



RENORBIO  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

**Aumento da Atividade Celulásica para Hidrólise da Casca de Coco Verde pela Aplicação da Alta Pressão Hidrostática**

Érica Dutra Albuquerque

Vitória-ES  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ÉRICA DUTRA ALBUQUERQUE

**Aumento da Atividade Celulásica para Hidrólise da Casca  
de Coco Verde pela Aplicação da Alta Pressão Hidrostática**

VITÓRIA-ES  
2013

ÉRICA DUTRA ALBUQUERQUE

**Aumento da Atividade Celulásica para Hidrólise da Casca de Coco Verde pela Aplicação da Alta Pressão Hidrostática**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pela doutoranda Érica Dutra Albuquerque com orientação da Profa. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes e a Co-orientação do Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes como parte dos requisitos da obtenção ao título de Doutor em Biotecnologia.

VITÓRIA-ES  
2013

A345a Albuquerque, Érica Dutra, 1980-  
Aumento da atividade celulásica para hidrólise da casca de  
coco verde pela aplicação da alta pressão hidrostática / Érica  
Dutra Albuquerque. – 2013.  
146 f. : il.

Orientadora: Patrícia Machado Bueno Fernandes.  
Coorientador: Antônio Alberto Ribeiro Fernandes.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde. Universidade  
Estadual do Ceará.

1. Hidrólise. 2. Fungos. 3. Álcool. 4. Coco. 5. Atividade  
celulásica. 6. Alta pressão. I. Fernandes, Patricia Machado  
Bueno. II. Fernandes, Antonio Alberto Ribeiro. III. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.  
Universidade Estadual do Ceará. V. Título.

CDU: 61

---

### ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna ÉRICA DUTRA ALBUQUERQUE no primeiro dia do mês de abril do ano de dois mil e treze, às 14 horas, reuniu-se a banca de Defesa de Tese composta pelos Professores Doutores Patricia Machado Bueno Fernandes, (Orientadora), Antonio Alberto Ribeiro Fernandes, da Universidade Federal do Espírito Santo, como Co-orientador, Janice Lisboa De Marco, da Universidade de Brasília, como Titular, Fernando Araripe Gonçalves Torres, Universidade de Brasília, como Titular, Eustáquio Vinícius de Castro, da Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular e Daniel Cláudio de Oliveira Gomes, da Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular. Perante a qual **Érica Dutra Albuquerque**, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal do Espírito Santo, defendeu, para preenchimento do requisito de doutor, sua Tese intitulada “Aumento da Atividade Celulásica para Hidrólise da Casca de Coco Verde pela Aplicação da Alta Pressão Hidrostática.” A defesa da referida tese ocorreu, das 14:00 às 14:50, tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito SATISFATORIO. Eu, Patricia Machado Bueno Fernandes que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Registre-se que esta é a Oitava Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Espírito Santo. Em Vitória, 01 de abril de 2013.



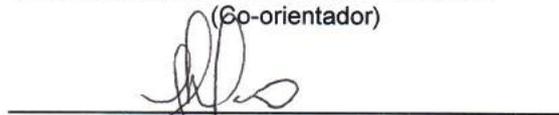
---

Prof.ª. Dr.ª. Patricia Machado Bueno Fernandes  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes  
(Co-orientador)



---

Prof.ª. Dr.ª. Janice Lisboa De Marco  
(Titular)



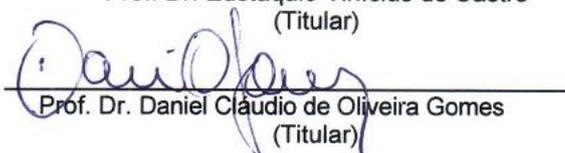
---

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres  
(Titular)



---

Prof. Dr. Eustáquio Vinícius de Castro  
(Titular)



---

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes  
(Titular)

*" Qualquer um que nunca tenha cometido um erro nunca tentou algo novo. "*  
(Albert Einstein)

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu filho Luan, ao meu irmão Bruno Dutra e ao meu noivo Sander Walg por fazerem parte da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, essa força que nos move.

À Profa. Dra. Patricia M. B. Fernandes e ao Prof. Dr. A. Alberto R. Fernandes pela orientação, pelos ensinamentos e pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biotecnologia Aplicado ao Agronegócio (LBAA) e pelas contribuições durante a elaboração deste trabalho. Obrigada por criarem as oportunidades para o meu aprendizado e crescimento.

Ao Prof. Dr. Fernando Araripe e ao Laboratório de Biotecnologia Molecular, da Universidade de Brasília (UNB), por me receberem de braços abertos em seu laboratório e me ensinarem os princípios sobre as atividades celulásicas e identificação molecular. O período que estive na UNB foi muito proveitoso cientificamente.

Ao Prof. Dr. Johan Thevelein do 'Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology (KU Leuven, Belgium)', por me ensinar técnicas aplicadas à produção do etanol celulósico e por me mostrar o mundo científico no exterior.

Ao Prof. Gert Vriend do 'Centre for Molecular Life Sciences (CMBI), (Radboud University Nijmegen, The Netherlands)', 'vriend' em holandês significa amigo, mais do que um amigo este professor me ensinou e me apresentou o mundo da Bioinformática Aplicada, desta maneira consegui aplicá-la ao meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela atenção e ensinamentos, principalmente ao Prof. Dr. Aires Ventura. Aos colegas que não fazem mais parte do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (Adriana, Allyne, Amanda, Camila, David, Fernanda Perón, Filipe, Gláucia, Glória, Jamile, Jéssica, João Gilberto, Júlio, Maurício Mattar, Ricardo, Suelen, Viviane, Carol, David, Diego, Lucas, Rayster, Thaz) e aos que ainda fazem parte (Diana, Eduardo, Fernanda, Fábio, Frederico, Helber, Paolla, Poliana, Lorena, Lorena Carnielli, Mainã, Tássia, Jeferson, Jimmy, Maurício, Marlon, Melina, Oeber, Vitor, Walkiria, Zaca). Em especial aos amigos Jeferson Côrrea, Jimmy, Lucas, Diego, Walkíria e Diana. Obrigada a todos por contribuírem cientificamente para este trabalho e para minha formação profissional e por tornarem o ambiente de trabalho mais descontraído. Ao proprietário da fábrica de envazamento da casca de coco verde, por disponibilizar as visitas técnicas.

À minha família, ao meu filho Luan e ao meu irmão Bruno Dutra e não menos à minha amiga Thaynnara Letícia, que me deram apoio nesta caminhada e que sempre estiveram ao meu lado, compreendendo as dificuldades de um mundo científico. Assim como também ao meu noivo Sander Walg pelas palavras de apoio e por confiar no meu potencial.

Ao apoio financeiro disponibilizado pela FINEP, CNPq, CAPES, FAPES e pela Companhia Vale.

Muito Obrigada a todos que me apoiaram e confiaram durante estes quatro anos de trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	16
<b>RESUMO</b> .....	18
<b>ABSTRACT</b> .....	20
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	22
1.2 ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA.....	26
1.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E RESÍDUOS DA CASCA DE COCO.....	31
1.4 CELULASES E FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS.....	35
1.5 HIDRÓLISE CELULÁSICA OU SACARIFICAÇÃO.....	42
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	45
2.1 OBJETIVO GERAL.....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
3.1 FUNGOS E ENZIMAS PADRÕES.....	47
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	48
3.2.1 <i>Coleta das amostras</i> .....	48
3.2.2 <i>Isolamento dos fungos</i> .....	48
3.3 SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS.....	49
3.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR.....	49
3.4.1 <i>Identificação morfológica</i> .....	49
3.4.1.1 Microcultivo.....	49
3.4.2 <i>Identificação molecular</i> .....	50
3.4.2.1 Crescimento da biomassa fúngica.....	50
3.4.2.2 Extração do DNA fúngico.....	50
3.4.2.3 Reação em cadeia polimerase (PCR).....	51
3.4.2.4 Preparo das amostras e sequenciamento.....	52

3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	52
3.5.1 <i>Fermentação submersa</i> .....	52
3.5.2 <i>Medida de sacarificação celulásica usando alta pressão hidrostática</i> .....	53
3.5.3 <i>Métodos analíticos de atividades celulásicas</i> .....	54
3.5.4 <i>Precipitação das celulasas dos extratos brutos enzimáticos e ensaios celulásicos</i> .....	55
3.6 APLICAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CASCA DE COCO.....	55
3.6.1 <i>Remoção da lignina (pré – tratamento)</i> .....	55
3.6.2 <i>Dosagens de polifenóis</i> .....	56
3.6.3 <i>Desenho experimental para estudo do efeito da alta pressão hidrostática nas fibras da casca de coco e nas celulasas</i> .....	57
3.6.4 <i>Hidrólise celulásica das fibras da casca de coco usando pressão hidrostática e celulasas de fungos isolados</i> .....	58
3.6.5 <i>Sacarificação enzimática utilizando alta pressão hidrostática</i> .....	58
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS FIBRAS DA CASCA DE COCO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	59
3.9 ANÁLISE EM HPLC.....	59
3.10 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	60
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>61</b>
4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS.....	61
4.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR.....	63
4.3 MEDIDA DE SACARIFICAÇÃO CELULÁSICA USANDO ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA.....	68
4.4 ATIVIDADES CELULÁSICAS EM CONDIÇÕES DE ALTA PRESSÃO DAS CELULASES DOS FUNGOS ISOLADOS DA CASCA DE COCO.....	74
4.5 PRECIPITAÇÃO DAS CELULASES DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO ENSAIOS CELULÁSICOS.....	81
4.6 APLICAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA PARA HIDRÓLISE	

CELULÁSICA DA CASCA DE COCO.....	101
4.6.1 <i>Remoção da lignina (pré – tratamento)</i> .....	101
4.6.2 <i>Estudo do efeito da alta pressão hidrostática nas fibras da casca de coco e nas celulasas padrões</i> .....	107
4.6.3 <i>Hidrólise celulásica das fibras da casca de coco deslignificadas utilizando pressão hidrostática e celulasas dos fungos isolados da casca de coco verde</i> .....	112
4.6.4 <i>Sacarificação celulásica utilizando alta pressão hidrostática</i> .....	117
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	127
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	129
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	130
<b>8 APÊNDICE</b> .....	144
8.1 <i>Sequências do rDNA geradas</i> .....	144
8.2 <i>Conquistas</i> .....	145
8.2.1 <i>Projetos iniciados pela tese</i> .....	145
8.2.2 <i>Patentes</i> .....	146
8.2.3 <i>Artigo para ser submetido</i> .....	146

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 Fungos isolados da casca de coco e selecionados pelo maior halo em meio CMC.....	61
Tabela 2 Análise de similaridade e alinhamento das sequências homólogas de Bgl2.....	91
Figura 1 Processo de produção do etanol celulósico. SHF: Hidrólise e Fermentação em Separado, SSF: Sacarificação e Fermentação Simultâneas, CBP: Bioprocesso consolidado. Adaptado de Canilha et al. (2010).....	24
Figura 2 Diagrama teórico, pressão – temperatura, mostrando regiões para a conformação nativa (ativa) de proteínas e para desnaturação (inativa), respectivamente dentro e do lado de fora da elipse, separadas por uma zona de desnaturação irreversível (cinza). (Adaptado de EISENMENGER; CORCUERA, 2009).....	30
Figura 3 Parede celular vegetal. (A) Arquitetura da parede celular contendo celulose, hemicelulose e lignina. (B) Estrutura química do polímero de celulose. (Figura B foi construída usando software Quantax 70 da Bukre nano, e a Figura A foi adaptada de CANILHA et al. 2010).....	32
Figura 4 Estrutura da lignina. (A) Lignina ligada à hemicelulose (B). Ácido ferúlico, ligante intermediário entre o polissacarídeo de arabinosilana e o fenilpropanóide de lignina. (Estrutura construída usando software Quantax 70 da Bukre nano).....	33
Figura 5 Celulases de <i>T. reesei</i> . (A) CBH1 (celobiohidrolase 1, PDB:7CEL), (B) EG1 (endoglicanase 1, PDB:1EG1), (C) Bgl2 ( $\beta$ -glicosidase 2, PDB:3AHY), (D) Bgl1 ( $\beta$ -glicosidase 1, PDB:3ZYZ).....	38
Figura 6 Sinergismo (clivagem randômica) das celulases em uma formulação enzimática durante a hidrólise celulásica. (1) Endocelulase de <i>Thermobifida fusca</i> . (2) exo-celulase/celobiohidrolase de <i>Hypocrea jecorina</i> . (3) $\beta$ -glicosidase de <i>Thermotoga maritima</i> .....	39

