*, 2003).

As  $\beta$ -xilosidases (E.C. 3.2.1.37) atuam nas extremidades não redutoras de moléculas de xilobiose e xilooligossacarídeos curtos, oriundos da ação das xilanases, liberando por fim, moléculas de xilose. A afinidade desta enzima pelo substrato decresce com o aumento do polímero, sendo assim, as  $\beta$ -xilosidases são praticamente inativas contra xilana polimérica (Shallom *et al.*, 2003, Delcheva *et al.*, 2008).

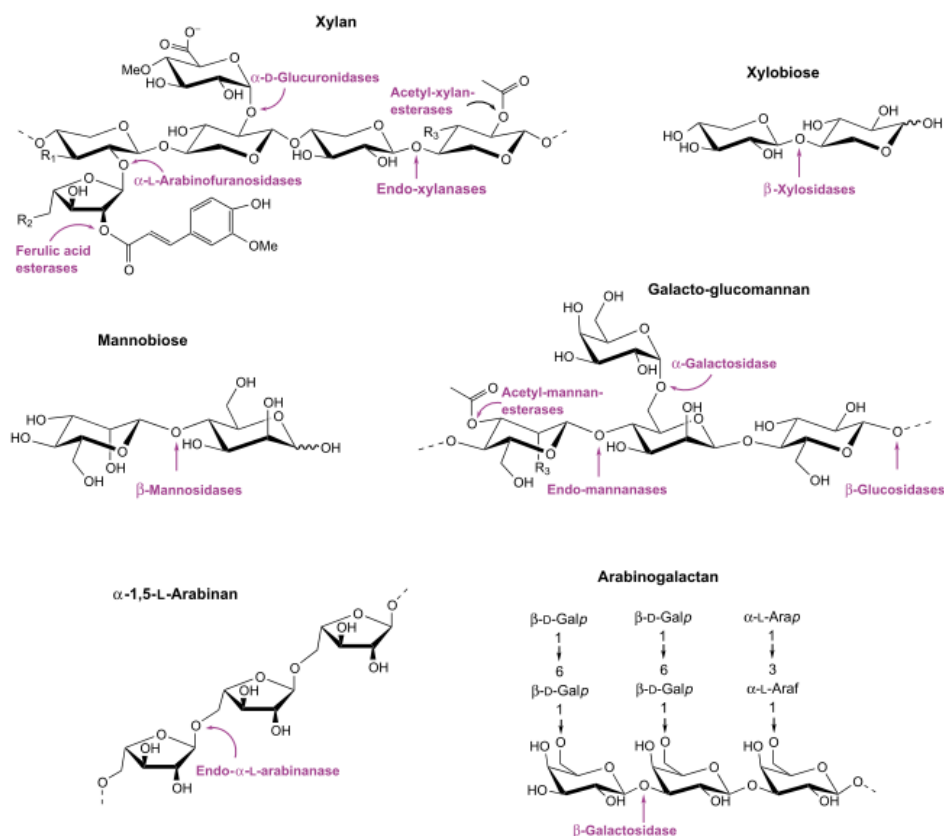
Mananases (E.C. 3.2.1.78) catalisam a hidrólise das cadeias principais de galactomananas, glicomananas, galactoglicomananas e mananas, de maneira randômica, produzindo mano-oligômeros que serão posteriormente hidrolisados pelas  $\beta$ -manosidases (Jiang *et al.*, 2006). Mananases são classificadas nas famílias

das glicosil-hidrolases 5 e 26, que estão inseridas em um grupo maior denominado GH A, um grupo de enzimas que compartilham o motivo estrutural TIM barril- $\beta$ .

$\alpha$ -Galactosidases (E.C. 3.2.1.22) atuam nas extremidades não redutoras de pequenos oligossacarídeos, que possuem a galactose ligada através de ligação  $\alpha$ -1,6 a outros açúcares. Esta ligação é encontrada em moléculas de meliobiose ( $\alpha$ -galactosil-1,6-glucose), rafinose ( $\alpha$ -galactosil-1,6-sacarose) e estaquiose ( $\alpha$ -galactosil-1,6-rafinose), e também, podem atuar em substratos poliméricos, como as ramificações de mananas e glicomananas, onde grupos galactosil, estão ligados a cadeia principal por ligações  $\alpha$ -1,6. Com base na similaridade das sequências de aminoácidos as  $\alpha$ -galactosidases são classificadas dentro das famílias das glicosil-hidrolases 4, 27, 36 e 57 (Cao *et al.*, 2007, Puchart *et al.*, 2000)

$\alpha$ -Arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55) e  $\alpha$ -arabinanases catalisam a hidrólise de resíduos de arabinofuranosil em hemiceluloses, sendo encontradas nas famílias GH 3, 43, 51, 54 e 62. Algumas destas enzimas possuem ampla especificidade, podendo atuar na hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,5 envolvendo arabinofuranosídeos em cadeias hemicelulósicas (Puchart *et al.*, 2000; Shallon *et al.* 2003).

A Figura 4 mostra como as diversas hemicelulases atuam nas variadas porções hemicelulósicas encontradas na natureza.



**Figura 4** – Hidrólise enzimática da hemicelulose (Shallon *et al.*, 2003)

Muitas celulasas e hemicelulasas possuem domínios adicionais, além do domínio catalítico, como o domínio de ligação a carboidratos (CBM), que auxilia no a enzimas no ancoramento nas estruturas polissacarídicas.

### 3.3. Celulasas e Hemicelulasas: Aplicações

Enzimas que atuam no complexo lignocelulósico tem sido comercialmente disponíveis há mais de 30 anos, e estas enzimas tem sido alvo de intensas pesquisas acadêmicas e industriais. Celulasas e hemicelulasas tem apresentado elevado potencial biotecnológico em várias indústrias como nas indústrias alimentícia, de ração, de celulose e papel e na sacarificação da biomassa para produção de etanol. A seguir serão abordadas algumas aplicações das enzimas celulasas e hemicelulasas (Bon *et al.*, 2008).

A produção de etanol através de matérias lignocelulósicos consiste basicamente em quatro etapas: o pré-tratamento do material, a sacarificação, a fermentação e a destilação. Diferentes estratégias têm sido estudadas para a produção do etanol lignocelulósico. Uma estratégia tradicional é a hidrólise e

fermentação em separado (*SHF – Separated Hydrolysis and Fermentation*), onde após o pré-tratamento a biomassa é sacarificada, e o hidrolisado oriundo da sacarificação é posteriormente submetido à fermentação. Outra estratégia é a chamada sacarificação e fermentação simultânea (*SSF - Simultaneous Saccharification and Fermentation*), onde o processo de sacarificação ocorre juntamente com a sacarificação enzimática, ou seja, à medida que os açúcares são liberados da biomassa vão sendo consumidos e fermentados até etanol pelo microrganismo. Uma outra estratégia para produção de etanol, é o chamado bioprocesso consolidado (*CBP – Consolidated BioProcess*). Esse processo idealiza a produção em um único reator de todas as celulasas e hemicelulasas requeridas para a sacarificação da biomassa, de maneira simultânea à fermentação dos açúcares por um único microrganismo recombinante.

Uma etapa chave no processo de produção de etanol lignocelulósico possa ocorrer é a sacarificação da biomassa. Para isso é necessário que as celulasas e hemicelulasas possuam características compatíveis com as condições industriais a que serão desafiadas. A confecção de enzimas termoestáveis a temperaturas elevadas tem sido alvo de intensos estudos, pois aumentando-se a temperatura do processo de sacarificação enzimática seria possível a diminuição do tempo de hidrólise (36 horas) quando comparado a hidrólise ácida (15 minutos) (Bon, *et al.*, 2008; Kuhad *et al.*, 2011).

O uso de celulasas e especialmente hemicelulasas na indústria de celulose e papel tem ganhado destaque nas últimas décadas. Estas enzimas podem atuar no processamento e no branqueamento de polpa de celulose. Quando xilanases são aplicadas no tratamento de polpas celulósicas, esta atua no rompimento dos polímeros de xilana, tornando a estrutura da polpa mais flexível, levando a uma melhor extração da lignina e, por conseguinte, a redução de compostos clorados altamente tóxicos utilizados nos processos de branqueamento. Outras enzimas aplicadas na indústria de celulose e papel são as mananases e as pectinases (de Almeida, 2009; Bon *et al.*, 2008).

### 3.4. *Chrysoporthe cubensis*

*Chrysoporthe cubensis* é um importante patógeno de espécies de *Eucaliptus* plantadas como árvores não nativas em regiões de clima tropical e subtropical ao redor do mundo para fins comerciais.

A principal patologia relacionada à infecção por *C. cubensis* é a doença do cancro, uma patologia que ocorre no tronco das plantas hospedeiras causando lesões superficiais ou profundas e que podem levar a morte (Alfenas, 2009). *C. cubensis* incide de maneira severa em determinadas procedências de *Eucaliptus grandis* e *Eucaliptus saligna*. Além de *Eucaliptus* o patógeno pode infectar outras melastomatáceas como cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*), araçazeiro (*Psidium* spp.), quaresmeira (*Tibouchina* sp.) e goiaba-de-anta (*Bellucia dichotoma*) (Alfenas, 2009).

*C. cubensis* e seus parentes mais próximos tem sido encontrados em muitos membros de Melastomatacea encontradas como plantas nativas nas Américas do Sul e Central e em plantas não nativas como *Eucaliptus* spp. e *S. cordatum*. Isto suporta a idéia de que *C. cubensis* possa ser um organismo originário das Américas Central e do Sul onde possivelmente migrou de hospedeiro para espécies de *Eucaliptus* (Pegg et al. 2010).

Nos últimos anos numerosos isolados de *C. cubensis* têm sido coletados e isolados ao redor do mundo em diversos tipos de hospedeiros. Boa parte destes isolados tem sido caracterizada baseando-se nas sequências da região ITS do operon do DNA ribossomal, dos genes da  $\beta$ -tubulina e dos genes da histona H3. Estas comparações tem mostrado que *C. cubensis* pode ser agrupado em duas subclasses filogenéticas bem resolvidas, que de maneira grosseira, estão também relacionadas à distribuição geográfica do fungo ao redor do mundo. Uma subclasse da América do Sul engloba isolados encontrados principalmente na América do Sul, mas isolados encontrados no Congo e em Camarões também compõem estes grupo. Já a segunda sub-classe, a subclasse do Sudeste da Ásia engloba fungos isolados no sudeste da Ásia, Austrália, Tanzânia, Quênia, Moçambique e Havaí. Isolados ligados a essas duas subclasses são morfologicamente e fenotipicamente indistinguíveis (Gryzenhout, et al. 2006, Pegg et al. 2010).

Estudos recentes tem apontado elevado potencial biotecnológico para *C. cubensis*, sobretudo na produção de enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa lignocelulósica. *C. cubensis* apresentou alta produção de atividade de endoglicanase (33.84 U g<sup>-1</sup>), FPase (2.52 U g<sup>-1</sup>), β-glucosidase (21.55 U g<sup>-1</sup>) and xilanase (362.38 U g<sup>-1</sup>) quando cultivado em meio sólido contendo farelo de trigo como fonte de carbono. Além disso, o extrato enzimático produzido por *C. cubensis* apresentou melhores rendimentos no processo de sacarificação do bagaço de cana pré-tratado em condições alcalinas quando comparado a um coquetel de celulases comercial (Falkosky et al. 2013).

### **3.5. Processo de indução de celulases e hemicelulases em fungos**

#### **3.5.1. Visão Geral**

Os processos de produção de celulases e hemicelulases variam sobremaneira quando se comparam diferentes organismos. Em bactérias como *Clostridium thermocellum*, *Cellulomonas flavigena* e *Pseudomonas fluorescens var. cellulosa*, a expressão de celulases ocorre de maneira constitutiva, enquanto que em fungos, há um complexo mecanismo de regulação da expressão destas enzimas (Suto *et al.*, 2001).

Nos fungos existem basicamente três estados na regulação de celulases e hemicelulases: a expressão em nível basal, a produção induzida por indutores e a repressão catabólica por carbono.

A expressão em nível basal ocorre quando não há ligação de proteínas ativadoras, nem de proteínas repressoras, às regiões reguladoras dos genes. Nestas condições, os genes são transcritos em uma pequena extensão, conferindo a expressão basal de celulases e hemicelulases pelo fungo. A expressão em nível basal é extremamente importante nos processos de indução, pois estas enzimas hidrolisam o substrato polimérico liberando moléculas menores, como pequenos celobiosídeos e monossacarídeos, que podem atuar como indutores no processo de produção de celulases e hemicelulases. Portanto, as enzimas secretadas em nível basal possuem um papel fundamental no processo de desencadeamento da indução de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (Suto *et al.*, 2001).

Uma vez que moléculas indutoras entram nas células, estas podem induzir a ativação da transcrição de genes codificantes para celulases e hemicelulases culminando numa produção enzimática maciça. Estes processos são mediados por proteínas ativadoras e elementos ativadores. A grande quantidade de enzimas secretadas hidrolisam os polímeros celulósicos e hemicelulósicos, fornecendo fonte de carbono necessária para a nutrição do fungo (Suto *et al.*, 2001).

### **3.5.2. Moléculas Indutoras**

Diversos fungos produzem celulases e hemicelulases somente quando estão em meio contendo a molécula alvo da hidrólise, como a celulose e a xilana. Todavia, a celulose, por ser um polímero de alto peso molecular, é incapaz de induzir por si só, o processo de indução de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Pensando nisto, muitas pesquisas têm focado os produtos da hidrólise da celulose, bem como da hemicelulose, a fim de investigar as reais moléculas envolvidas nos processos de indução (Klock *et al.*, 2005; Suto *et al.*, 2001).

Mandels *et al.* (1960) realizaram uma triagem de possíveis moléculas que seriam capazes de induzir a produção de celulases em *Trichoderma viride* e no basideomiceto QM806. Quando estes fungos foram crescidos em celuloses de diversas origens, como algodão, carboximetilcelulose e celulose bacteriana, apresentaram boa produção de celulases. Em seguida foi realizada a triagem de monossacarídeos e dissacarídeos, a fim de identificar os reais indutores do processo de indução, pois como mencionado anteriormente, compostos poliméricos, por si só, são incapazes de entrar nas células e desencadear o processo indutivo. Após crescimento dos fungos em meios contendo 0,5% das fontes de carbono, foi constatado que lactose, salicilina e celobiose, foram fontes de carbono capazes de induzir a produção de celulases no basideomiceto QM806, ao passo que a glicose não. Em *Trichoderma viride*, lactose, celobiose e glicose foram capazes de induzir o processo, já a salicilina não induziu. Outras moléculas investigadas foram: xilose, arabinose, galactose, frutose, sacarose, maltose, glicerol, manitol, gluconolactona, metil  $\beta$ -glucosídeo, celobionato de cálcio, lactobionato de cálcio, amido, quitina de *Aspergillus luchuensis*, succinato, peptona, e óleo de coco, mas nenhuma destas fontes foram capazes de induzir a produção de celulases no fungo basideomiceto QM806. Resultados similares foram encontrados para *T. viride* (Mandels *et al.*, 1960).

Muitos celooligossacarídeos e seus derivados têm sido reportados na literatura como potenciais indutores de enzimas celulolíticas. A celobiose, um dissacarídeo de glicoses ligadas por ligação  $\beta$ -1,4, tem sido observada como um importante indutor de celulases. Foi investigada a influência da celobiose na indução de celulases no fungo basideomiceto QM806, e constatou-se que esta poderia ser uma molécula indutora, e que a sua capacidade de indução está estreitamente ligada a sua concentração no meio. Quando os basideomicetos foram crescidos em celobiose a uma concentração de 0,5%, a produção de celulases foi baixa. Já quando os mesmos 0,5% de celobiose foram adicionados lentamente, durante três dias ao meio de crescimento, houve um aumento expressivo na produção das enzimas celulolíticas (Mandels *et al.*, 1960).

A soforose, um dissacarídeo de glicoses, ligadas por ligação  $\beta$ -1,2 tem sido um potente indutor de celulases em *Hypocrea jecorina* (Van Dyk *et al.*, 2012) (anamorph: *Trichoderma reesei*), podendo induzir 2500 vezes mais do que a celobiose neste organismo. Apesar da soforose não ser um resíduo liberado diretamente da celulose, foi proposto que sua síntese poderia ocorrer através de uma atividade de transglicosilação da  $\beta$ -glicosidase, onde esta converteria a celobiose em soforose (Suto *et al.*, 2001).

A xilose, um dos produtos da hidrólise da xilana, pode atuar como molécula indutora em *Thermoascus aurantiacus* induzindo a produção de xilanase,  $\beta$ -glicosidase e endoglicanase. Em contrapartida, este monossacarídeo, quando presente no meio em altas concentrações, atua de maneira reversa, e desencadeia o processo de repressão catabólica, inibindo a produção de celulases e hemicelulases (Brienzo *et al.*, 2012).

Enzimas xilanolíticas são produzidas em *Aspergillus* quando estes são crescidos em xilose e xilana. Todavia quando estes fungos crescem em glicose e galactose, a produção das enzimas não é ativada. Xilose e xilana são capazes de induzir não só a produção de enzimas xilanolíticas, mas também podem muitas vezes ativar a produção de enzimas celulolíticas. Isto sugere um sistema de regulação geral para estas enzimas em fungos do gênero *Aspergillus* (de Vries *et al.* 2001).

### 3.5.3. Fatores e Elementos de Transcrição

#### 3.5.3.1. Ativadores transcricionais

Uma proteína ativadora transcricional de *Aspergillus niger*, XlnR, tem sido isolada e classificado como membro da família de ativadores transcricionais do tipo GAL4. A caracterização de XlnR permitiu observar que esta proteína foi a responsável pela ativação dos genes de endoxilanasase e  $\beta$ -xilosidase. A expressão dos genes que codificam para XlnR é ativada em presença de xilose, portanto, é uma via de ativação pela xilose, um produto da hidrólise da xilana. Curiosamente, foi observado que XlnR estaria ligado não só a expressão de genes hemicelulolíticos, mas também à expressão de alguns genes celulolíticos. Alguns genes ativados por XlnR em *A. niger* são: duas endoxilanasases (xlnB e xlnC), uma  $\beta$ -xilosidase (xlnD), duas endoglicanases (eglA e eglB), dentre outros. Entretanto, genes codificantes para arabinofuranisidase e  $\beta$ -glicosidase não foram regulados por XlnR (de Vries *et al.* 2001, Stricker *et al.*, 2008).

Uma análise das regiões promotoras de genes ativados por XlnR, demonstrou que o sítio de ligação para esta proteína ativadora é a sequência GGCTAA, sendo o segundo G essencial para que XlnR se ligue tanto *in vivo* quanto *in vitro* (de Vries *et al.* 2001). Um suposto sítio de ligação para XlnR foi encontrado na região promotora de um gene codificante para endoglucanase de *Aspergillus nidulans*, mas não houve a expressão deste gene em presença de xilose, o que sugere que a presença da sequência consenso no promotor não necessariamente confirma a regulação através de XlnR (de Vries *et al.* 2001).

Em *H. jecorina* uma sequência nucleotídica (5'-ATTGGGTAATA-3') entre -246 e -236, na região promotora do gene codificante para celobiohidrolase (*cbh2*), foi capaz de se ligar a um complexo protéico presente em extratos livres de células de fungos que cresceram em meio indutor para celobiohidrolase. Esta região foi chamada de *cbh2-activating element* (CAE). Zeilinger *et al.* (1998) criaram 3 oligonucleotídeos com porções mutadas da região CAE. Em um dos oligonucleotídeos, as adeninas presentes na região CCAAT box na fita molde, foram substituídas por nucleotídeos de timina, formando portanto uma região CCTTT. No segundo nucleotídeo, a região GTAATA, entre -241 e -242 foi mutada para GTTTTA.

O terceiro oligonucleotídeo compilou as duas sequências de mutações. O transformante, com as duas sequências mutadas, perdeu completamente a atividade transcricional, enquanto que os dois oligonucleotídeos com uma mutação simples obtiveram atividade transcricional reduzida (Zeilinger *et al.*, 1998). Portanto, parece que os dois motivos estão envolvidos de maneira cooperativa na regulação do promotor do gene *cbh2* em *H. jecorina* (Suto *et al.*, 2001; Zeilinger *et al.*, 1998).