Figura 7 Hidrólise celulásica da biomassa. (1) Clivagem da celobiose pela  $\beta$  – glicosidase, e inibição da enzima pelo glicose (em vermelho). (2) Clivagem pela celobihidrolase das cadeias cristalinas e inibição da enzima pela celobiose (em vermelho). (3) Hemicelulose e lignina embebidas na matriz celulósica, vestígios do pré - tratamento. (4) Lignina liberada pela hidrólise e inibição das celulasas por adsorção.....43

Figura 8 Fluxograma da abordagem 1: Isolamento de fungos da casca de coco e medida das atividades das suas celulasas em condições de pressão atmosférica e de alta pressão hidrostática.....46

Figura 9 Fluxograma da abordagem 2: Deslignificação da casca de coco e estudo do processo hidrólise celulásica de suas fibras em condições de alta pressão hidrostática.....47

Figura 10 Atividades lignocelulolíticas em placas de Petri. (A) *A. niger*. (B) *Trichoderma* sp (BTF0948) (decompositor). (C) *P. variable* (BTF0919) (endofítico).....62

Figura 11 Crescimento dos fungos *P.variable* (BTF0919) (A) e *Trichoderma* sp (BTF0948) (B), em meio sólido de fibras da casca de coco não deslignificada, demonstrando atividade de degradação da lignocelulose.....63

Figura 12 Gel de agarose com bandas características na região de 600 pb.....64

Figura 13 Análise das distâncias filogenéticas das sequências geradas de rDNA, realizada no banco de dados do EMBL-EBI, *P. variable* (BTF0919) e *Trichoderma* sp (BTF0948).....65

Figura 14 Imagem das estruturas reprodutivas de *Trichoderma* sp em microscópio óptico (aumento: 400 X) e a olho nu.....65

Figura 15 Imagem das estruturas reprodutivas de *Penicillium variable* em microscópio óptico (aumento: 400 X) e a olho nu.....65

Figura 16 Atividades celulásicas totais dos extratos brutos celulásicos em crescentes

valores de alta pressão hidrostática. ( $p < 0,05$ ). Dentro do círculo, atividades diminuídas.....	69
Figura 17 Análise da estrutura protéica de Bgl1 de <i>T.reesei</i> (PDB:3ZYZ) e de suas regiões de <i>N</i> -glicosilação (N-X-T/S) idênticas a Bgl1 de <i>A. aculeatus</i> (amarelo).....	72
Figura 18 Atividades celulásicas dos extratos brutos celulásicos dos fungos isolados da casca de coco comparada às atividades dos fungos padrões em condições de HHP e de pressão atmosférica.....	75
Figura 19 Alinhamento estrutural dos PDBs de: 1KS4 (endoglicanase de <i>A. niger</i> ) e 1OA2 (endoglicanase de <i>T. reesei</i> ).....	78
Figura 20 Atividade celulásica total dos extratos enzimáticos precipitados com acetona a $50 \pm 1$ °C. Pressão atmosférica (0,1 MPa) e alta pressão hidrostática (HHP).....	82
Figura 21 Estrutura de Bgl1 de <i>T. reesei</i> (PDB:3ZYZ).....	84
Figura 22 Atividade $\beta$ -glicosidásicas a $50 \pm 1$ °C das celulases de: <i>T. reesei</i> 26921 (Sigma) (●), <i>A. niger</i> (Novozyme 188) (■), <i>Trichoderma</i> sp (▲), <i>P. variable</i> (◆).....	86
Figura 23 Múltiplo alinhamento das sequências polipeptídicas de Bgl1 de: <i>T.reesei</i> (PDB:3ZYZ), <i>T. viride</i> (C6GGC9_HYPRU), <i>A. aculeatus</i> (BGL1_ASPAC), <i>A. niger</i> (G3YD55_ASPNA).....	88
Figura 24 Análise das estruturas de 3ZYZ e de 2XJQ. (A) Flo5 (2XJQ) de <i>S. cerevisiae</i> (B) região $\beta$ -pregueada de Bgl1 (3ZYZ) de <i>T. reesei</i> .....	90
Figura 25 Múltiplo alinhamento das sequências polipeptídicas: <i>A. niger</i> (Q9P456_ASPNG), <i>T.reesei</i> (O93785_HYPJE), <i>T.viride</i> (Q7Z7X1_TRIVI), <i>N. koshunensis</i> (Q8T0W7_9NEOP), <i>M. bispora</i> (BGLB_THEBI).....	92
Figura 26 Análise da estrutura de Bgl2 de <i>T.reesei</i> (3AHY).....	93
Figura 27 Múltiplo alinhamento das sequências de Bgl2 de: <i>A. niger</i> (Q9P456_ASPNG), <i>T.reesei</i> (3AHY), <i>S. sulfotaricus</i> (2CER) e <i>P. furiosus</i> (3APG).....	95

Figura 28 Alinhamento estrutural dos PDBs: 2CER e de 3AHY.....	97
Figura 29 Análise dos resíduos de aminoácidos de 3AHY (A312 - G359 em <i>T. reesei</i> /T312-T355 em <i>T. viride</i> ).....	99
Figura 30 Atividade celulásica total. (1,2) Ausência de glicose. (3,4) Presença de glicose na concentração de 10 mg.mL <sup>-1</sup> .....	101
Figura 31 Reação de saponificação, formação de sal carboxílico e álcool. Fonte: Pedersen et al. (2010).....	102
Figura 32 Imagem das fibras da casca de coco em diferentes etapas do processo de deslignificação.....	104
Figura 33 Imagem demonstrando a distribuição do tamanho das.....	106
Figura 34 Hidrólise das fibras da casca de coco deslignificadas em diferentes condições de pressão e temperatura.....	108
Figura 35 Hidrólise das fibras da casca de coco deslignificadas durante a aplicação de pressão por 30 minutos, na ausência de celulases.....	109
Figura 36 Imagem das fibras da casca de coco deslignificadas rompidas após o efeito da pressão hidrostática por 30 minutos, na ausência de celulases.....	110
Figura 37 Análise das estruturas de CipA (PDB:4B9F) e CBH1 (PDB:1Q2E) reportadas por Ding et al. (2012) com função de ligação à CEF.....	111
Figura 38 Hidrólise celulásica das fibras da casca de coco deslignificadas em condições de pressão atmosférica e em alta pressão hidrostática (HHP) ambas a 50 ± 1 °C, usando as celulases dos isolados fúngicos e dos fungos padrões.....	114
Figura 39 Média das atividades relativas de todas as hidrólises celulásicas a 50 ± 1 °C, utilizando as celulases dos fungos isolados e dos fungos padrões. Papel de filtro (controle) e fibras da casca de coco (substrato lignocelulolítico).....	114
Figura 40 Sacarificação celulásica das fibras da casca de coco deslignificadas a 50 ± 1 °C durante um período de 96 horas, usando a mistura de celulases de <i>T. reesei</i> e Novozymes 188.....	118

Figura 41 Imagem em microscópio eletrônico de varredura das fibras da casca de coco deslignificadas, na ausência de celulases, e após a aplicação de alta pressão hidrostática por um período de 72 horas.....	120
Figura 42 Concentração de glicose liberada por miligrama de proteína na sacarificação celulásica da casca de coco deslignificada a $50 \pm 1$ °C por 72 horas.....	122
Figura 43 Imagem em microscópio eletrônico de varredura das fibras da casca de coco deslignificadas após a hidrólise celulásica por 72 horas a $50 \pm 1$ °C .....	124
Figura 44 Mecanismo da hidrólise celulásica da casca de coco em condições de alta pressão hidrostática.....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa = aminoácidos

acc. n°. = número de acesso

ANOVA = Análise de variância

BDA = meio batata dextrose ágar

Bgl =  $\beta$ -glicosidase

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

BRICS = Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul

CBH = celobiohidrolase

CBM = modulo ligante de carboidratos

CEF = Fibrilas Elementares de Celulose

CMC = carboximetilcelulose

DNA = ácido desoxirribonucleico

dNTP = Desoxirribonucleotídeo trifosfato

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBL-EBI = European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute

ENG = endoglicanase

GPa = giga Pascal

GPI = fosfatidilinositol

HHP = alta pressão hidrostática

HPLC = High-performance liquid chromatography

MEA = meio extrato de malte ágar

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

MPa = mega Pascal

MRS = Maarten's Retrieval System

NCBI = National Center for Biotechnology Information

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PDB = Protein Databank

rDNA = DNA ribosomal

RNase = ribonuclease

rpm = rotação por minuto

SDS = Dodecilsulfato de sódio

SWISSPROT = protein database of Swiss Bioinformatics Institute

TrEMBL = Translation of all coding sequences (CDSs) in the EMBL Nucleotide Sequence Database.

UNIPROT = Universal Protein Resource

YASARA= Yet Another Scientific Artificial Reality Application

YEPD = Extrato de lêvedo, peptona dextrose

## RESUMO

A utilização de biomassa celulósica para a produção de etanol celulósico é uma alternativa como combustível renovável. O principal desafio desta produção é aumentar a hidrólise da biomassa celulósica a fim de adquirir produtos com um baixo peso molecular, como por exemplo hexoses. O alto custo do processo é o principal problema, devido às celulases e ao pré-tratamento que são dispendiosos. A utilização de hidrólise celulásica para a produção do bioetanol é considerada sustentável, porém inviável economicamente. Outro problema é a inibição do complexo celulásico por açúcares redutores, tais como celobiose e glicose. Reduções significativas dos custos são necessárias para melhorar a viabilidade comercial da tecnologia de hidrólise celulásica, principalmente a da casca de coco. Usando a casca de coco como substrato foram aplicadas duas abordagens: primeiro, foram isolados fungos da casca de coco, os quais alcançaram atividades celulásicas maiores do que as de fungos padrões utilizados na indústria. Na segunda etapa, a alta pressão hidrostática (HHP) foi utilizada para melhorar a hidrólise enzimática da casca de coco. As celulases dos fungos isolados da casca de coco demonstraram melhor desempenho do que as celulases dos fungos padrões durante a hidrólise celulásica das fibras da casca de coco, tanto em HHP quanto em pressão atmosférica. Observou-se um aumento de cerca de duas vezes na hidrólise da casca de coco usando HHP, devido aos aumentos das atividades  $\beta$ -glicosidásicas, endoglicanásica e celulásicas totais. As  $\beta$ -glicosidases alcançaram um aumento de suas atividades no valor de pressão de 300 MPa, mesmo em presença de concentrações inibitórias de glicose (55 mM). Este evento seria resultado das alterações conformacionais destas celulases, removendo a inibição por glicose. Usando bioinformática para identificar o efeito da HHP nas proteínas, as estruturas de  $\beta$ -glicosidases e endoglicanases foram analisadas por similaridade e alinhamento. Aminoácidos hidrofóbicos e regiões de glicosilação foram detectadas em cavidades, nos sítios ativos e em estruturas  $\beta$ -pregueadas. A análise sugere que a HHP ao afetar as regiões internas das proteínas, promove também a ligação de aminoácidos hidrofóbicos das cavidades e de regiões de glicosilação aos carboidratos, levando à estabilização da proteína e ao aumento da atividade. A HHP foi capaz de causar rupturas e de romper ligações de hidrogênio das fibras de coco, acessando partes internas. O valor de 300 MPa é capaz de expor as partes apolares das fibras, tais

como CEF, que podem se ligar por interação hidrofóbica aos aminoácidos internos das celulasas expostos pela HHP. O aumento da hidrólise celulásica ao utilizarmos pressão, pode ser devido à aproximação do substrato ao sítio ativo via interações hidrofóbicas, tais como aquelas promovidas por CBM (modulos ligantes de carboidrato). Assim, empregando a tecnologia de HHP juntamente com celulasas de fungos isolados de substratos específicos, o processo de produção de etanol celulósico pode se tornar econômico, viável e eficiente em termos energéticos, especialmente com relação ao melhoramento das atividades  $\beta$ -glicosidásicas.