### 3.5.3.2. Repressão Catabólica por carbono

Altos níveis de glicose (e até mesmo outros monossacarídeos, como a xilose) no meio, ativam o chamado sistema de repressão catabólica por carbono em diversos fungos. Este sistema de repressão a nível transcricional, impede que haja maciça produção de (hemi)celulases de maneira desnecessária para o organismo. Um conhecido sistema de repressão catabólica por carbono é encontrado em fungos do gênero *Aspergillus* (Ruijter *et al.*, 1997; de Vries *et al.* 2001). Nestes, a proteína repressora catabólica (CreA), uma proteína com domínio dedo de zinco, se liga aos seus sítios específicos (SYGGRG), presentes em diversas regiões promotoras de uma ampla gama de genes, inibindo assim a transcrição destes. Outras proteínas repressoras catabólicas são a MIG1 em leveduras e a CRE1 em *H. Jecorina*. Todas estas proteínas apresentam regiões conservadas de ligação ao DNA (Suto *et al.*, 2001, de Vries *et al.* 2001; Dowzer *et al.*, 1991).

A produção de proteínas repressoras catabólicas ocorre de maneira constitutiva, e sua presença, parece ser fundamental para o desenvolvimento dos fungos, já que mutantes defectivos para estas proteínas são inviáveis. Sendo estas proteínas constitutivas, a maneira pela qual elas atuam na regulação da expressão gênica parece ser quanto a sua localização subcelular. Em *Sclerotinia sclerotioru*, a proteína CRE1 está presente no núcleo celular quando o fungo cresce em meio contendo glicose como fonte de carbono. Entretanto, quando o micélio foi transferido para um meio contendo pectina, houve total depleção de proteínas CRE1 no núcleo. A proteína CRE1 esteve presente no citosol independente do meio em que o fungo foi cultivado. Um comportamento similar foi observado para o fungo *Aspergillus nidulans*. Portanto um modelo de transporte da proteína repressora catabólica em fungos tem sido proposto, onde em presença de glicose, a proteína repressora

catabólica está contida no núcleo, e na ausência de glicose, esta é transportada do núcleo para o citosol (Suto *et al.*, 2001).

A influência de proteínas repressoras catabólicas na regulação de enzimas envolvidadas na degradação da parede celular de plantas tem sido observada para diversas enzimas dentre vários gêneros de fungos. Em fungos do gênero *Aspergillus* CreA tem atuado na repressão de enzimas como arabinases e enzimas do catabolismo de L-arabinose, várias xilanases,  $\beta$ -xilosidases, dentre outras (de Vries *et al.* 2001, Dowzer *et al.*, 1991). Em *H. Jecorina*, vários genes que codificam para endoglicanase e celobiohidrolase são reprimidos a nível transcricional por repressão catabólica pela CRE1 (Suto *et al.*, 2001).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Materiais**

Substratos incluindo p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPGlc), p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNPXil), p-nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosídeo (pNPMan), p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (pNPGal), p-nitrofenil- $\alpha$ -D-arabinofuranosídeo (pNPAr), carboximetilcelulose (CMC), xilana *Birchwood*, *Locust bean gum*, ácido poligalacturônico, *citrus peel* e também os reagentes fosfato de monopotássio, nitrato de amônio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, sulfato de cobre, acetato de sódio, carbonato de sódio, ácido dinitrossalicílico (DNS) e *potato dextrose agar* (PDA) foram comprados de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Extrato de levedura foi obtido de Himedia Laboratories Co. (Mumbai, Maharashtra, India).

### **4.2. Microrganismo e cultivo**

O fungo *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. O fungo foi mantido em placas de PDA (*potato dextrose agar*) a 28°C e repicado periodicamente.

#### **4.2.1. Multiplicação e manutenção da cultura do fungo *Chrysosporthe cubensis***

Para a produção de extratos enzimáticos, *C. cubensis* foi repicado para tubos inclinados contendo meio sólido PDA e acondicionados em B.O.D. por 7 dias, a 30°C.

Após 7 dias de crescimento do fungo em meio sólido, os esporos foram ressuspensos em água destilada autoclavada e transferidos, sob condições assépticas, para erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura líquido contendo como única fonte de carbono glicose, celobiose, manose, arabinose, xilose, lactose, galactose, xilana *Birchwood*, CMC, farelo de trigo, *Locust bean gum* e *citrus peel*, todos a 1% (m/v) de concentração. Foram adicionados  $10^6$  esporos por mL de meio de cultura. O meio de cultura foi constituído de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,4 g; ureia, 0,3 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g;  $\text{CaCl}_2$ , 0,3 g. Os elementos traços adicionados foram  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e  $20\text{MoO}_3$   $2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$ .

Alíquotas dos extratos enzimáticos produzidos foram retiradas no 2°, 4° e 7° dias para análises.

#### **4.3. Determinação das atividades enzimáticas**

A atividade de xilanase foi determinada usando xilana *Birchwood* na concentração final 1% (m/v). As reações enzimáticas foram iniciadas pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução enzimática apropriadamente diluída para 400 $\mu\text{L}$  de solução do polissacarídeo diluído em tampão acetato de sódio, 100mM, pH 5. A mistura reacional foi incubada por 30 min, a 50°C e o total de açúcar redutor liberado durante o ensaio enzimático foi quantificado pelo reagente ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959), tendo a glicose como padrão.

A atividade de endoglicanase foi determinada usando CMC na concentração final 1% (m/v). As reações enzimáticas foram iniciadas pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução enzimática apropriadamente diluída para 400 $\mu\text{L}$  de solução do polissacarídeo diluído em tampão acetato de sódio, 100mM, pH 5. A mistura reacional foi incubada por 30 min, a 50°C e o total de açúcar redutor liberado

durante o ensaio enzimático foi quantificado pelo reagente DNS, tendo a glicose como padrão.

A atividade de mananase foi determinada usando *locust bean gum* na concentração final 0,4% (m/v). As reações enzimáticas foram iniciadas pela adição de 100  $\mu$ L de solução enzimática apropriadamente diluída para 400 $\mu$ L de solução do polissacarídeo diluído em tampão acetato de sódio, 100mM, pH 5. A mistura reacional foi incubada por 30 min, a 50°C e o total de açúcar redutor liberado durante o ensaio enzimático foi quantificado pelo reagente DNS, tendo a glicose como padrão.

A atividade de poligalacturonase foi determinada usando ácido poligalacturônico na concentração final 0,25% (m/v). As reações enzimáticas foram iniciadas pela adição de 100  $\mu$ L de solução enzimática apropriadamente diluída para 400 $\mu$ L de solução de ácido poligalacturônico diluído em tampão acetato de sódio, 100mM, pH 5. A mistura reacional foi incubada por 30 min, a 50°C e o total de açúcar redutor liberado durante o ensaio enzimático foi quantificado pelo reagente DNS, tendo a glicose como padrão.

$\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -galactosidase e  $\alpha$ -arabinofuranosidase foram medidas usando pNP- $\beta$ -Glc, pNP- $\beta$ -Xil, pNP- $\alpha$ -Gal e pNP- $\alpha$ -Ara como substratos, respectivamente. A mistura reacional conteve 100  $\mu$ L de solução enzimática apropriadamente diluída, 125  $\mu$ L de solução do substrato sintético (concentração final 1 mM) e 275  $\mu$ L de tampão acetato de sódio, 100mM, pH 5. A mistura reacional foi incubada por 30 min a 50°C e paralisada pela adição de 0,5 mL de solução carbonato de sódio 0,5M. Absorbância foi medida a 410 nm e o conteúdo de p-nitrofenol liberado foi estimado por uma curva padrão. Para todas as atividades, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1  $\mu$ mol do produto correspondente (equivalentes de glicose e p-nitrofenol) por minuto na condição utilizada no ensaio.

#### **4.4. Zimogramas**

SDS-PAGE foi realizado usando 10% (m/v) de gel poliacrilamida e gel emulhador na concentração de 5% (m/v) de acordo com (Laemmli, 1970), com

algumas modificações. Os géis foram submetidos a uma corrente de 60 mA, com voltagem constante de 100V.

As amostras protéicas foram liofilizadas e ressuspendidas no tampão de amostra, e posteriormente aplicadas no gel. Para análise de atividade de xilanase as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE contendo 0,1% de xilana *birchwood* (XB-SDS-PAGE). Para análise de atividade de endoglicanase as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE contendo 0,1% de CMC (CMC-SDS-PAGE). O gel foi submetido a uma corrente de 60 mA, com voltagem constante de 100V durante 4 horas. Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes por 30 minutos em isopropanol 20% (v/v) para remover o SDS e permitir o reenovelamento das proteínas no gel. Após, o gel foi lavado em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5 para remover o isopropanol e imediatamente foi colocado em 50mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, por 15 minutos a 40°C para o desenvolvimento das atividades enzimáticas. Por fim, o gel foi submergido em solução de vermelho congo 0,1% (m/v) por 15 minutos e descorado com solução NaCl 1M até que as regiões em vermelho claro sejam visíveis.

Para análise das atividades  $\beta$ -glicosidase em zimogramas as amostras foram liofilizadas e ressuspendidas em tampão de amostra e posteriormente aplicadas no gel. O gel foi submetido a uma corrente de 60 mA, com voltagem constante de 100V durante 4 horas. Após a corrida o gel foi lavado duas vezes por 30 minutos em isopropanol 20% (v/v) para remover o SDS e permitir o reenovelamento das proteínas no gel. Em seguida, o gel foi lavado em tampão acetato, 100 mM, pH 5 para remover o isopropanol. O gel foi então coberto por uma solução de 0,5 mM 4-metillumbelliferil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (MUG, Sigma–Aldrich) em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, e incubado 30 minutos a 40°C. A presença do produto fluorescente oriundo da reação catalisada por  $\beta$ -glicosidase foi visualizada sob luz UV 365 nm. Este zimograma para  $\beta$ -glicosidase foi denominado MUG-SDS-PAGE.

A quantificação das proteínas contidas nos extratos foi realizada pelo método de Bradford, tendo BSA como padrão (Bradford, 1976).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Resultados recentes indicaram que *Chrysosporthe cubensis* tem apresentado potencial para produção de celulases e hemicelulases (Falkoski *et al.*, 2013). A fim de aprimorar o conhecimento da produção destas enzimas neste fungo, *C. cubensis* foi crescido em meio submerso, contendo como única fonte de carbono substratos complexos como farelo de trigo, xilana *Birchwood*, CMC, pectina de *citrus peel* e *Locust bean gum*. *C. cubensis* também foi cultivado utilizando fontes de carbono mais simples como monossacarídeos e dissacarídeos, tais como glicose, manose, xilose, galactose, arabinose, celobiose e lactose. As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam a produção enzimática em cada uma das diversas fontes de carbono testadas. A tabela 4 apresenta a concentração de proteínas secretadas presentes nos extratos.

**Tabela 1** – Atividades enzimáticas (U/mL) de Endoglicanase – EG, Mananase – MN, Xilanase – Xil, poligalacturonase – PG,  $\beta$ -Glicosidase –  $\beta$ -glic,  $\alpha$ -Galactosidase –  $\alpha$ -gal,  $\alpha$ -arabinofuranosidase –  $\alpha$ -ara e  $\beta$ -xilosidase –  $\beta$ -xilo, produzidas pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* crescido em meio líquido contendo como única fonte de carbono 1%(m/v) de Farelo de trigo – FT, Carboximetilcelulose – CMC, Xilana *Birchwood* – XB, pectina de *Citrus peel* – CP, *Locust bean gum* – LBG. O fungo foi cultivado por 7 dias e as atividades foram determinadas no 2<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia de crescimento.

Fonte/Dia	Atividade U/mL							
	EG	MN	Xil	PG	$\beta$ -glic	$\alpha$ -Gal	$\alpha$ -ara	$\beta$ -xilo
<b>FT</b>								
2	1,47	0,10	13,77	0,27	0,10	ND	0,012	0,005
4	3,59	0,16	13,59	0,13	0,33	ND	0,038	0,014
7	3,36	0,15	14,19	0,04	0,36	ND	0,046	0,017
<b>CMC</b>								
2	0,34	0,04	1,20	0,07	0,03	ND	ND	ND
4	2,75	0,12	10,69	0,07	0,34	0,005	0,005	0,003
7	2,61	0,12	10,17	0,05	0,47	0,011	0,005	0,006
<b>XB</b>								
2	0,18	0,11	2,79	0,35	0,02	ND	ND	ND
4	0,30	0,11	5,63	0,39	0,04	ND	ND	ND
7	0,30	0,06	9,93	0,13	0,14	ND	ND	ND
<b>CP</b>								
2	0,15	0,13	0,34	0,81	0,10	0,009	ND	ND
4	0,05	0,09	0,32	0,59	0,14	0,008	ND	ND
7	0,05	0,13	0,56	0,30	0,31	0,059	ND	0,006
<b>LBG</b>								
2	0,04	0,04	0,42	0,14	0,05	0,015	ND	ND
4	0,05	0,05	0,31	0,05	0,02	0,012	ND	ND
7	0,04	0,07	0,30	0,04	0,02	0,014	ND	ND

**Tabela 2** - Atividades enzimáticas (U/mL) de Endoglicanase – EG, Mananase – MN, Xilanase – Xil, poligalacturonase – PG,  $\beta$ -Glicosidase –  $\beta$ -glic,  $\alpha$ -Galactosidase –  $\alpha$ -gal,  $\alpha$ -arabinofuranosidase –  $\alpha$ -ara e  $\beta$ -xilosidase –  $\beta$ -xilo, produzidas pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* crescido em meio líquido contendo como única fonte de carbono 1%(m/v) de glicose, celobiose, manose, lactose, galactose e arabinose. O fungo foi cultivado por 7 dias e as atividades foram determinadas no 2º, 4º e 7º dia de crescimento.

Fonte/Dia	Atividade U/MI							
	EG	MN	Xil	PG	$\beta$ -glic	$\alpha$ -Gal	$\alpha$ -ara	$\beta$ -xilo
<b>Glicose</b>								
2	0,26	0,01	0,23	0,51	0,002	ND	ND	ND
4	0,02	0,06	0,18	0,10	0,07	0,01	ND	ND
7	0,02	0,02	0,10	0,19	0,01	ND	ND	ND
<b>Celobiose</b>								
2	0,18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	0,07	ND	ND	0,56	0,01	ND	ND	ND
7	0,02	ND	0,22	0,10	0,002	ND	ND	ND
<b>Manose</b>								
2	0,30	0,18	0,31	0,39	ND	ND	ND	ND
4	0,12	0,14	0,19	0,29	ND	ND	ND	ND
7	0,02	0,02	0,14	0,14	ND	ND	ND	ND
<b>Xilose</b>								
2	0,26	0,41	0,88	0,40	ND	ND	ND	ND
4	0,37	0,29	1,08	0,48	ND	ND	ND	ND
7	0,36	0,33	1,65	0,38	0,10	ND	ND	ND
<b>Lactose</b>								
2	0,25	0,20	ND	0,23	0,01	ND	ND	ND
4	0,24	0,17	ND	0,21	0,003	ND	ND	ND
7	0,30	0,22	ND	0,24	0,02	ND	ND	ND
<b>Galactose</b>								
2	0,36	0,15	0,59	0,41	ND	ND	ND	ND
4	0,20	0,09	0,44	0,39	ND	ND	ND	ND
7	0,22	0,18	0,58	0,30	ND	ND	ND	ND
<b>Arabinose</b>								
2	0,20	0,16	0,34	0,29	ND	ND	ND	ND
4	0,18	0,16	0,66	0,38	ND	ND	ND	ND
7	0,22	0,12	2,00	0,36	0,02	ND	ND	ND

**Tabela 3** - Máximas atividades enzimáticas (U/mL) de Endoglicanase – EG, Xilanase – Xil,  $\beta$ -Glicosidase –  $\beta$ -glic, poligalacturonase – PG, Mananase – MN,  $\alpha$ -Galactosidase –  $\alpha$ -gal,  $\alpha$ -arabinofuranosidase –  $\alpha$ -ara e  $\beta$ -xilosidase –  $\beta$ -xilo, produzidas pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* crescido em meio líquido durante 7 dias, contendo como única fonte de carbono 1%(m/v) de Farelo de trigo – FT, Carboximetilcelulose – CMC, Xilana *Birchwood* – XB, pectina de *citrus peel* – CP, *Locust bean gum* – LBG, glicose, celobiose, manose, xilose, lactose, galactose e arabinose.

<b>Fonte de Carbono</b>	<b>EG</b>	<b>Xil</b>	<b><math>\beta</math>-glic</b>	<b>PG</b>	<b>MN</b>	<b><math>\alpha</math>-Gal</b>	<b><math>\alpha</math>-ara</b>	<b><math>\beta</math>-xilo</b>
<b>Farelo Trigo</b>	<sup>4</sup> 3,59	<sup>7</sup> 14,19	<sup>7</sup> 0,36	<sup>2</sup> 0,27	<sup>2</sup> 0,16	ND	<sup>7</sup> 0,046	<sup>7</sup> 0,017
<b>Carboximetilcelulose</b>	<sup>4</sup> 2,75	<sup>4</sup> 10,69	<sup>7</sup> 0,47	<sup>4</sup> 0,07	<sup>7</sup> 0,12	<sup>7</sup> 0,011	<sup>4</sup> 0,005	<sup>7</sup> 0,006
<b>Xilana birchwood</b>	<sup>4</sup> 0,30	<sup>7</sup> 9,93	<sup>7</sup> 0,14	<sup>4</sup> 0,39	<sup>2</sup> 0,11	ND	ND	ND
<b>Citrus peel</b>	<sup>2</sup> 0,15	<sup>7</sup> 0,56	<sup>7</sup> 0,31	<sup>2</sup> 0,81	<sup>2</sup> 0,13	<sup>7</sup> 0,06	ND	<sup>7</sup> 0,007
<b>Locust bean gum</b>	<sup>4</sup> 0,05	<sup>2</sup> 0,42	<sup>2</sup> 0,05	<sup>2</sup> 0,14	<sup>7</sup> 0,07	ND	ND	ND
<b>Glicose</b>	<sup>2</sup> 0,26	<sup>2</sup> 0,23	<sup>4</sup> 0,07	<sup>2</sup> 0,51	<sup>4</sup> 0,06	<sup>4</sup> 0,012	ND	ND
<b>Celobiose</b>	<sup>2</sup> 0,18	<sup>7</sup> 0,22	<sup>7</sup> 0,002	<sup>4</sup> 0,56	ND	ND	ND	ND
<b>Manose</b>	<sup>2</sup> 0,30	<sup>2</sup> 0,31	ND	<sup>2</sup> 0,39	<sup>2</sup> 0,18	ND	ND	ND
<b>Xilose</b>	<sup>4</sup> 0,37	<sup>7</sup> 1,65	<sup>7</sup> 0,10	<sup>4</sup> 0,48	<sup>2</sup> 0,41	ND	ND	ND
<b>Lactose</b>	<sup>7</sup> 0,30	ND	<sup>7</sup> 0,02	<sup>7</sup> 0,24	<sup>7</sup> 0,22	ND	ND	ND
<b>Galactose</b>	<sup>2</sup> 0,36	<sup>2</sup> 0,59	ND	<sup>2</sup> 0,41	<sup>7</sup> 0,18	ND	ND	ND
<b>Arabinose</b>	<sup>7</sup> 0,22	<sup>7</sup> 2,00	<sup>7</sup> 0,025	<sup>4</sup> 0,37	<sup>4</sup> 0,16	ND	ND	ND

\*Os números sobescritos indicam o dia de crescimento que forneceu maior atividade enzimática.

**Tabela 4** – Concentração de proteínas nos extratos produzidos por *Chrysosporthe cubensis* nas diversas fontes de carbono.

<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Proteínas (<math>\mu</math>g/mL)</b>		
	<b>Dia</b>		
	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>7</b>
<b>Farelo de Trigo</b>	112,7	159,0	164,8
<b>Carboximetilcelulose</b>	15,2	48,6	50,5
<b>Locust Bean Gum</b>	41,0	50,6	54,3
<b>Citrus Peel</b>	17,1	36,3	61,8
<b>Xilana Birchwood</b>	57,5	76,9	71,9
<b>Glicose</b>	17,2	86,0	41,5
<b>Lactose</b>	23,4	36,5	36,5
<b>Celobiose</b>	16,1	66,3	40,9
<b>Galactose</b>	34,6	41,9	50,3
<b>Arabinose</b>	37,2	69,4	55,3
<b>Xilose</b>	24,1	32,3	62,8
<b>Manose</b>	18,5	95,2	82,4

### **5.1. Indução da produção de celulases e hemicelulases por fontes de carbono complexas em *C. cubensis***

Observando as Tabelas 1, 2 e 3 pode-se perceber que farelo de trigo, CMC e xilana foram fontes complexas que se destacaram quanto à indução da produção de celulases e hemicelulases. Os maiores atividades de endoglicanase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase foram encontradas quando o fungo cresceu em algum destes substratos.