Palavras-chave: HHP, hidrólise celulásica, fungos, etanol celulósico, casca de coco

## ABSTRACT

The use of cellulosic biomass for cellulosic ethanol production has been a serious option for the production of renewable fuels. The main focus in the cellulosic ethanol production is to increase the hydrolysis of these cellulosic materials in order to produce products with a low-molecular weight, such as hexoses. The high costs involved with this process due to the use of cellulases and the biomass pretreatment, causes the main problem in an economically viable large-scale production of bioethanol. Even though enzymatic disruption of cellulose has been considered the best environmental practice, cellulase is the most expensive step during cellulosic ethanol production. Another problem is the inhibition of the cellulase complex by reducing-sugars such as cellobiose and glucose. Significant cost-reduction becomes needed in order to enhance viable commercial use of cellulase hydrolysis technology. Using coconut husk as a biomass substrate, we applied two approaches: firstly, we isolated fungi from coconut husks. We found that their cellulases outperform the cellulases of the industry standards on the hydrolysis of coconut husk. Secondly, we employed High Hydrostatic Pressure (HHP) to the cellulases in order to improve the enzymatic performance. After the HHP treatment, we observed an increase in coconut husk hydrolysis by a factor of 2 as a result of an increase of the  $\beta$ -glucosidase, endoglucanase and total cellulase activities. The effect of HHP is able to break the hydrogen bonds working down to the scales of the coconut fibers. Further, the inhibition of  $\beta$ -glucosidases caused by glucose was removed under HHP, the  $\beta$ -glucosidases achieved higher activities in the presence of 55 mM of glucose as a result of changes in the conformation of this cellulase on HHP. Using bioinformatics tools to analyse structures of  $\beta$ -glucosidase and endoglucanase, we found hydrophobic aminoacids and glycosylation regions in the cavities; in the active sites; and on  $\beta$ -sheets structures. While HHP affects the cavities of the proteins, the carbohydrates can bind both to their side chains of hydrophobic amino acids as to glycosylation regions, leading to an increase of the activities and a stabilization of the protein. HHP to value of 300 MPa exposes the internal apolar parts of the coconut fiber (CEF) and favors the binding of hydrophobic aminoacids of the cellulase to these parts of the fibers, as well as to glucose. The increase of the cellulase hydrolysis under HHP can be caused by a factor that works like a CBM (Carbohydrate Binding Module) that approaches the substrate at the active site. Thus, employing both the

technologies HHP as well as substrate specific fungi can potentially make bioethanol production an economic viable and energy-efficient process, especially regarding the improvement of  $\beta$ -glucosidase activities.

Key words: HHP, cellulase hydrolysis, fungi, cellulosic ethanol, coconut husk

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O mercado mundial de etanol tem se expandido de maneira exponencial. Este crescimento deveu-se a diversos fatores, como o grande apelo ambiental generalizado, levando às políticas ambientais e a busca por fontes energéticas alternativas ao petróleo. Desta forma, no Brasil, não só o uso de etanol combustível é estimulado, mas também a sua adição a combustíveis fósseis, como a gasolina. Ainda a cada ano, existe a tendência do aumento da população mundial, a qual está projetada para atingir 9 bilhões de pessoas até 2050, o que aumenta a demanda energética e os resíduos agrícolas, principalmente com o aceleramento econômico dos países de mercado emergente (BRICS – Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul). A produção de etanol celulósico, a partir de materiais lignocelulósicos, um combustível renovável e economicamente viável, destaca-se como uma alternativa para os custos do petróleo e para os resíduos agrícolas que devem ser reutilizados de forma ambientalmente sustentável (MARTIN, 2010). Desta forma, a utilização de resíduos agroindustriais apresenta-se como um importante meio para a produção de etanol, aliado ao aproveitamento de resíduos (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol, com uma alta produtividade alcançada a partir da cana de açúcar. E o agronegócio tem gerado uma grande quantidade de resíduos lignocelulolíticos, que devem ser reutilizados de maneira sustentável. A produção de etanol celulósico (etanol de segunda geração) é uma das opções para a reutilização dos resíduos (como combustível renovável) e contribui para aumentar o cumprimento com as leis ambientais em muitos países (CARERE et al. 2008).

O aumento anual das culturas de cana de açúcar ilustra a aceleração da produção de etanol e também a agrícola, contudo 25% da biomassa seca da cana-de-açúcar, constituída principalmente de lignocelulose e hemicelulose, ainda significa uma grande fonte de carbono para a produção de biocombustíveis. Grande esforço tem sido feito com a finalidade de transformar esta biomassa em etanol celulósico e estas pesquisas acabaram por influenciar a busca por outras fontes de biomassas lignocelulósicas como matéria prima para a produção do etanol de segunda geração. Os países que mais se destacam na América em pesquisas para

a produção do etanol de segunda geração são: o Brasil, com a cana de açúcar, e os Estados Unidos com o milho. A Ásia também está consolidando sua posição nessas pesquisas, mas tem voltado seus esforços para o estudo da biomassa de árvores, igualmente os Canadenses e Europeus. Na América do Sul, Argentina e Chile estão em fase inicial de pesquisas em bioenergia (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011).

Em geral, as atividades agroindustriais são caracterizadas pela geração de grande quantidade de materiais lignocelulósicos, e tais resíduos apresentam-se como os recursos naturais renováveis mais abundantes do planeta Terra. Adicionalmente, a grande disponibilidade desses materiais os torna uma matéria-prima ideal para a produção de etanol de forma sustentável, a qual pode ser realizada por microrganismos tais como leveduras, bactérias ou fungos (HOWARD et al. 2003; CARERE et al. 2008).

A produção de etanol celulósico, ou de segunda geração, é dividida da seguinte forma: pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, hidrólise enzimática e fermentação (Figura 1). O pré-tratamento da biomassa celulósica consiste em remover a lignina que é um composto aromático polifenólico e inibidor da hidrólise enzimática e da fermentação. Durante a hidrólise celulásica, os fenóis derivados da quebra da lignina são responsáveis por desacelerar a sacarificação, assim como a fermentação, o que lidera um problema de ordem econômica para a produção do etanol de segunda geração (XIMENES et al. 2010; PEDERSEN et al. 2010).

Portanto, a lignina deve ser removida, com pré-tratamentos, para que a celulose apresente-se disponível para a hidrólise celulolítica realizada pelas celulasas. Para remover a lignina são utilizados tratamentos ácidos e alcalinos, tratamentos com explosão a vapor, e hidrólise enzimática com enzimas lacases e peroxidases produzidas por microrganismos lignocelulolíticos. Porém, este processo ainda é um dos gargalos na produção do etanol, pois os microrganismos que realizam esta remoção, pela utilização de enzimas, são lentos, e os reagentes químicos são rápidos, porém destrutivos. Assim, muito estudo ainda é necessário para tornar este processo economicamente sustentável (MARTIN et al. 2010; SUKUMARAN et al. 2009; MTUI, 2009). Após o pré-tratamento, as moléculas de celulose apresentam-se cerca de 10 a 20 vezes mais disponíveis à hidrólise realizada pelas celulasas. Entretanto, essa quantidade de celulose ainda apresenta-se muito aquém do que poderia ser extraído dos materiais lignocelulósicos (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011).

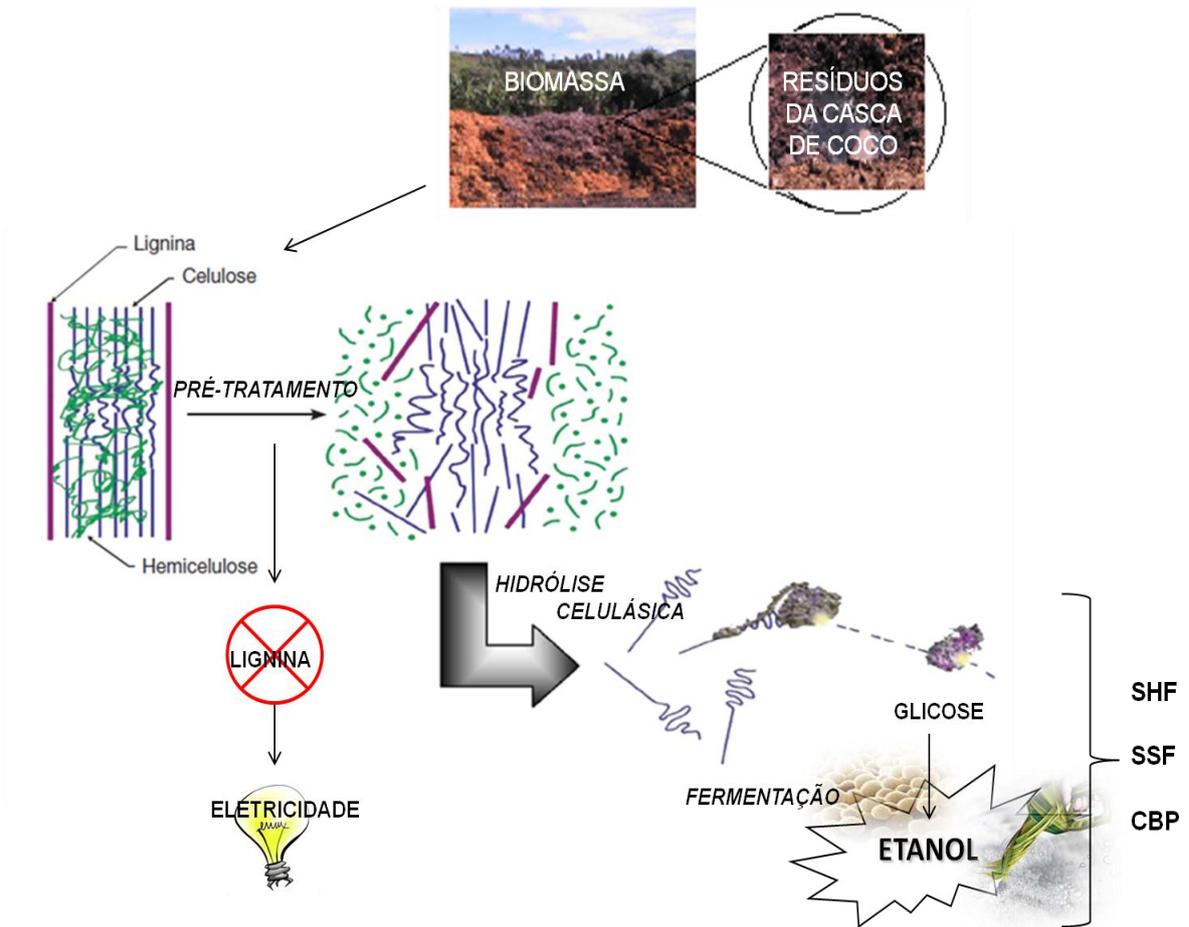


Figura 1 Processo de produção do etanol celulósico. SHF: Hidrólise e Fermentação em Separado, SSF: Sacarificação e Fermentação Simultâneas, CBP: Bioprocesso consolidado. Adaptado de Canilha et al. (2010).

O pré-tratamento é um processo que também pode ser designado como polpação, o qual é utilizado nas indústrias de papel e também para a remoção de lignina. Esse processo de polpação usando hidrólise ácida ou alcalina é danoso ao meio ambiente, produzindo uma grande quantidade de resíduos químicos potencialmente poluentes e perigosos (SULAIMAN et al. 2011). A hidrólise alcalina é muito reportada como pré-tratamento na produção do etanol de segunda geração. Uma alta concentração de 20-30% de NaOH, foi reportada para a deslignificação da casca de coco, podendo afetar a economia do processo de produção do bioetanol (VAITHANOMSAT et al. 2011). Estes pré-tratamentos químicos, juntamente com a explosão a vapor, no processo de deslignificação para a produção de etanol celulósico, pode levar à formação de inibidores da fermentação como furfural e hidroximetilfurfural, principalmente quando o pré-tratamento é do tipo ácido

(PEDERSEN et al. 2010).

A celulose e a hemicelulose obtidas com o pré-tratamento podem ser hidrolisadas por celulases, assim como por hemicelulases ou ácidos, liberando assim glicose, xilose e outros açúcares redutores para a fermentação a etanol (ZHANG et al. 2006). Outro gargalo da produção do etanol celulósico é a hidrólise da celulose e da hemicelulose e a produção enzimática, pois, além de custosas, os processos são ineficientes no que tange a quantidade de celulases necessárias para a hidrólise. A produção de celulases ainda é o maior entrave econômico da indústria de biocombustíveis, juntamente com o processo de sacarificação enzimática que é lento e necessita ser otimizado (BON et al. 2008).

Um outro problema na produção do etanol de segunda geração está relacionado com o metabolismo da xilose, um carboidrato de cinco carbonos, que não é metabolizado pela levedura *S. cerevisiae*, a levedura mais utilizada nos processos de produção de etanol e a mais estudada. Apesar da grande eficiência na produção do etanol a partir da glicose, esta levedura é capaz apenas de fermentar açúcares de seis carbonos, assim grande esforço tem sido feito para transformar este microrganismo em um fermentador da biomassa lignocelulósica, na presença de fenóis e de outros açúcares de cinco carbonos, tais como a arabinose (KUYPER et al. 2003; van MARIS et al. 2007).

A xilose representa cerca de 25% da biomassa lignocelulolítica, fazendo parte da cadeia de hemicelulose. Alguns processos reportam a utilização da levedura do gênero *Pichia* e bactérias para a fermentação da xilose juntamente com a glicose a etanol, o fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* também foi reportado fermentando xilose a etanol, este fungo foi isolado de talos de milho. Porém, esta etapa do processo ainda é ineficiente, e não existe um processo industrial eficiente para a fermentação das pentoses (KANOKRATANA et al. 2008; HALDRUP et al. 1998, FAN et al. 2011).