Farelo de trigo possui em sua composição altos níveis de proteínas (13–19%) e hemicelulose (3–6%), aliados a um baixo teor de lignina (3–6%). Essas características fazem do farelo de trigo um bom indutor de celulases e hemicelulases (Falkoski *et al.*, 2013; Sukumaran *et al.*, 2009; Singhanian *et al.*, 2007). Em *C. cubensis* farelo de trigo induziu a produção dos maiores níveis de atividades de endoglicanase e xilanase, além apresentar bons níveis de atividade de  $\beta$ -glicosidase quando comparado às demais fontes de carbono avaliadas neste estudo. Extratos produzidos por *C. cubensis* cultivados em farelo de trigo apresentaram atividades de endoglucanase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase iguais a 3,6; 14,2 e 0,36 U/mL, respectivamente. Este substrato induziu também, em menores quantidades, outras hemicelulases e apenas a atividade de  $\alpha$ -galactosidase não foi detectada.

Para compreender como *C. cubensis* é ativado ou desativado por moléculas oriundas da degradação da biomassa lignocelulósica quanto à produção e secreção de celulases e hemicelulases, este fitopatógeno foi cultivado em substratos que mimetizam as porções encontradas nas paredes celulares das plantas. Carboximetilcelulose (CMC), o substrato utilizado para simular a porção celulósica da parede celular, induziu a produção de todas as enzimas investigadas na triagem (Tabela 3). Quando crescido em CMC *C. cubensis* produziu extrato contendo 2,75 U/mL de atividade de endoglicanase, 10,7 U/mL de atividade de xilanase, além de produzir as maiores atividades de  $\beta$ -glicosidase dentre todos os extratos avaliados (0,47 U/mL).

Extratos produzidos por *C. cubensis*, cultivado em xilana *birchwood* apresentaram alta atividade de xilanase, ao passo que a atividade de endoglicanase nestes extratos foram pouco expressivas. Extratos produzidos por *C. cubensis* cultivado em xilana *birchwood* apresentaram atividades de xilanase e endoglicanase

nos valores de 10 U/mL e 0,3 U/mL, respectivamente (Tabela 3). Analisando as atividades encontradas nos extratos produzidos por *C. cubensis* cultivado em CMC e xilana birchwood é possível inferir que os produtos da hidrólise da celulose, como celoligossacarídeos, são moléculas importantes na indução tanto de celulases quanto de xilanases. Em contrapartida, os produtos da degradação da xilana são capazes de desencadear de maneira eficaz somente a produção de xilanases. Este resultado é de grande valia, pois compreendendo a regulação da produção e secreção destas enzimas por diferentes fontes de carbono, é possível moldar o fungo para a produção direcionada de extratos ricos em celulases e/ou hemicelulases através do meio de cultivo. Por exemplo, na indústria de celulose e papel, extratos ricos em hemicelulases e pobres em celulases, são importantes para melhorar as características do papel, pois as hemicelulases atuam na hidrólise da porção hemicelulósica presentes na polpa, auxiliando assim, na remoção da lignina que prejudica a qualidade do papel. Já as celulases são vilãs neste processo, pois atacam as fibras celulósicas, prejudicando a qualidade do produto. Sendo assim, substratos ricos em xilanas seriam interessantes para a produção de enzimas por *C. cubensis* quando o objetivo é a aplicação em testes de branqueamento da polpa *Kraft*, pois resultariam em extratos ricos em xilanases e pobres em celulases (Falkoski *et al.*, 2013). Por outro lado, quando se deseja sacarificar a biomassa para a produção de etanol, um coquetel completo contendo celulases e hemicelulases é requerido para que haja a despolimerização total da estrutura da biomassa em açúcares fermentáveis. Neste caso, os resultados indicam que, substratos ricos em celulose, como CMC e farelo de trigo, seriam mais interessantes para induzir em *C. cubensis* uma produção tanto de celulases quanto de hemicelulases.

Outros polissacarídeos testados quanto à capacidade de induzir a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em *C. cubensis* foram *Locust bean gum* e pectina de *citrus peel*. Estes polissacarídeos estimularam pouco a produção de celulases e hemicelulases em *C. cubensis* quando comparados aos outros polissacarídeos avaliados. *Locust bean gum*, uma galactomanana que consiste de uma cadeia principal de resíduos de manose ligados por ligações  $\beta$ -1,4 e ramificações, onde resíduos de galactose estão ligados à cadeia principal através de ligações  $\alpha$  - 1,6 (fonte: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyloc.html>). Este substrato não foi eficaz para estimular a produção de celulases e hemicelulases em *C. cubensis*. Os

produtos da hidrólise completa da galactomanana, manose e galactose, são moléculas que apresentaram baixa capacidade de indução da produção de celulases e hemicelulases em *C. cubensis*, como observado na tabela 3. Provavelmente por este motivo, *Locust bean gum* seja um substrato tão pobre quanto sua capacidade de desencadear processos de produção de celulases e hemicelulases.

Já quando crescido em pectina de *citrus peel*, um substrato que possui em sua composição 74% de ácido glicurônico, *C. cubensis* produziu atividade de  $\beta$ -glicosidase igual a 0,31 U/mL, além de produzir as maiores atividades de poligalacturonase dentre todos os substratos testados, conforme apresentado na Tabela 3. A pectina é encontrada principalmente na lamela média e parede celular vegetal primária, sendo, portanto, uma das primeiras barreiras encontradas pelo fungo para que possa parasitar a planta. As poligalacturonases auxiliam na degradação da pectina, o que provavelmente auxilia no processo de invasão da planta pelo fitopatógeno. A significativa produção de  $\beta$ -glicosidase também é algo que chama a atenção quando *C. cubensis* é cultivado em pectina. As  $\beta$ -glicosidases são as enzimas responsáveis por finalizar o processo de despolimerização da celulose em glicose, e ao que parece, *C. cubensis* possui um sistema de indução, onde produtos da hidrólise péctica são capazes de desencadear a produção desta enzima, que muito em breve seria requerida pelo fungo, para finalizar a hidrólise da celulose, encontrada na parede celular da planta.

Estudos têm apontado que as  $\beta$ -glicosidases podem desempenhar a função de transglicosilação. Em *Trichoderma reesei*, há fortes indícios que a  $\beta$ -glicosidase catalisa a transformação da celobiose em sofrorose, um potente indutor da produção de celulases (Suto *et al.* 2001). Em *Penicillium purpurogenum*, uma  $\beta$ -glicosidase intracelular foi capaz de converter a celobiose em gentiobiose, um forte indutor para produção de celulases neste organismo (Suto *et al.* 2001). Não se pode afirmar, mas estudos posteriores devem ser realizados a fim de observar se as  $\beta$ -glicosidases produzidas por *C. cubensis* seriam hábeis a realizar reações de transglicosilação para produção de moléculas indutoras. Estudos posteriores devem ser realizados para investigar se as  $\beta$ -glicosidases produzidas por *C. cubensis* são hábeis a catalisar reações de transglicosilação.

## **5.2. Indução da produção de celulasas e hemicelulasas por fontes de carbono simples em *C. cubensis***

É sabido que apesar de fontes complexas, como celulose e farelo de trigo, estimularem a alta produção de enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa, tais polímeros, por si só, não são capazes de induzir a produção destas enzimas. Celulose e hemicelulose são polímeros de alto peso molecular, e acredita-se que os reais indutores do processo de produção de enzimas são os produtos da hidrólise destes polissacarídeos, liberados através da ação de celulasas e hemicelulasas nos produzidas de maneira basal pelos fungos (Mandels *et al.*, 1960; Suto *et al.*, 2001). *C. cubensis*, foi cultivado em monossacarídeos e dissacarídeos, a fim de investigar como estes açúcares poderiam atuar na indução ou repressão da síntese de enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa lignocelulósica.

De uma maneira geral, os açúcares simples induziram menos a produção de celulasas e hemicelulasas em *C. cubensis*, quando comparados com as fontes complexas poliméricas (Tabela 3). Este resultado está de acordo com alguns estudos reportados na literatura (Mandels *et al.*, 1960; Suto *et al.*, 2001). Mandels *et al.* (1960), demonstraram que a produção de celulasas pelo fungo *Trichoderma viride* e pelo basideomiceto QM806, quando crescidos a 0,5% (m/v) de monossacarídeos e dissacarídeos, em cultura submersa, foi baixa ou até mesmo inexistente (Mandels *et al.*, 1960; Suto *et al.*, 2001). Apesar da celobiose ser uma molécula com grande potencial para indução da produção de celulasas, esta capacidade está estreitamente ligada a sua concentração no meio. Estudos têm apontado que a concentração do açúcar é extremamente importante na indução de celulasas e hemicelulasas (Mandels *et al.*, 1960, Brienzo *et al.*, 2012). Mandels *et al.* (1960) demonstraram que em menores concentrações, a celobiose foi capaz de induzir em *T. viride*, níveis significantes de celulase, similares aos alcançados quando o fungo cresceu em celulose (Mandels *et al.*, 1960). Estudos também apontam que a xilose, em baixas concentrações, é capaz de induzir a produção de xilanases, porém, em altas concentrações atua como repressor catabólico, inibindo a produção de tais enzimas (Brienzo *et al.*, 2012).

Muitos fungos lançam mão de um sistema de repressão catabólica por carbono. Este sistema é uma estratégia que o organismo adota, para que, quando

houver alta disponibilidade de açúcares facilmente assimiláveis no meio, eles não necessitem produzir enzimas envolvidas na degradação da biomassa desnecessariamente. A síntese protéica é um processo oneroso para a célula, e produzi-las sem que haja real necessidade seria um desperdício energético para o organismo (Stricker *et al.*, 2008, Suto *et al.*, 2001).

No presente trabalho, todas as fontes de carbono avaliadas foram adicionadas na concentração 1% (m/v). Como observado na Tabela 3, as atividades de quase todas as enzimas avaliadas nos extratos produzidos por *C. cubensis*, cultivado em fontes de carbono simples, foram mais baixas do que as atividades encontradas nos extratos produzidos quando o fungo foi cultivado em fontes de carbono complexas. de Vries *et. al.* (2001) demonstrou que diferentes monossacarídeos foram capazes de desencadear o processo de repressão catabólica em *Aspergillus niger*. Provavelmente, *C. Cubensis*, possui um sistema eficaz de repressão catabólica por carbono, que atua na produção de celulasas e hemicelulasas, que pode ser desencadeado por diferentes monossacarídeos e dissacarídeos.

Dentre as fontes de carbono simples, dois monossacarídeos, potenciais indutores de xilanasas se destacaram (Mach-Aigner *et al.*, 2011). Extratos produzidos por *C. cubensis* cultivado em meio contendo arabinose e xilose como única fonte de carbono apresentaram atividade de xilanase de 2,00 U/mL e 1,65 U/mL, respectivamente. Estas atividades foram as maiores quando comparadas as atividades encontradas quando o fungo foi cultivado nas demais fontes de carbono simples.

Observando as Figuras 5 e 6, pode-se perceber que à medida que há o consumo de xilose, há também o aumento da atividade de xilanase. Um padrão similar, para a produção de atividade xilanase foi obtido quando o fungo cresceu em arabinose.

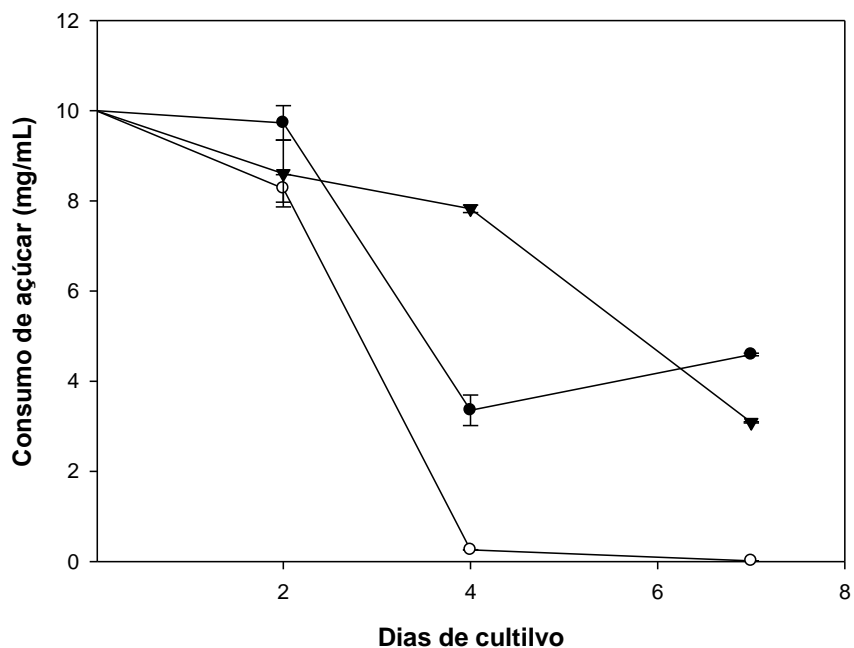


Figura 5 – Consumo de açúcares por *Chrysosporthe cubensis* quando cultivado em meio submerso contendo (●)Arabinose, (○) Glicose (▼) Xilose.

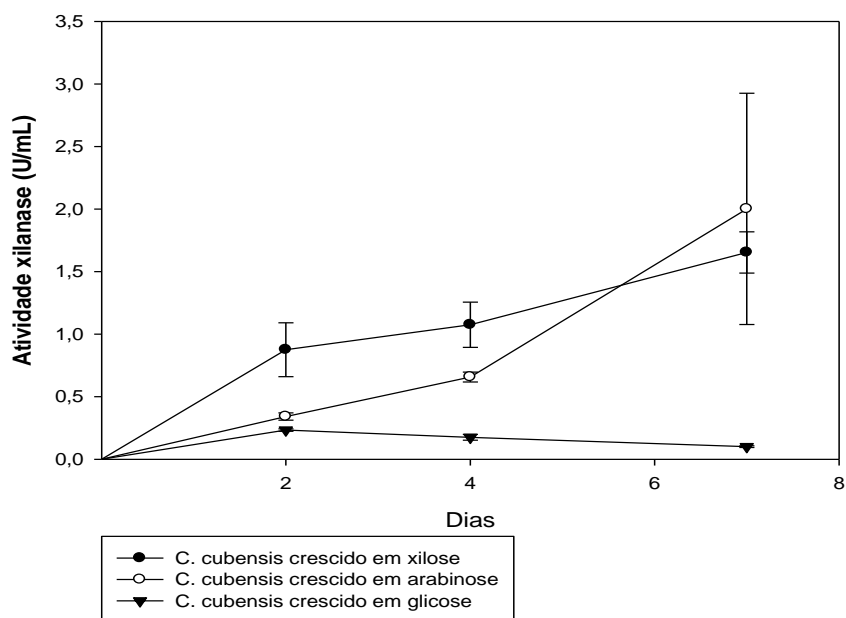


Figura 6 – Atividade de xilanase (U/mL) dos extratos produzidos por *Chrysosporthe cubensis*, quando crescido em meio submerso contendo (●) xilose, (○) arabinose e (▼) glicose.

Estes resultados estão de acordo com estudos reportados na literatura, que demonstraram que, altas concentrações de açúcares não foram eficazes na indução da produção de celulasas e hemicelulasas em fungos (Mandels *et al.*, 1960, de Vries *et al.* 2001). Estudos também têm demonstrado que a xilose, além do efeito indutivo para produção de xilanases, pode, em altas concentrações, ativar o sistema de repressão catabólica por carbono. Este sistema de repressão pode também ser acionado por outros monossacarídeos, bem com a arabinose (de Vries *et al.* 2001). Portanto, o aumento da atividade de xilanase nos extratos produzidos por *C. cubensis* crescido em xilose ou arabinose pode, em parte, ser devido aos efeitos indutivos do açúcar, e em parte, devido à diminuição da repressão catabólica por carbono. Provavelmente, após o consumo de parte dos açúcares, arabinose e xilose se encontraram em concentrações onde os efeitos indutivos suplantaram os efeitos repressivos, permitindo assim a produção de xilanases.

Como observado na Tabela 3, extratos produzidos por *C. cubensis* cultivados em xilose apresentaram maior atividade de  $\beta$ -glicosidase do que os extratos oriundos dos cultivos em outras fontes de carbono simples. Portanto, é possível que a xilose possa estar envolvida na indução de  $\beta$ -glicosidases em *C. cubensis*.

### **5.3. Análise qualitativa dos indutores (Zimogramas)**

Nos tópicos anteriores, diferentes fontes de carbono foram avaliadas de maneira quantitativa quanto à capacidade de induzir a produção das enzimas envolvidas no processo de sacarificação da parede celular vegetal. Agora, através de zimogramas, uma análise qualitativa é realizada com o objetivo de enxergar quantas, e quais enzimas, cada fonte de carbono é capaz de induzir em *C. cubensis*.

#### **5.3.1. $\beta$ - Glicosidases**

Na Figura 7 podem ser observadas as atividades de  $\beta$ -glicosidase utilizando zimograma contendo o substrato fluorescente metilumbelliferil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo, MUG-SDS-PAGE. Foram aplicadas em cada canaleta 20 $\mu$ g de proteínas para os extratos produzidos por *C. cubensis* induzidos pelas fontes de carbono simples, e 10 $\mu$ g para os extratos produzidos quando o fungo cresceu em presença de fontes de carbono complexas. Nas canaletas onde foram aplicados extratos enzimáticos

produzidos pelo fungo crescido em fontes de carbono complexas, pôde ser observada uma banda de atividade de massa molecular de 55,6 kDa (Figura 7). A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi detectada também em possíveis complexos de altos pesos moleculares, onde as  $\beta$ -glicosidases estariam interagindo com outras proteínas. Estes complexos são incapazes de adentrar ao gel de poliacrilamida e ficam retidos no início do gel (Peterson *et al.*, 2009) (Figura 7). Dentre as fontes simples, de acordo com a Figura 7, lactose foi também capaz de estimular em *C. cubensis* a produção do mesmo grupo de  $\beta$ -glicosidases que as fontes complexas.

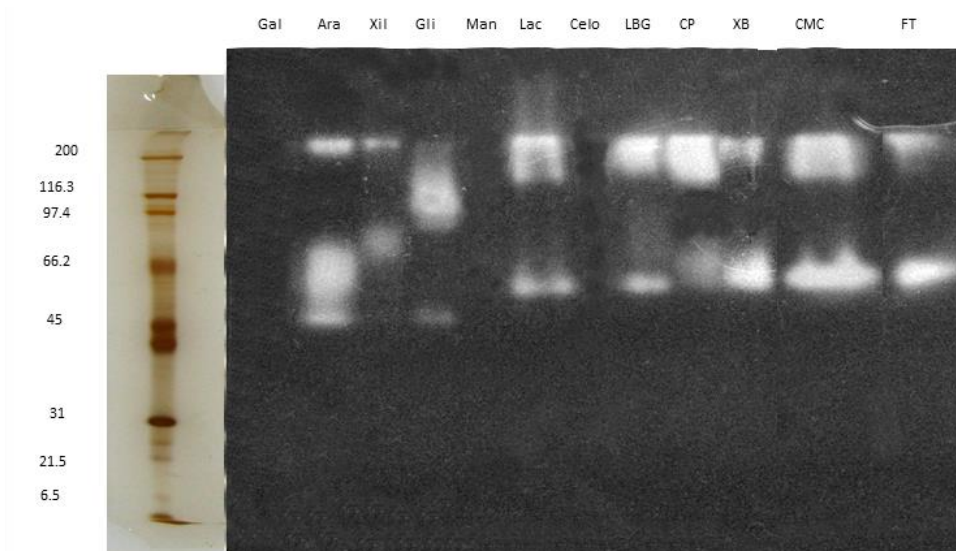
Glicose, xilose e arabinose estimularam a produção de um padrão diferenciado de atividades  $\beta$ -glicosidases em *C. cubensis*. Na presença de glicose, houve a produção de duas  $\beta$ -glicosidases, uma de 106,8 kDa e outra de 48 kDa.

Quando cultivado em xilose como única fonte de carbono, *C. cubensis* produziu uma  $\beta$ -glicosidase de 74 kDa que não foi observada nos extratos oriundos dos cultivos nas demais fontes de carbono avaliadas. Talvez, esta  $\beta$ -glicosidase esteja relacionada com a alta atividade de  $\beta$ -glicosidase encontrada nos extratos produzidos por *C. cubensis* em presença de xilose. Dentre as fontes de carbono simples o extrato produzido por *C. cubensis* cultivado em xilose apresentou a maior atividade de  $\beta$ -glicosidase (Tabela 3).