O etanol de primeira geração é produzido a partir da sacarose, a qual gera apenas 1/3 de toda energia que pode ser alcançada a partir da produção da cana-de-açúcar, assim os outros 2/3 restantes de energia podem ser gerados da biomassa da cana de açúcar descartada, a qual atualmente é considerada resíduo. Expandindo este valor para os milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos que são gerados atualmente no Brasil a partir das várias vertentes do agronegócio, como exemplo os da produção de coco verde, podemos considerar que a produção

do etanol celulósico é realmente viável em termos econômicos e energéticos (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011).

A qualidade do etanol de primeira geração e do etanol celulósico, ou etanol de segunda geração, é semelhante. A única diferença entre os produtos supracitados é o processo de produção, em que um utiliza do caldo da cana-de-açúcar, e o outro de materiais lignocelulolíticos ou biomassa. Para este processo as celulases mais utilizadas são as produzidas pelas empresas NOVOZYMES S/A e GENENCOR S/A, as quais são conhecidas por produzirem celulases altamente eficientes. Atualmente foi anunciado pela GranBio, que a primeira usina de etanol celulósico do Brasil teria suas atividades iniciadas em dezembro de 2013, utilizando enzimas Cellic-CTec3 da Novozymes, e como biomassa o bagaço de cana-de-açúcar (GLOBO RURAL, 2012).

## 1.2 ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

A alta pressão hidrostática (HHP, do inglês *High Hydrostatic Pressure*) é uma força física aplicada a uma coluna de água, atingindo todas as áreas submetidas à mesma em um dado momento. Muito utilizada como técnica em diversos estudos científicos, apresenta aplicação industrial em vários setores. A utilização da alta pressão hidrostática para esterilização de alimentos líquidos ou sólidos, que são submetidos a pressões acima de 100 MPa, já é amplamente relatada para melhorar a segurança e qualidade dos alimentos, inclusive na literatura patentária. O tratamento usando alta pressão hidrostática, que utiliza pressões de 100 a 1000 MPa, é utilizado para destruição dos microrganismos deteriorantes e, ainda, para retardar ou ativar as reações enzimáticas. A pressurização é realizada em espaço limitado, com a água como meio de transferência da pressão e de reação. A pressão aplicada e o tempo de aplicação dependem do tipo do produto a ser tratado e do produto final desejado (TORREZAN, 2003).

No passado, a comercialização de produtos processados usando alta pressão estava focada no alto valor agregado dos alimentos, por causa do alto custo dos equipamentos e de suas instalações. No entanto, devido ao desenvolvimento rápido da tecnologia de HHP e à sua alta aceitação e demanda desses produtos pelos consumidores, mais produtos processados por HHP estão agora disponíveis em supermercados de alguns países, tais como Estados Unidos, Japão, Alemanha,

Espanha, Holanda, França, Reino Unido e Bélgica, reduzindo os custos de equipamento e instalação consideravelmente. Porém, no Brasil, a expansão industrial desta tecnologia ainda não é acentuada (AGUIRRE; CÁNOVAS, 2011).

Equipamentos de alta pressão hidrostática, automatizados, são utilizados em escala industrial para processamento de alimentos e podem possuir uma capacidade de até  $2 \text{ ton.h}^{-1}$ , quando operadas em um regime de 600 MPa por 3 minutos por carga tratada. Em algumas pesquisas, como por exemplo, as de monitoramento e amostragem de organismos piezófilos, a 11.000 m abaixo do nível do mar, alguns aparelhos de pressão em nível de grande escala, são utilizados como veículos operados remotamente no fundo do mar (AERTSEN et al. 2009). Alguns vasos de pressão possuem volumes de até 300 litros, sendo muito utilizados em pasteurização e esterilização, processando até 8.640 toneladas anualmente (MUJICA et al. 2011).

Barreiras tecnológicas no processamento de alta pressão hidrostática, definem aplicações de baixo custo como as que estão abaixo de 420 MPa, como por exemplo para processos de pausterização. O limite da tecnologia encontra-se em processos utilizados principalmente para a esterilização, e as situações de custos maiores para vasos de pressão que utilizam valores maiores que de 680 MPa (TORRES; VELASQUEZ, 2005; FRAGOSO et al. 2011; AVELLANEDA et al. 2011).

O efeito da alta pressão nos compostos vegetais, assim como na parede celular de endosperma de grãos de arroz foi reportada entre os valores de pressão de 100-400 MPa, ocorrendo parcial destruição destes entre os valores de pressão reportados, e aumento de sua permeabilidade. Estudos de pressão em biomacromoléculas são geralmente realizadas na taxa de 0,1 MPa a 1.500 MPa (AERTSEN et al. 2009). O efeito da alta pressão, a valores de 1-6 GPa, foram reportados para cadeias de celulose da madeira, criando mudanças nas suas estruturas de celulose, hemicelulose e lignina, e foram observadas também a amorfização da celulose cristalina e a despolimerização de cadeias de celulose, assim como a hidrólise de carboidratos (KOKOREVICS et al. 1997).

É conhecido que HHP é capaz de mudar a conformação de proteínas e as interações químicas, dependendo da magnitude e período de tratamento. Valores de pressão maiores que 400 MPa podem levar à desnaturação de proteínas; já a exposição a médias pressões, aproximadamente 200 MPa, frequentemente apenas afeta as estruturas quaternárias das proteínas, ocasionando uma dissociação das

subunidades. Isto faz da pressão uma força importante para seletivamente sintonizar interações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio e desestabilizar os efeitos hidrofóbicos.

O efeito da pressão nos sistemas moleculares é governado pelo princípio de Le Chatelier: em que um aumento da pressão irá deslocar um dado equilíbrio para o lado que ocupa um menor volume. A dependência da pressão com relação à energia de Gibbs é simplesmente dada pela mudança de volume. Ao contrário da temperatura, a pressão somente influencia o volume de um sistema, sem afetar a energia interna. Ao passo que a temperatura pode afetar a velocidade de reação favorecendo a formação de espécies com maior volume, a pressão pode dirigir o mecanismo de reação por favorecer a formação das espécies com menor volume, além disso, a pressão pode acelerar ou desacelerar reações se o volume de ativação for positivo ou negativo (AERTSEN et al. 2009).

Alta pressão hidrostática é requerida para causar mudanças conformacionais, e algumas vezes, resultando em desestabilização das proteínas e perda da função. Este efeito da pressão hidrostática provoca um empacotamento das cadeias de aminoácidos, associada com a compressão das moléculas de proteínas e aumento de cavidades, como um resultado das mudanças provocadas pela hidratação (MEERSMAN et al. 2006).

O mecanismo de desnaturação de proteínas pode ser exemplificado pela seguinte reação:



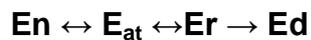
Em que **P** é a proteína nativa, **P(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>** é a proteína hidratada, e **P<sub>D</sub>** é a proteína desnaturada. Alta pressão hidrostática induz a penetração da água na proteína, rompendo os contatos hidrofóbicos a favor do solvente, expondo assim as partes hidrofóbicas. Por fim, as ligações de hidrogênio entre proteína-proteína são substituídas pelas ligações de hidrogênio da água formando o complexo água-proteína, **P(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>**. A variação do volume associado com a formação de ligação de hidrogênio é próxima a zero, implicando que a pressão não irá afetar fortemente esta interação. A desnaturação de proteínas está associada com a mudança do volume na ordem de -10 a -100 mL.mol<sup>-1</sup>. Vários fatores podem influenciar na diminuição do volume, e a soma de todos estes fatores deve resultar em uma elevada variação de

volume, de ordem negativa, para causar a desnaturação da proteína. Dentre os fatores que estão diretamente associados com a diminuição do volume podemos citar a hidratação das moléculas e formação de cavidades, assim como as reações bioquímicas de protonação, de hidratação de grupos hidrofóbicos e de grupos apolares, dissociação das proteínas e desnaturação das proteínas por mudanças nas características do tampão. Destes, o que possui maior valor de variação de volume é o de dissociação de proteínas, cerca de  $-500 \text{ mL}\cdot\text{mol}^{-1}$ , e os que possuem menor variação de volume, a hidratação de grupos hidrofóbicos e apolares, com valores respectivamente de  $-6,2$  e  $-4,5 \text{ mL}\cdot\text{mol}^{-1}$  (MICHIELS, 2008).

Elevados aumentos de pressão e temperatura, ou a adição de agentes desnaturantes à enzima nativa (En), tornam a proteína primeiramente reversível (Er) e, em seguida, irreversivelmente inativada (Ed):



Contudo, aumentos moderados de pressão podem produzir uma enzima mais ativada ( $E_{at}$ ), o que representa a pressão induzindo a ativação, entre os seus estados nativo e reversível:



Separar os efeitos que a alta pressão hidrostática exerce na velocidade constante, ou cinética, daqueles da conformação enzimática, e assim como também dos relacionados à disponibilidade de enzimas ativadas a elevadas pressões é difícil porque ambos ocorrem simultaneamente afetando a velocidade da catálise. Assim, o mecanismo de ativação de enzimas usando alta pressão hidrostática possui três variáveis a serem investigadas: mudança na estrutura conformacional da enzima, mudanças nos mecanismos de reação, e, por fim, mudanças no substrato ou propriedades físicas dos solventes que afetam as estruturas das enzimas ou etapas limitantes da sua velocidade.

É difícil obter um significado fisicamente preciso para o volume de ativação (variação de volume) para reações enzimáticas em condições de pressão, pois a pressão afeta vários fatores incluindo: conformação enzimática, solvatação enzimática (interação com o meio circundante, com outras proteínas, água, íons,

etc), equilíbrio químico, dentre outros efeitos bioquímicos. Dependendo das alterações de reações ou das mudanças conformacionais das enzimas (as quais são dependentes da faixa de temperatura-pressão Figura 2), o volume de ativação pode ser positivo, negativo ou insignificante (EISENMENGER; CORCUERA, 2009).

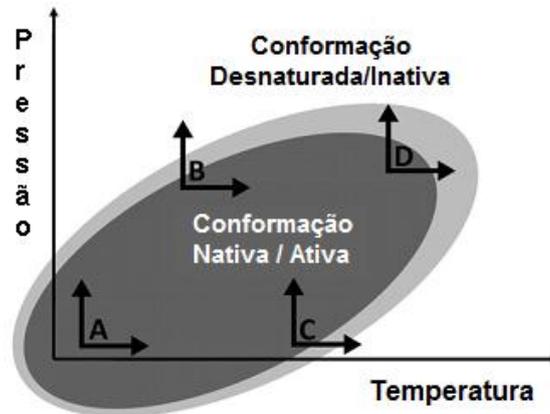


Figura 2 Diagrama teórico, pressão – temperatura, mostrando regiões para a conformação nativa (ativa) de proteínas e para desnaturação (inativa), respectivamente dentro e do lado de fora da elipse, separadas por uma zona de desnaturação irreversível (cinza). (Adaptado de EISENMENGER; CORCUERA, 2009).

Alguns estudos relataram melhoramento das atividades celulásicas usando pressão, e muitas pesquisas demonstram a ativação de enzimas em condições de alta pressão hidrostática, como exemplo, lipases, desidrogenases, fenoloxidasas e várias hidrolases de diferentes organismos (SALVADOR et al. 2010; EISENMENGER; CORCUERA, 2009).

Murao et al. (1992), demonstrou o efeito da alta pressão hidrostática no aumento da atividade endoglicanásica e avicelásica de *Trichoderma viride* e de *Aspergillus aculeatus*, porém, o mecanismo de ação, ou explicações para este evento de aumento, não foram evidenciados até o momento. Em adição ao aumento das atividades de biocatálise, o uso de alta pressão também mostrou ser promissor em fermentação com microrganismos, tanto em *Trichoderma reesei*, melhorando a fermentação submersa e a produção de celulases usando alta pressão em valores de 20-30 MPa, quanto em *Saccharomyces cerevisiae*, em que a fermentação de glicose a etanol foi mais rápida e eficiente em condições de pressão (CHO, 1990; PICARD et al. 2007; BRAVIM et al. 2012).

### 1.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E RESÍDUOS DA CASCA DE COCO

A biomassa lignocelulósica é essencialmente constituída por celulose, hemicelulose e lignina, e constitui cerca de 90% da biomassa de carbono disponível na biosfera. Esta constituição é responsável pela rigidez celular, constituindo a arquitetura da parede celular vegetal, podendo ser do tipo primária ou secundária. A parede celular secundária é possuidora da maior fonte de carbono e, basicamente, constituída por 45% de celulose, 30% de hemiceluloses, e 25% de lignina (CANILHA et al. 2010, TAIZ; ZEIGER, 2004) (Figura 3).

A celulose é um homopolissacarídeo de glicose, em que os monossacarídeos estão unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, via carbono anomérico ( $C_1$ ), apresentando um grau de polimerização de até 10.000, sendo sintetizada na membrana plasmática pelo complexo enzimático contendo a enzima celulose sintase. Uma única molécula de celulose sintetizada por esse complexo enzimático pode conter acima de 3.000 unidades de glicose.

A estrutura linear da celulose é conferida pelas ligações glicosídicas e possibilita a união das cadeias de celulose pelas ligações de hidrogênio, intra e intermolecularmente, em toda a sua extensão. Formando assim uma camada de polímeros horizontais, em que 20 a 40 cadeias individuais de celulose constituem as microfibrilas de celulose com uma espessura de 5 a 12 nm (TAIZ; ZEIGER, 2004). Cada polissacarídeo pode conter milhares de unidades com cerca de 2 a 3  $\mu$ m de comprimento (terminações reductoras todas ao mesmo lado), e as fibras podem atingir centenas de micras de comprimento.

Estas “fibrilas elementares” possuem alto grau de cristalinidade, e conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em um grande número de solventes, e explica pelo menos em parte, a resistência à degradação microbiana (MATTHEWS et al. 2006).

A celulose possui um heteropolissacarídeo de hemicelulose ligado externamente ao seu biopolímero, sendo constituída essencialmente de xilana, xiloglicanos, arabinoxilanas, glicomanana, glicana. A hemicelulose possui ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4, é ramificada e apresenta um grau de polimerização inferior a 200, este polímero recobre a celulose formando um domínio celulose-hemicelulose da parede celular. As hemiceluloses impedem que as fibras paralelas de polímeros de celulose colapsem entre si, e também permite as interações fracas

entre uma fibra e outra, formando uma rede (BUCKERIDGE et al. 2008; CANILHA et al. 2010).

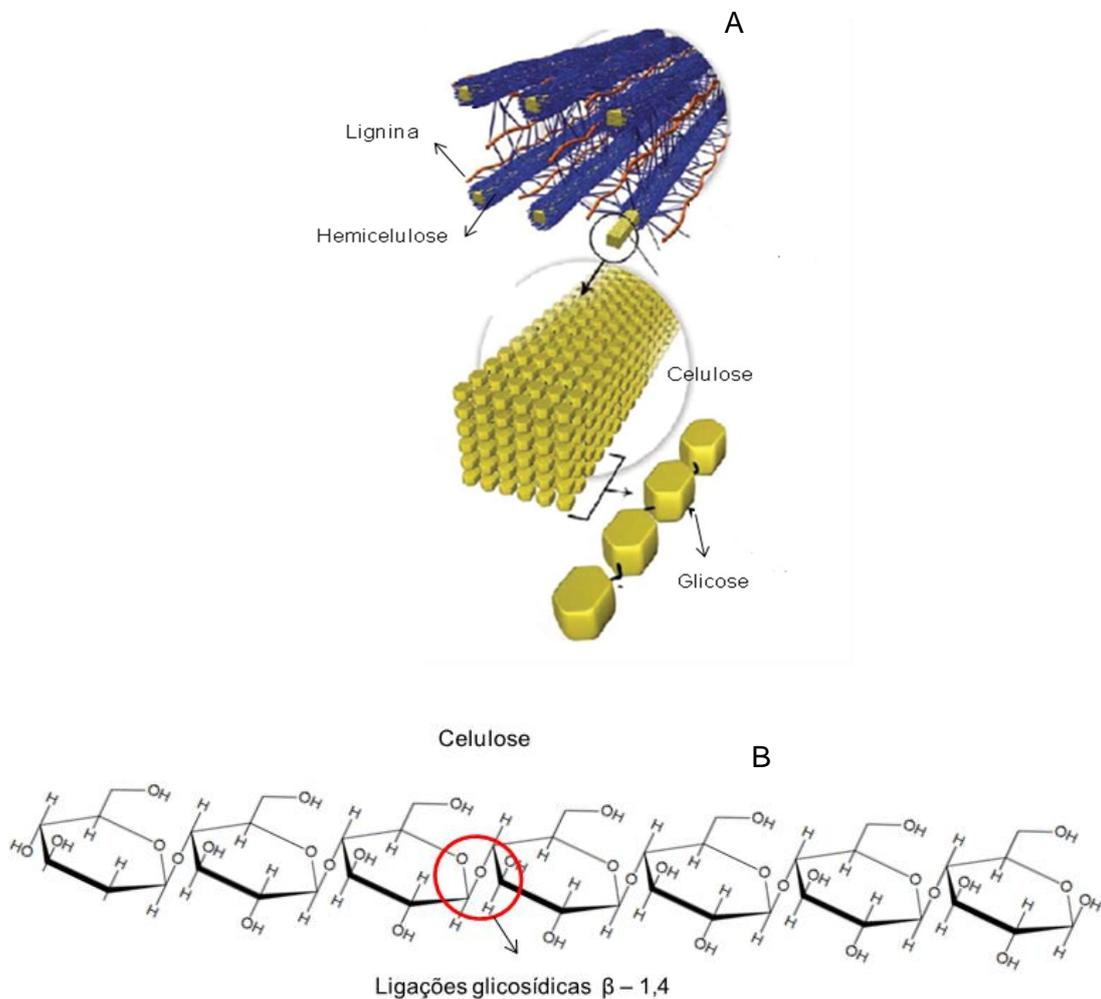


Figura 3 Parede celular vegetal. (A) Arquitetura da parede celular contendo celulose, hemicelulose e lignina. (B) Estrutura química do polímero de celulose. (Figura B foi construída usando software Quantax 70 da Bukre nano, e a Figura A foi adaptada de CANILHA et al. 2010)

As arabinoxilanas e xilanas são as cadeias da hemicelulose que são responsáveis pelas ligações entre as microfibrilas de celulose e a lignina. A lignina é um composto polifenólico ou fenilpropanóide, que é formada pela polimerização de unidades fenil-propano, e seus constituintes são os três maiores compostos: fenólicos, álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Este composto

fenólico envolve e preenche o espaço entre as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, podendo formar ligações covalentes com a hemicelulose, a partir do ácido ferúlico, uma das moléculas fenólicas (Figura 4). As microfibrilas de celulose, hemicelulose e a lignina formam estruturas chamadas microfibrilas, que são organizadas dentro de fibrilas formando fibras, as quais medeiam à estabilidade estrutural na parede celular vegetal (BURANOV; MAZZA, 2009; RUBIN, 2008).

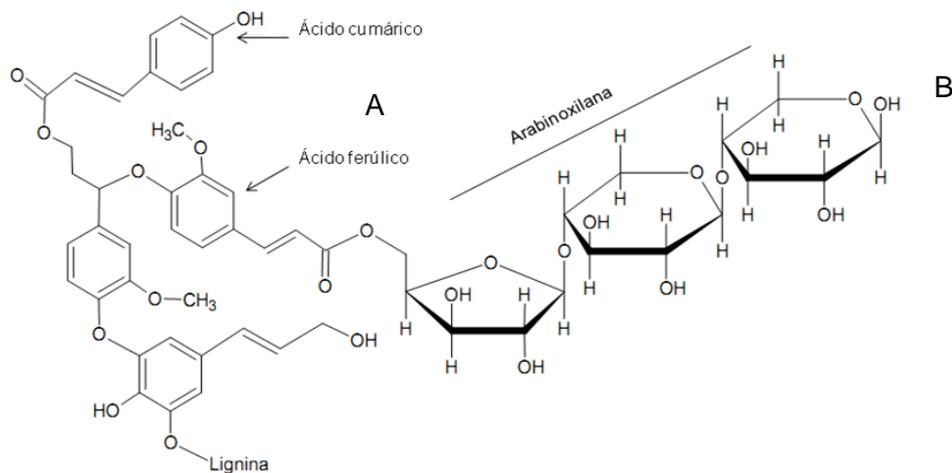


Figura 4 Estrutura da lignina. (A) Lignina ligada à hemicelulose (B). Ácido ferúlico, ligante intermediário entre o polissacarídeo de arabinoxilana e o fenilpropanóide de lignina. (Estrutura construída usando software Quantax 70 da Bukre nano).

A casca de coco verde é um dos tipos de resíduos lignocelulolíticos, tais como bagaço e palha da cana de açúcar, palha de arroz, madeira, dentre outros, apresentando todas as características supracitadas de uma fibra celulolítica. A mesma pode ser obtida a partir do epicarpo e mesocarpo do fruto do coqueiro, o coco, e são caracterizadas por sua dureza, atribuída ao elevado teor de lignina, semelhante ao da madeira (CORRADINI, 2009). Assim como outros resíduos lignocelulolíticos possui lignina, hemicelulose e celulose, constituindo microfibrilas e microfibrilas de celulose. É reportado que estas fibras possuem em torno de 36 - 43% em teor de celulose, e de lignina em torno de 41 - 45%, e para a hemicelulose em torno de 0.15 - 0.25% (BISMARCK et al. 2001).

A produção agrícola no Brasil gera toneladas de resíduos por ano e, em particular, nas regiões tropicais, milhares de toneladas de casca de coco são descartadas todos os dias gerando um problema ambiental. Atualmente o Brasil descarta até 6,7 milhões de toneladas de casca de coco por ano. Esses resíduos levam cerca de oito anos para serem degradados, tornando um problema para a saúde humana e animal, assim como para o meio ambiente. O problema existe especificamente nas áreas de alto consumo da água de coco. Ainda, nas regiões de utilização do coco para extração da polpa, nos casos do coco seco, o volume de resíduos é acentuado (BITENCOURT; PEDROTTI, 2008; ROSA et al. 2001).

Desta forma, uma excelente alternativa para a redução da geração de resíduos do coco verde é a utilização deste material como fonte de carboidratos para a produção de etanol combustível. Estes resíduos, poluentes em potencial, podem ser transformados em uma gama de produtos com alto valor agregado (MTUI, 2009; HOWARD et al. 2003; VAITHANOMSAT et al. 2011).

Além de trazer importantes vantagens ambientais, a produção de etanol a partir das cascas do coco verde proporciona outros benefícios como a redução da competição entre etanol e alimentos, maior aproveitamento dos recursos naturais, diminuição da quantidade de resíduos gerados pela indústria, barateamento da produção de etanol, dentre outros (MTUI, 2009; BITENCOURT; PEDROTTI, 2008). Além da grande produção e consumo atual, o mercado do coco verde tende a expandir-se, principalmente, em termos de exportações. Esta elevada produção e consumo do coco verde geram uma grande quantidade de resíduos, constituído essencialmente pelas cascas do fruto, que representam de 80-85% do peso bruto do coco.

Atualmente, o país é o quarto maior produtor mundial com uma produção aproximada de 2,8 milhões de toneladas de coco, em uma área colhida de 287 mil hectares de coqueiros. Existe a tendência do aumento da produção e de sua produtividade, visto o incremento tecnológico na cultura e, principalmente, o avanço da fronteira agrícola com cultivo de coqueiros do tipo anão e híbridos. O Brasil possui cerca de 280 mil hectares cultivados com coqueiro, os quais estão distribuídos, praticamente, em quase todo o território nacional (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011).

A casca de coco possui em média um peso de 1,5 kg (SILVEIRA, 2008), considerando-se que de 80 a 85% do peso bruto do coco verde são constituídos de

cascas, consideradas lixo (ROSA et al. 2001). O problema da disposição dos resíduos do coco verde acentua-se nos grandes centros urbanos e aumenta exponencialmente juntamente com o crescimento populacional. Esses resíduos da casca de coco são de difícil descarte, sendo enviados para lixões e aterros sanitários. Além disso, o descarte desses resíduos sólidos representa um custo adicional às indústrias processadoras do coco verde, que como grandes geradoras de resíduo, apresentam responsabilidade pela coleta do material (CARRIJO et al. 2002; ROSA et al. 2002; ROSA et al. 2001; SILVA et al. 2006).

A deposição e a aglomeração das cascas de coco em regiões industriais de envasamento da casca de coco gera pilhas de resíduos lignocelulósicos sem um destino próprio para utilização, o que providência um foco para mosquitos transmissores de doenças, tais como o *Aedes aegypti*, 'o mosquito da dengue'. As cascas entram em um processo de degradação dos seus compostos recalcitrantes, e substâncias tóxicas, tais como o chorume, são produzidas com a consequente infiltração no solo, o que caracteriza um problema ambiental (ROSA et al. 2002; ROSA et al. 2001).