Quando *C. cubensis* foi cultivado em arabinose houve a produção de uma de uma  $\beta$ -glicosidase de 48 kDa, que também foi observada quando o fungo foi cultivado em glicose. Além disso, arabinose induziu *C. cubensis* a produzir uma  $\beta$ -glicosidase de 55,6 kDa, também encontrada nos extratos produzidos pelo fungo cultivado em fontes complexas e em lactose. Extratos produzidos por *C. cubensis* crescido em galactose e manose, não apresentaram atividade de  $\beta$ -glicosidase (Figura 7).

Muitos fungos são capazes de produzir  $\beta$ -glicosidases, que podem ser muito distintas quanto a suas massas moleculares e quanto suas estruturas quaternárias podendo ser encontradas como estruturas monoméricas, dímeros ou até mesmo como estruturas supramoleculares. Zanoelo *et. al* purificaram e estimar a massa molecular de uma  $\beta$ -glicosidase do fungo termófilo *Scytalidium thermophilum* através de gel SDS-PAGE e encontraram uma banda de aproximadamente  $42 \pm 2$

kDa. Quando estimaram a massa molecular aparente da mesma  $\beta$ -glicosidase através de gel filtração encontraram uma massa molecular de  $39 \pm 4$  kDa, o que sugere que este fungo produz uma  $\beta$ -glicosidase monomérica. Pal et. al estimaram a massa molecular de uma  $\beta$ -glicosidase intracelular de *Termitomyces clypeatus*, um basideomiceto bem conhecido pela produção de celulases e hemicelulases. Através de análise por SDS-PAGE Pal et. al (2010) encontraram a massa molecular de 116 kDa, porém quando estimaram a massa através de análise em MALDI-TOF encontraram uma banda de 6688 Da. Estes resultados comprovaram que a  $\beta$ -glicosidase de 6688 Da encontrada em *Termitomyces clypeatus* é capaz de formar agregados entre si, formando uma supraestrutura de 116 kDa composta por homooligômeros de kDa.



**Figura 7** - Análise em MUG-SDS-PAGE de diferentes extratos produzidos por *Chrysosporthe cubensis* quando crescido em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono. Gal (galactose), Ara (arabinose), Xil (xilose), Gli (glicose), Man (manose), Lac (lactose), Celo (celobiose), LBG (locust bean gum), CP (pectina de citrus peel), XB (xilana birchwood), CMC (carboximetilcelulose), FT (farelo de trigo). À esquerda estão os valores estimados dos pesos moleculares (kDa). Foram aplicadas  $20\mu\text{g}$  de proteínas, para os extratos produzidos pelo fungo crescido nas fontes de carbono simples, e  $10\mu\text{g}$  de proteínas para os extratos produzidos na presença de fontes de carbono complexas.

### 5.3.2. Xilanases

Na Figura 8 podem ser observadas as atividades de xilanase em zimograma contendo como substrato xilana *birchwood*, XB-SDS-PAGE. Foram aplicados ao gel 5 µg de proteína para os extratos produzidos em CMC, xilana Birchwood e farelo de trigo e 20 µg de proteínas para os extratos crescidos nas demais fontes de carbono.

Pode-se observar na Figura 8 que *C. cubensis* foi capaz de produzir diversas xilanases. A produção de múltiplas xilanases é um evento comum em microrganismos e pode ser importante na hidrólise da xilana, pois as xilanases podem atuar de maneira diferente no substrato conferindo uma maior eficácia na hidrólise da xilana (Falkoski *et al.*, 2013; Bischoff *et al.*, 2009).

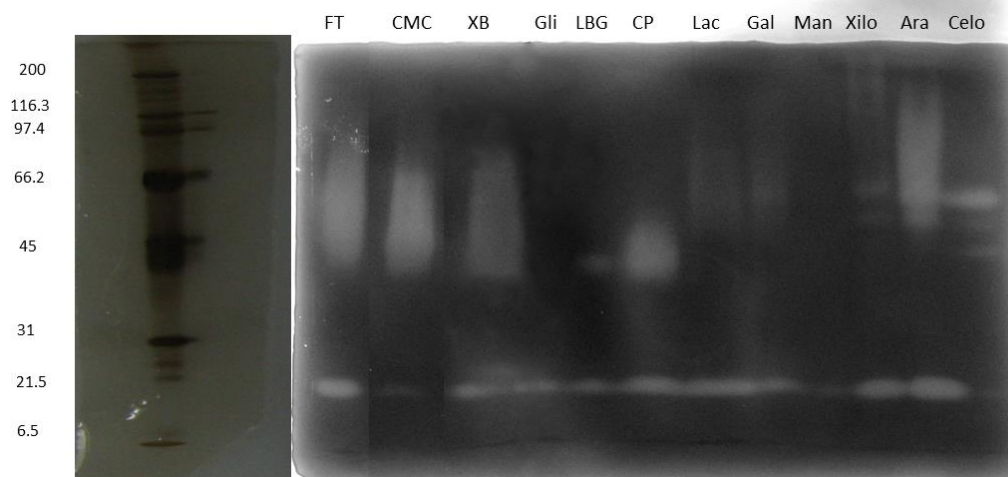
A Figura 8 apresenta uma xilanase de 19 kDa, cuja expressão ocorre de maneira basal, pois é identificada para todos os extratos analisados. Provavelmente, esta pequena xilanase possui um papel importante na indução de outras enzimas envolvidas na degradação da parede celular de plantas, já que enzimas produzidas de maneira basal são responsáveis pelas primeiras hidrólises que ocorrem no substrato polimérico e fornecem os primeiros hidrolisados que atuam, de fato, como indutores na produção de celulasas e hemicelulasas (Henrique-Silva *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2008). Na Figura 8, pode-se observar que farelo de trigo, CMC e xilana *birchwood* induziram uma grande variedade de xilanases. Para estes substratos não foi observada a presença de bandas específicas além da xilanase de 19 kDa, mas sim uma região bem definida, entre 97 e 39 kDa, onde provavelmente muitas xilanases que diferem quanto a padrões de glicosilação e ação proteolítica são encontradas. Falkosky *et al.* (2013) encontraram padrões de bandas de atividades de xilanases bem definidas quando cresceu *C. Cubensis* em farelo de trigo em meio sólido, identificando quatro xilanases (19,2 kDa, 37,3kDa, 47,9kDa, 53,2kDa). As xilanases de 37,3kDa, 47,9kDa e 53,2kDa estão na mesma região onde foi encontrada a faixa de atividade de xilanase no presente trabalho. Isto reforça a idéia de que em meio submerso, o fungo desencadeia processos pós traducionais que modificam as enzimas, fazendo com que, devido a pequenas alterações nas massas moleculares, não seja possível separar tais xilanases por bandas específicas no gel.

*Locust bean gum* e *citrus peel* foram capazes de estimular a produção de uma xilanase de 37,3 kDa em *C. cubensis*, além da xilanase expressa de maneira basal

de 19 kDa. Portanto, é pensado que os produtos da hidrólise da pectina e da manana possam ser capazes de induzir a produção desta xilanase.

Extratos oriundos do cultivo de *C. cubensis* em xilose, celobiose e arabinose apresentaram um padrão de atividade de xilanase com bandas bem definidas. Quando *C. cubensis* cresceu em xilose como única fonte de carbono foi capaz de produzir duas xilanases, sendo uma de 53,2 kDa e outra de 47,9 kDa. Já o extrato produzido pelo fungo crescido em arabinose, apresentou um padrão de bandas semelhante ao encontrado no extrato oriundo do crescimento em xilose (Figura 8). Mach-Aigner *et al.* (2011) demonstraram que o arabitól, uma molécula que pode ser produzida em *T. reesei*, tanto a partir da xilose quanto da arabinose, através da via do metabolismo de pentoses, é o real indutor da expressão dos genes *xyn1* e *xyn2* codificantes de xilanases. Devido às semelhanças entre xilose e arabinose quanto à capacidade de induzir a produção de xilanases em *C. cubensis*, é possível que o real indutor possa ser um intermediário da via das pentoses, assim como ocorre em *T. reesei* (Mach-Aigner *et al.*, 2011). Estudos futuros devem ser realizados, a fim de averiguar se intermediários da via das pentoses possam ser de fato capazes de induzir a produção de xilanases em *C. cubensis*.

Glicose, lactose, galactose e manose, não estimularam a produção de xilanases e apresentaram somente a atividade basal na altura de 19 kDa no gel.

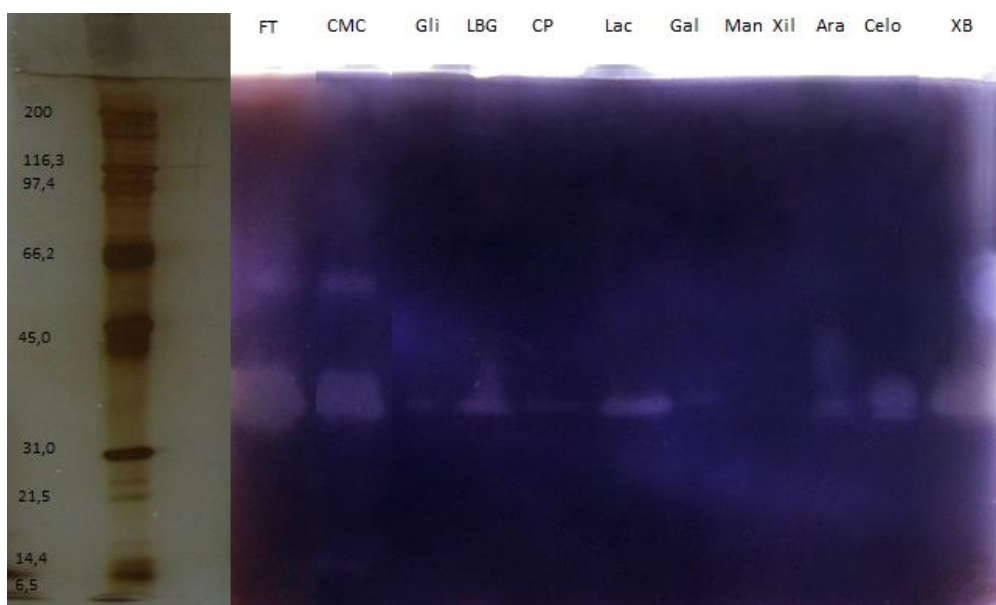


**Figura 8** – Análise em XB-SDS-PAGE de diferentes extratos produzidos por *Chrysosporthe cubensis* quando crescido em diferentes fontes de carbono. FT (farelo de trigo), CMC(carboximetilcelulose), XB (xilana birchwood), Gli (glicose), LBG (locust bean gum), CP (pectina de citrus peel), Lac (lactose), Gal (galactose), Man (manose), Xilo (xilose), Ara (arabinose), Celo (celobiose). À esquerda estão os valores estimados dos pesos moleculares (kDa). Foram aplicadas 5 $\mu$ g de proteínas, para os extratos produzidos pelo fungo crescido em CMC, XB e FT. Para os demais extratos foram aplicados 20 $\mu$ g de proteínas.