Assim, os resíduos do coco verde, provenientes do consumo de sua água, apesar de representarem um grande problema ambiental para as áreas consumidoras, podem constituir-se uma valiosa fonte de matéria-prima para a produção de etanol, visto que seu mesocarpo fibroso representa 79% a 81% dos resíduos do coco (ROSA et al. 2001, RODRIGUES et al. 2009), e que esta parte do casca é de fácil manipulação. Porém, para que se possam aproveitar os carboidratos complexos existentes na casca do coco verde faz-se necessária uma hidrólise eficiente destes carboidratos.

#### 1.4 CELULASES E FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS

As celulasas são utilizadas para vários fins, nas indústrias de papéis, nas têxteis, na produção de alimentos e bebidas, na formulação de detergentes e mais atualmente para a produção do etanol celulósico. Podem ser produzidas por bactérias e fungos, porém as suas maiores atividades enzimáticas são encontradas em fungos filamentosos, principalmente em fungos do tipo *Trichoderma* sp, sendo este o mais estudado para produção de celulasas e para os processos de biodegradação (SANCHEZ, 2009; WILSON, 2009).

A literatura disponível sugere que *T. reesei* secreta no mínimo quatro diferentes endoglicanases (EGI-EGIV), duas celobiohidrolases (CBHI and CBHII) e duas  $\beta$ -glicosidases (HERPÖEL-GIMBERT et al. 2008). A análise de suas celulasas via proteômica comparativa dos secretomas de *T. reesei* RUTC 30 e de fungos derivados da cepa *T. reesei* 26921 (QM9414) não demonstrou diferença no secretoma destes fungos (HERPOEL-GIMBERT et al. 2008). Assim, *T. reesei* RUTC 30 and *T. reesei* 26921 (QM9414), aparentemente apresentam a mesma quantidade de celulasas, e são mutantes obtidos aleatoriamente da mesma cepa parental (*T. reesei* QM6a) (SEIDL et al. 2008).

As medidas de atividades celulásicas foram padronizadas pela primeira vez por Ghose (1987) para as celulasas de fungos do gênero *Trichoderma*, usando pH 5,0 e temperatura de 50 °C, porém em 2009, Eveleigh et al. (2009) relatou também uma padronização de atividades celulásicas sendo medidas a 50 °C pH 4,8 para celulasas dos fungos do gênero *Trichoderma*, assim como também para celulasas de outros fungos tais como *Pestalotiopsis*, *Aspergillus*, e celulasas de bactéria *Thermomonospora*. Farinas (2010) reportou atividades celulásicas do sobrenadante de *Aspergillus niger*, cultivado em fermentação semi-sólida, com valores ótimos de pH em torno de 4,4 e 5,0, e as temperaturas ótimas encontradas entre os valores de 35 °C a 60 °C. Juhász et al. (2004) encontrou que a produção enzimática na fermentação submersa e a atividade celulásica de *T. reesei* RUT C30 aumentaram em um pH ótimo de 5,0, e a atividade não foi detectada a pH 6,0.

O complexo celulásico é de grande importância na hidrólise de biomassa, sendo constituído por três tipos de enzimas: as primeiras são as endoglicanases, que hidrolisam as ligações  $\beta$  -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose, essas ligações glicosídicas intramoleculares acessíveis das cadeias de celulose são clivadas aleatoriamente para produzir extremidades de cadeias novas; as segundas são as exoglicanases, que progressivamente clivam as cadeias de celulose nas extremidades para libertar celobiose solúvel ou glicose; e por último as  $\beta$ -glicosidases (ou celobiasas), que hidrolisam celobiose à glicose a fim de eliminar a inibição por celobiose. Estes três processos de hidrólise podem ocorrer simultaneamente (Figura 5 e 6) (ZHANG et al. 2006).

Uma única enzima do complexo celulásico não é capaz de hidrolisar a celulose eficientemente, sendo necessária a complementação e ação sinérgica do complexo celulolítico e da  $\beta$ -glicosidase, aumentando o seu rendimento (ANDRIÉ et

al. 2010). A sinergia durante o processo de hidrólise ocorre primeiramente com as endoglicanases atuando randomicamente nas regiões amorfas da fibra, o que produz uma mudança rápida no grau de polimerização, e disponibiliza terminais redutores e não redutores para a atuação das celobiohidrolases, estas liberam celobiose que é substrato para a  $\beta$ -glicosidase (BON et al. 2008).

De acordo com a classificação de Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) (<http://www.cazy.org>), as celulases são classificadas dentro da família das glicosil hidrolases, sendo caracterizadas como um vasto grupo de enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas entre polímeros de glicose ou entre uma glicose e outra molécula não polissacarídica. Esta classificação é baseada em seus substratos específicos e ocasionalmente em seus mecanismos de ação, é também baseada na similaridade das seqüências de aminoácidos visto que existe uma relação direta de similaridade entre as seqüências.

Cerca de 125 famílias de glicosil hidrolases são conhecidas e na maioria dos casos possuem como mecanismo de ação a hidrólise da ligação glicosídica catalisada por dois resíduos de aminoácidos da enzima: um ácido geral e um nucleófilo. Dependendo da posição espacial desses resíduos catalíticos, a hidrólise ocorre através da retenção total ou inversão geral da configuração anomérica. Em uma visão estrutural, glicosil hidrolases da família 1 são enzimas que enovelam dentro de uma estrutura em barril  $(\alpha/\beta)_8$  (Figura 5) e agem com um mecanismo de  $\beta$ -retenção usando glutamato (Glu/E) como nucleófilo catalítico. Glicosil hidrolases da família 3, com somente poucas estruturas resolvidas, exploram um resíduo de aspartato (Asp/D) no ataque nucleofílico durante a atividade enzimática (JENG et al. 2011).

As celulases diferenciam-se das outras glicosil hidrolases por hidrolisarem ligações  $\beta$ -1,4 entre resíduos de glicose. A hidrólise da celulose resultando em monômeros de glicose é realizada por sistemas enzimáticos que geralmente incluem três tipos de enzimas que diferem com base no modo de catálise da celulose, mas agem sinergisticamente: endo-1,4- $\beta$ -glicanase, exo-1,4- $\beta$ -glicanase ou celobiohidrolase, e celobiase ou  $\beta$ -glicosidase (Figura 5).

CBH1, CBH2, e EG2 são os três principais componentes do sistema celulásico de *T. reesei* representando de 20 – 60% das proteínas totais celulásicas. As preparações de celulases são reconstituídas a partir de seus componentes purificados, em proporções que exibem atividades específicas equivalentes para as preparações não fracionadas. A estrutura de CBH1, CBH2, e EG1, EG2 caracteriza-

se por um domínio catalítico e um domínio ligante de celulose (CBM do inglês *cellulose-binding domains*), os quais são conectados por um ligante peptídico glicosilado.

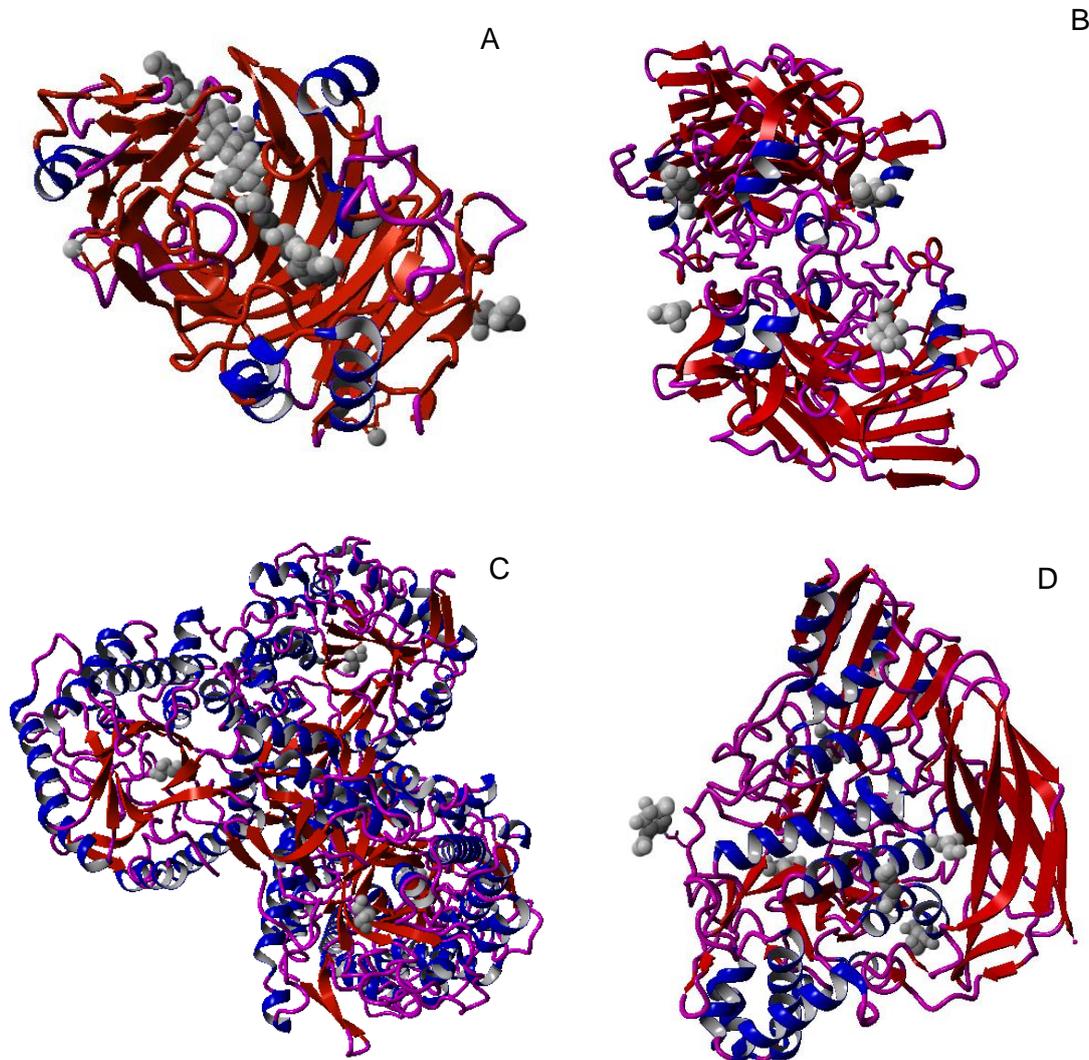


Figura 5 Celulasas de *T. reesei*. (A) CBH1 (celobiohidrolase 1, PDB:7CEL), (B) EG1 (endoglicanase 1, PDB:1EG1), (C) Bgl2 ( $\beta$ -glicosidase 2, PDB:3AHY), (D) Bgl1 ( $\beta$ -glicosidase 1, PDB:3ZYZ). Estruturas secundárias de  $\alpha$ -hélice em azul,  $\beta$ -pregueada em vermelho, e alças em rosa, estruturas dos ligantes de reconhecimento dos resíduos do sítio ativo em cinza (Estruturas geradas usando o software YASARA versão 12.8.26)

As estruturas do domínio catalítico de CBH1 e CBH2 são inteiramente diferentes, porém ambas caracterizam-se por possuírem estruturas em túnel formadas por pontes dissulfeto. CBH2 possui uma estrutura do tipo  $\alpha/\beta$ -barril ('TIM barrel') e CBH1 possui uma estrutura  $\beta$ -sanduíche com quatro alças formando um túnel em sua superfície (Figura 5).

A topologia em formato de túnel de CBH1 e CBH2 permite a interpretação estrutural da progressiva ação de exoglucanases. EG1 e CBH1 tem uma significativa homologia, cerca de 45% de identidade. O local do sítio ativo de EG1 é um sulco em vez de um túnel permitindo que cadeias de glicana possam ser clivadas randomicamente para a obtenção de duas curtas cadeias. Os sítios catalíticos de ambas celobiohidrolases estão na superfície do túnel, assim ligações  $\beta$ -glicosídicas são clivadas por mecanismos de retenção em CBH1, ou mecanismo de inversão, no caso de CBH2. As celobiohidrolases de *T. reesei* podem clivar várias ligações após um simples evento de adsorção antes da dissociação do complexo enzimático (ZHANG; LYND, 2004).

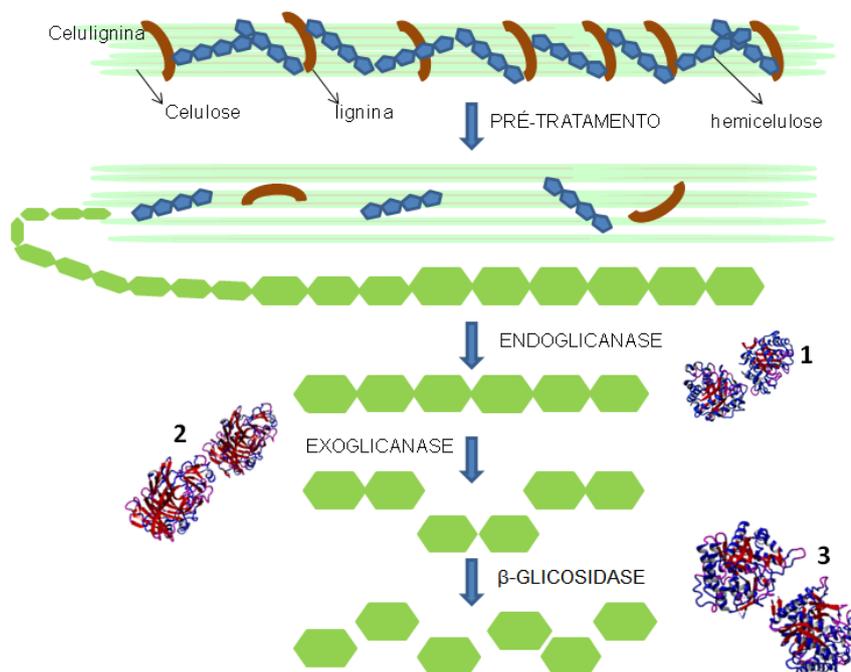


Figura 6 Sinergismo (clivagem randômica) das celulases em uma formulação enzimática durante a hidrólise celulásica. (1) Endocelulase de *Thermobifida fusca*. (2) exo-celulase/celobiohidrolase de *Hypocrea jecorina*. (3)  $\beta$ -glicosidase de *Thermotoga maritima*.

Estas classes de celulases, as quais podem ser divididas em endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidases, podem conter um número variado de celulases dentro de uma mesma classe, e vários microrganismos de diferentes gêneros podem produzir números diferentes de enzimas dentro de uma mesma classe de celulases. Como por exemplo, *T. reesei* produz duas  $\beta$ -glicosidases, enquanto *A. niger* produz acima de quatro  $\beta$ -glicosidases. Vale lembrar que essas celulases podem ser

misturadas como um coquetel, para alcançar uma eficiência na hidrólise de biomassa, como é o caso da Figura 6, em que diferentes celulasas foram misturadas em uma formulação (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011).

As celulasas podem ser produzidas por diversos tipos de organismos e microrganismos. Porém, entre os microrganismos, os mais eficientes para a sua produção são os fungos filamentosos, os quais são de fácil crescimento em qualquer meio de cultura, inclusive em meios de cultura contendo resíduos sólidos. Entre os fungos mais correntemente utilizados para a produção de celulasas estão os dos gêneros: *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Humicola* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cephalosporium acremonium*, *Mucor miehe*, *Chalara* sp., (HOWARD et al. 2003; EVELEIGH et al. 2009; BENOLIEL et al. 2010, RUEGGER et al. 2004).

Um das maneiras de aumentar a atividade das enzimas celulásicas é realizando a mutação em fungos. Isolados de *Trichoderma* são frequentemente reportados sofrendo mutações para a melhoria da excreção e atividade das celulasas (SEIDL et al. 2008). O isolado padrão, *Trichoderma reesei* RUT C30, o mais pesquisado e usado em experimentos comparativos de atividades celulásicas, foi reportado com uma maior atividade de secreção de enzimas após ser submetido ao tratamento que gerou mutação com *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NG) por 6 horas seguidas, e por irradiação UV. Sucessivos mutantes mostraram aumento na produção de celulasas, com um rápido e maior clareamento do meio de cultura durante o crescimento em placas contendo avicel (celulose microcristalina) (JUN et al. 2009). Porém, um dos problemas da mutação aleatória é a perda da característica adquirida com sucessivas gerações. Assim, a inserção dos genes em regiões específicas de cromossomos, pela tecnologia do DNA recombinante, seria uma maneira segura de manter essas características. Desde o surgimento desta técnica, os fungos filamentosos vêm demonstrando diversas vantagens sobre as bactérias e leveduras na expressão de proteínas heterólogas, destacando-se a elevada capacidade de secreção e produção, e de realizar modificações pós-traducionais como a glicosilação e a formação de pontes dissulfeto. Com a relativa facilidade de obtenção de recombinantes mitoticamente estáveis, estes fungos podem ser utilizados em cruzamentos controlados (BON et al. 2008).

É reconhecido que a maior produção do complexo de celulase é realizada por fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*, fungos celulolíticos que possuem

celulases comercializadas, e também as mais pesquisadas. Estas celulases industriais de *T. reesei* e *A. niger*, são exaustivamente estudadas com relação aos inibidores da hidrólise celulásica, tal como glicose e celobiose, bem como, quanto ao impacto dos diferentes tratamentos, de temperatura e inibidores gerados pelos pré-tratamentos e condições de reações enzimáticas (ANDRIÉ et al. 2010; FUGITA et al. 2004).

O fator principal de custo da produção do etanol de segunda geração é encontrado nas enzimas celulases. Vários estudos estão sendo realizados para reduzir os seus custos, entre eles o isolamento de novos fungos celulolíticos com alta atividade celulásica, bem como a melhoria das cepas, usando a genética e tecnologia de DNA recombinante, a engenharia enzimática, misturas de celulases, melhoria dos fatores de produção, e mudanças operacionais tais como, a escolha do substrato, pH e temperatura, as condições de cultivo, a reciclagem de enzimas e desenho de novos processos (EVELEIGH et al. 2009; HOWARD et al. 2003; CARERE et al. 2008; MTUI, 2009; ZHANG et al. 2006).

No que tange à produção das celulases, são utilizadas atualmente dois tipos de fermentações: a fermentação submersa e a fermentação estado semi-sólido e sólido que utiliza resíduos sólidos. A produção das celulases é realizada em bioreatores, com condições de operação adequadas e esterilizadas, tais como temperatura, pH, agitação e fluxo de ar (JUHÁSZ et al. 2004; AHAMED; VERMETTE, 2010). As celulases comerciais são produzidas em processos de fermentação submersa, e são preparações brutas, em que a enzima foi apenas concentrada e misturada com estabilizantes após a produção em bioreatores submersos. As operações que se seguem ao processo fermentativo, o processo de 'downstream', da produção comercial, é custoso e consiste da concentração das enzimas e de sua purificação ou não. O grau de pureza das enzimas comerciais varia de preparações enzimáticas purificadas a preparações enzimáticas brutas em que são removidos os interferentes (BON et al. 2008). Os meios de cultura para a produção são variados, utilizando-se meios de cultura adequados para cada tipo de microrganismos, contendo sais minerais necessários para o crescimento, podendo ou não utilizar indutores para a produção de celulase. A fermentação submersa para a produção de celulases, ainda é custosa em termos de produção enzimática e de equipamentos para a produção comercial, com muito gasto de água e de energia. Assim novos processos para a produção de celulases, como por exemplo, a utilização de resíduos lignocelulósicos

para a fermentação sólida e semi-sólida, estão em fase de pesquisa para diminuir os custos da produção (LIU et al. 2011; JUN et al. 2009).

Embora a expressão heteróloga das celulasas em isolados industriais de *Trichoderma* e *Aspergillus*, tenha sido um sucesso, o rendimento raramente atinge o nível de um grama por litro. Estudos de biologia molecular e de processos utilizando-se de fermentação semi-sólida devem aumentar a secreção dessas celulasas heterólogas, visto que este processo apresenta um rendimento significativamente maior do que o de fermentação submersa (BON et al. 2008; FARINAS et al. 2008)

### 1.5 HIDRÓLISE CELULÁSICA OU SACARIFICAÇÃO

A hidrólise enzimática é uma estratégia que não produz as substâncias tóxicas e inibitórias que são geradas pelos processos industriais convencionais, tais como hidrólise química (hidrólise ácida ou alcalina), além de minimizar a inibição da fermentação. A hidrólise enzimática caracteriza-se por ser uma tecnologia limpa, apesar de ser um processo custoso, já que o mesmo utiliza uma grande quantidade de água, de energia térmica e de enzimas (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011).

A sacarificação é o processo utilizado para a conversão da biomassa lignocelulósica a açúcares fermentescíveis. Durante o processo é utilizada a biomassa pré-tratada e o complexo celulásico em condições adequadas de temperatura e pH. Os processos atuais reportados demonstram um tempo que varia de 48 a 96 horas de hidrólise, e ainda utilizam de grandes cargas enzimáticas para obter uma quantidade suficiente de glicose (SUKUMARAN et al. 2009; XIMENES et al. 2010).

O aumento da biomassa também é capaz de aumentar a liberação dos açúcares para a fermentação, porém aumentos na concentração de biomassa acima de 7 - 10% (p/v) para a sacarificação, ainda são reportadas por decrescerem a taxa de hidrólise e por inibir a hidrólise celulásica em poucas horas, mesmo com o aumento da concentração de celulasas (GOTTSCALK et al. 2010; EVELEIGH et al. 2009). Este tipo de inibição é reportado como diferente da inibição causada por substrato e por produto formado, a causa é descrita como sendo consequência da ligação das celulasas à lignina, ou à resistência da biomassa a ser hidrolisada, ou ainda, ao efeito do tamanho das partículas (XIMENES et al. 2010). Assim, a lignina, que não foi totalmente removida das fibras de celulose pelo processo de pré-

tratamento, pode funcionar como um inibidor enzimático, fazendo a adsorção e precipitação das enzimas celulásicas (KIM et al. 2011) (Figura 7).

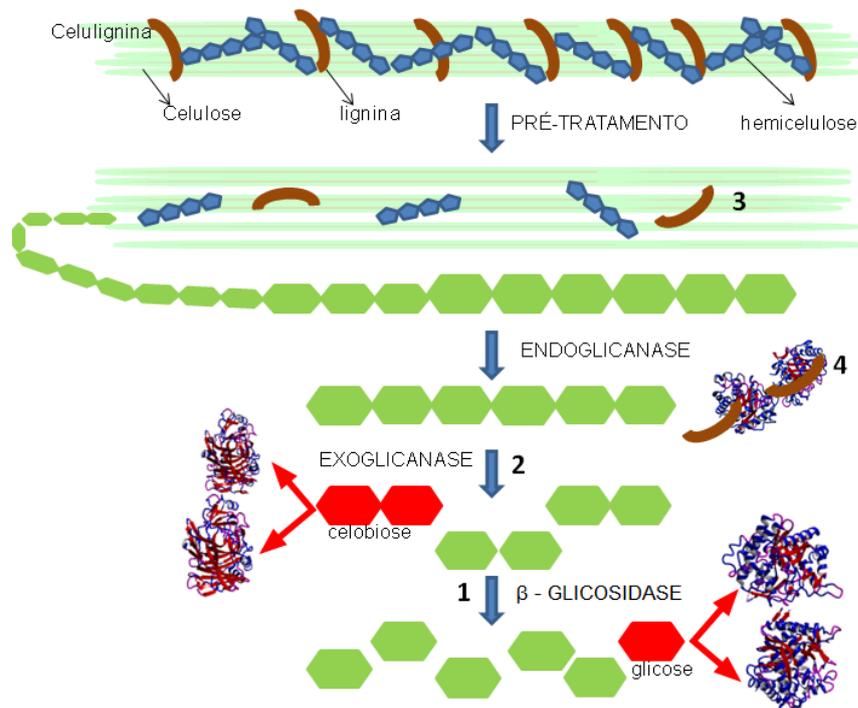


Figura 7 Hidrólise celulásica da biomassa. (1) Clivagem da celobiose pela  $\beta$  – glicosidase, e inibição da enzima pelo glicose (em vermelho). (2) Clivagem pela celobihidrolase das cadeias cristalinas e inibição da enzima pela celobiose (em vermelho). (3) Hemicelulose e lignina embebidas na matriz celulósica, vestígios do pré - tratamento. (4) Lignina liberada pela hidrólise e inibição das celulases por adsorção.