### 5.3.3. Endoglicanases

A Figura 9 apresenta o padrão de produção de endoglicanases por *C. cubensis* através de zimograma contendo o substrato carboximetilcelulose, CMC-SDS-PAGE. Para os extratos que apresentaram maior atividade de endoglicanase (farelo e trigo e CMC) foram aplicados 5  $\mu$ g de proteínas em cada canaleta do gel, ao passo que para os demais extratos que apresentaram baixas atividades de endoglicanase foram aplicados 20 $\mu$ g de proteínas. Apenas nos extratos produzidos por *C. cubensis* cultivado em manose ou xilose, não foi possível observar atividade de endoglicanase no gel. Ao que parece estes açúcares não são capazes de induzir a produção de endoglicanases e, além disso, é possível que possam desencadear forte repressão catabólica na produção de endoglicanases. Em todos os demais extratos produzidos por *C. cubensis* houve a presença de uma endoglicanase de 38 kDa. Farelo de trigo, CMC e Xilana *birchwood* estimularam a produção do mesmo grupo de endoglicanases em *C. cubensis* e apresentaram, além da endoglicanase de 38 kDa, uma endoglicanase de 55,6 kDa. Comparando os resultados qualitativos da Figura 9 com os dados quantitativos da Tabela 3, pode-se perceber que quando

*C. cubensis* é crescido em xilana há a produção do mesmo grupo de endoglicanases produzidas quando o fungo é crescido em CMC ou farelo de trigo, porém com uma menor eficiência já que a atividade no extrato oriundo do crescimento em xilana é menor (Tabela 3). É possível que as moléculas oriundas da hidrólise da xilana possam auxiliar na indução de endoglicanases, porém não são capazes, por si só, de desencadear a produção de endoglicanases maneira eficaz. CMC e farelo de trigo também apresentaram bandas de atividade próximas de 38 kDa, provavelmente estas são endoglicanases oriundas do mesmo gene, mas que sofreram mudanças pós-traducionais que acarretaram em pequenas variações na massa molecular da proteína.



**Figura 9** – Análise em CMC-SDS-PAGE de diferentes extratos produzidos por *Chrysosporthe cubensis* quando crescido em diferentes fontes de carbono. FT (farelo de trigo), CMC (carboximetilcelulose), Gli (glicose), LBG (*locust bean gum*), CP (pectina de *citrus peel*), Lac (lactose), Gal (galactose), Man (manose), Xilo (xilose), Ara (arabinose), Celo (celobiose), XB (xilana birchwood). À esquerda estão os valores estimados dos pesos moleculares (kDa). Foram aplicadas 5 $\mu$ g de proteínas, para os extratos produzidos pelo fungo crescido em CMC e FT. Para os demais extratos foram aplicados 20 $\mu$ g de proteínas.

Quando *C. cubensis* cresceu em meio líquido contendo glicose, *locust bean gum*, pectina de *citrus peel*, lactose, galactose, arabinose e celobiose produziu apenas a endoglicanase de 38 kDa. Este resultado leva a pensar que, ou esta endoglicanase possa ter sua produção induzida por uma ampla gama de açúcares, ou então, esta é uma enzima constitutiva, e manose e xilose desencadeiem efeitos

altamente repressivos sob os processos de produção desta enzima impedindo que esta seja visualizada nos extratos provenientes dos cultivos de *C. cubensis* em xilose e manose.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados alcançados neste trabalho apontam que as fontes complexas, como CMC, farelo de trigo e xilana *Birchwood*, possuem elevado potencial indutor para a produção das enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa pelo fungo *Chrysosporthe cubensis*. Já as fontes mais simples como monossacarídeos e dissacarídeos, apesar de não induzirem altos níveis de atividades enzimáticas, mostraram através de análises por zimogramas, que podem sim, ativar a produção tanto de celulasas quanto de hemicelulasas, ainda que em níveis discretos. Os baixos níveis quantitativos, provavelmente são devido a efeitos de repressão catabólica por carbono, causado pelas altas concentrações de açúcares facilmente assimiláveis no meio.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISCHOFF, K. M., WICKLOW, D. T., JORDAN, D. B., DE REZENDE, S. T., SIQING, L., HUGHES, S. R., RICH, J. O. Extracellular Hemicellulolytic Enzymes from the Maize Endophyte *Acremonium zeae*. *Curr Microbiol.* 58:499–503, 2009.
- BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro. Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT (Portugal), 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*; 72:248–54, 1976.
- BRIENZO, M., MONTE, J. R., MILAGRES, A. M. F. Induction of cellulase and hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* by xylan hydrolyzed products. *Microbiol Biotechnol.* 28, 113-119, 2012.
- CAO, Y. Purification and characterization of a novel protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from *Rhizopus* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 835–841, 2007.
- DE ALMEIDA, M. N. Celulasas e hemicelulasas de espécies de *Acremonium* endofíticas. 2009. 128f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

DE VRIES, R., VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology*. 1092-2172, 2001

DELCHEVA, G., DOBREV, G., PISHTIYSKI, I. Performance of *Aspergillus niger* B 03 -xylosidase immobilized on polyamide membrane support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 54, 109–115, 2008.

DOWZER, C. E. A., KELLY, J. M. Analysis of the creA Gene, a Regulator of Carbon Catabolite Repression in *Aspergillus nidulans*. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 5701-5709, 1991.

FALKOSKI, D. L., GUIMARÃES, V. M., DE ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. Original Research Article, 2013.

GOMIDE, J. L., Tecnologia e química da produção de celulose. < [http://www.celsofoelkel.com.br/artigos/outros/Arquivo%2003%20Tecnologia\\_e\\_Quimica\\_da\\_Produ%E7%E3o\\_de\\_Celulose\\_-\\_P.pdf](http://www.celsofoelkel.com.br/artigos/outros/Arquivo%2003%20Tecnologia_e_Quimica_da_Produ%E7%E3o_de_Celulose_-_P.pdf) > endereço eletrônico acessado no dia 24 de julho, 2013.

HENRIQUE-SILVA, F., EL GOGARY, S., CARLE-URIOSTE, J. C., MATHEUCCI JR, E., CRIVELLARO, O., EL DORRY, H. Two regulatory regions controlling basal and cellulose induced expression of the gene encoding celobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are adjacent to its TATA box. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 228, 229-237, 1996.

JIANG, Z., WEI, Y., LI, D., LI, L., CHAI, P. Kusakabe, I. High-level production, purification and characterization of a thermostable b-mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers* 66, 88–96, 2006

JØRGENSEN, H., KRISTENSEN, J. B., FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 1:119–134, 2007.

JUNIOR, O. K. Modificação química do bagaço de cana e celulose usando anidro do EDTA. Uso destes materiais na adsorção de metais pesados em solução aquosa. 2007. 113f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2007.

KLOCK, U. MUÑIS, G. I. B., HERNANDEZ, J. A., DE ANDRADE, A. S. Química da Madeira. Setor de Ciências Agrárias. Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal. Universidade Federal Do Paraná. 2005

KUHAD , R., C., GUPTA, R., SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* Volume 2011, Article ID 280696, 10 pages doi:10.4061/2011/280696

MACH-AIGNER, A. R., GUDYNAITE-SAVITCH, L., MACH, R. L. L-Arabitol Is the Actual Inducer of Xylanase Expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 5988–5994 Vol. 77, No. 17, 2011.

- MANDELS, M., REESE, T. E. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*. 79(6):816, 1960.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytica Chemistry* 31, 426–430, 1959.
- NELSON, D. L., COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. São Paulo. Terceira edição. Sarvier. 2002.
- LARSSON, A. M., ANDERSON, L., XU, B., MUÑOZ, I. G., USÓN, I. JANSON, J., STALBRAND, H., STAHLBERG, J. Three-dimensional Crystal Structure and Enzymic Characterization of  $\beta$ -Mannanase Man5A from Blue Mussel *Mytilus edulis*. *J. Mol. Biol.* 357, 1500–1510, 2006.
- PUCHART, V. Purification and characterization of K-galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1524, 27-37, 2000.
- RUIJTER, G. J. G., VANHANEN, S. A., GIELKENS, M. M. C., VAN DE VONDERVOORT, P. J. I., VISSER, J. Isolation of *Aspergillus niger* creA mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzymes. *Microbiology*, 143,2991-2998, 1997.
- SHALLOM, D., SHOHAN, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*. 6:219–228, 2003.
- SINGHANIA, R. R., SUKUMARAN, R. K., PANDEY, A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142, 60–70, 2007.
- STRICKER, A. R., MACH, R. L. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases- encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol*, 78, 211 – 220, 2008.
- SUKUMARAN, R. K., SINGHANIA, R. R., MATHEW, G. M., PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. *Renewable Energy* 34, 421–424, 2009.
- SUN, X., LIU, Z., ZHENG, K., SONG, X., QU, Y. The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 42,560-567, 2008.
- SUTO, M., TOMITA, F. Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol. 92, No. 4, 305-311, 2001.
- VAN DYK, J., S., PLETSCHE, B., I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30, 1458–1480, 2012.
- ZEILINGER, S., MACH, R. L., KUBICEK, C. P. Two Adjacent Protein Binding Motifs in the *cbh2* (Cellobiohydrolase II-encoding) Promoter of the Fungus *Hypocrea*

*jecorina (Trichoderma reesei)* Cooperate in the Induction by Cellulose. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 273, No. 51, 34463–34471, 1998.

Site 1: <[http://www.cfs.purdue.edu/class/f&n630/pdf\\_full/hemicelluloses\\_NB.pdf](http://www.cfs.purdue.edu/class/f&n630/pdf_full/hemicelluloses_NB.pdf)> acessado no dia 27 de maio de 2013. BORDENAVE, N. Hemicelluloses. FS630. Room 3151. Purdue. 2009.

Site 2: <<http://sweet.ua.pt/mac/ficheiros/Tese/Cap1ConsTeor.pdf>>