Completando a degradação da celulose à glicose, a celobiose, dissacarídeo de duas moléculas de glicose e solúvel em água, inibidor de muitas celulases, é hidrolisado em duas moléculas de glicose pela enzima  $\beta$ -glicosidase (celobiase). O nível de atividade da  $\beta$ -glicosidase nas preparações de celulases durante a hidrólise é crítico, não apenas para evitar a inibição das celulases, como também para finalizar a degradação completa da celulose em glicose, extremamente fundamental para a produção do etanol de biomassa (BON et al. 2008; ZHANG et al. 2006). Existem dois tipos de sacarificações enzimáticas: a Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF do inglês *Separated Hydrolysis and Fermentation*), em que a hidrólise ocorre isoladamente da fermentação, e onde pode ocorrer inibição por produto formado; separadamente os carboidratos solúveis são fermentados. E a

Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF do inglês *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), diferentemente da SHF, a biomassa com as enzimas e a levedura são colocadas em contato para que a fermentação e sacarificação ocorram simultaneamente; neste processo a levedura converte a glicose a etanol, retirando desta maneira a inibição da  $\beta$ -glicosidase por glicose, aumentando a atividade das enzimas celulásicas e a hidrólise. Ainda, outro processo almejado é o CBP (Bioprocesso Consolidado), em que um único microrganismo seria utilizado como catalisador biológico, produzindo as celulases e excretando-as durante a sacarificação e fermentação da biomassa celulósica (Figura 1) (WILSON, 2009). As celulases usadas para estes processos são principalmente comerciais, designadas como “celulases industriais padrões” de *T. reesei* e *A. niger*, derivadas de fungos desenvolvidos para a utilização na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Embora um considerável esforço seja realizado para aperfeiçoar as propriedades de hidrólise das celulases, os processos e estas enzimas permanecem ineficientes. Visto que a casca de coco possui maior concentração de lignina do que o bagaço da cana-de-açúcar (CORRADINI, 2009; ANDRIÉ et al. 2010; SÁNCHEZ, 2009), espera-se que fungos específicos isolados dos resíduos da casca de coco possuam uma maior atividade celulásica, aumentando assim a hidrólise do substrato. A produção de celulases e a sua utilização em hidrólise de biomassa permanece custosa, assim o isolamento de fungos com alta atividade celulásica poderia resolver este problema. Os estudos realizados para resolver os gargalos não são suficientes, tanto no que tange à produção de enzimas quanto ao que se refere às suas atividades celulásicas para a utilização durante a hidrólise de biomassa. Apesar da existência do melhoramento de microrganismos, ou de processos com diferentes substratos, ou modificação das enzimas por engenharia de proteínas, novas opções de melhoramento fazem-se necessárias. Outra opção é a utilização da HHP, a qual se destaca como uma ferramenta energeticamente econômica e eficiente. Assim, visto os efeitos já reportados da HHP tanto em polímeros de celulose quanto no aumento da atividade celulásica e na produção de etanol, foi proposto utilizar a HHP para aumentar a hidrólise celulásica de resíduos da casca de coco, utilizando-se tanto de celulases de fungos específicos quanto de celulases comerciais.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da alta pressão hidrostática nas celulases comerciais, nas celulases de isolados fúngicos e no substrato, para fins de aumento da hidrólise dos resíduos da casca de coco. Identificar o envolvimento das  $\beta$ -glicosidases no mecanismo de aumento das atividades celulásicas em condições de alta pressão hidrostática, assim como possíveis sequências polipeptídicas envolvidas neste aumento utilizando bioinformática.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos a partir da casca de coco verde;
- Selecionar fungos lignocelulolíticos com atividades celulásicas e fenoxidásicas;
- Comparar as atividades celulásicas dos isolados da casca de coco com as de *T.reesei* RUT C30 e de *A. niger* (celulásica total ou FPase, endoglicanásica e  $\beta$ -glicosidásica) e selecionar altas atividades celulásicas;
- Identificar os fungos isolados por análise morfológica e molecular;
- Selecionar o melhor valor de alta pressão hidrostática para o aumento da atividade celulásica, mais especificamente de atividades  $\beta$ -glicosidásicas, usando as enzimas padrões da indústria e enzimas dos fungos isolados;
- Utilizar bioinformática para analisar sequências e estruturas polipeptídicas, a fim de obter sequências relacionadas com a mudança conformacional e aumento da atividade;
- Realizar o pré-tratamento dos resíduos da casca de coco para posterior hidrólise celulásica;
- Estudar o efeito da HHP nas fibras da casca de coco, nas celulases e na hidrólise celulásica, assim como o seu mecanismo de hidrólise;
- Realizar a sacarificação celulásica dos resíduos da casca de coco utilizando HHP;
- Propor um possível mecanismo para o aumento da hidrólise celulásica da casca de coco em condições de alta pressão hidrostática.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia aplicada para o aumento da hidrólise da casca de coco em condições de alta pressão hidrostática utilizou de duas abordagens:

1 - Isolamento de fungos da casca de coco e análise das atividades das suas celulasas em condições de pressão atmosférica e de alta pressão hidrostática (Figura 8);

2 - Deslignificação da casca de coco e estudo do processo de hidrólise celulásica das suas fibras em condições de alta pressão hidrostática (Figura 9).

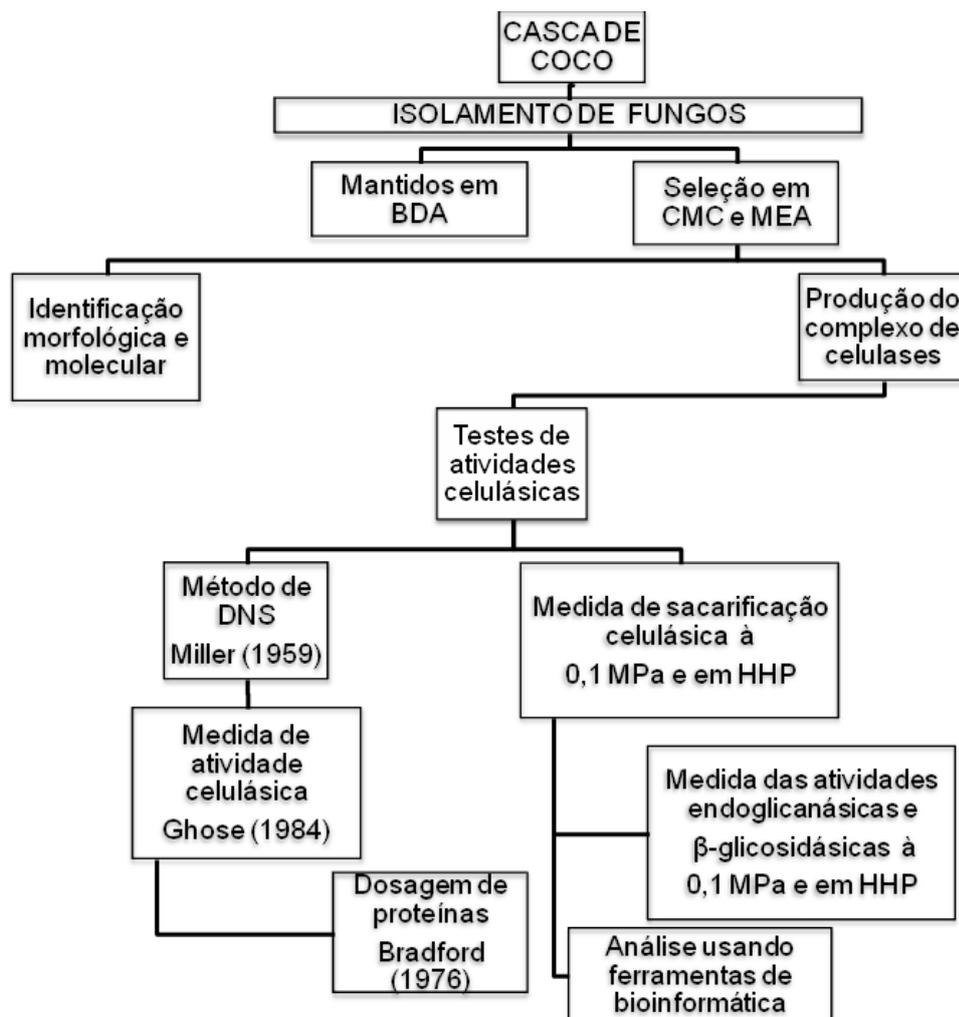


Figura 8 Fluxograma da abordagem 1: Isolamento de fungos da casca de coco e medida das atividades das suas celulasas em condições de pressão atmosférica e de alta pressão hidrostática.

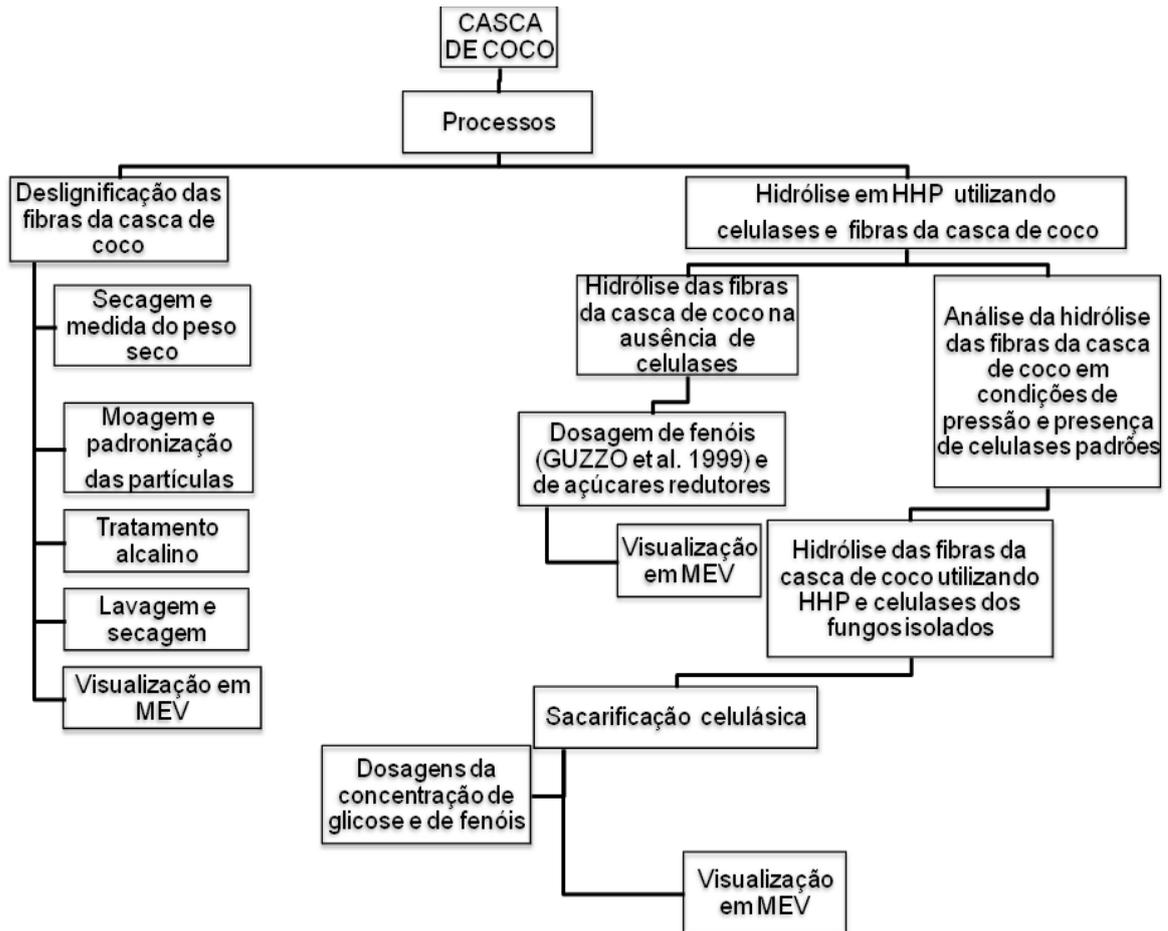


Figura 9 Fluxograma da abordagem 2: Designificação da casca de coco e estudo do processo de hidrólise celulásica de suas fibras em condições de alta pressão hidrostática.

### 3.1 FUNGOS E ENZIMAS PADRÕES

Os fungos *A. niger* e *T. reesei* RUT C30, foram crescidos em meio de cultura BDA (batata dextrose agar; Acumedia Manufactures, Inc. Lansing, Michigan, EUA) a 28 °C, e utilizados como padrões de comparação nos ensaios enzimáticos. As culturas de todos os fungos adquiridos e isolados neste trabalho foram estocadas e mantidas em meio de cultura BDA a 4 °C, sendo renovadas periodicamente. As enzimas comerciais utilizadas neste estudo foram celulases de *T. reesei* 26921 (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) e  $\beta$  - glicosidase de *A. niger* (Novozyme 188/Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA).

## 3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DOS FUNGOS

### 3.2.1 *Coleta das amostras*

As amostras de cascas de coco verdes foram amostras não decompostas obtidas de frutos de coco aparentemente saudáveis para o isolamento de endofíticos, coletados em visita técnica realizada em uma propriedade rural produtora de coco verde da variedade anã (localizada em Pedro Palácios, município de Ibirajú, distante cerca de 70 km de Vitória, capital do Espírito Santo). Esta propriedade produz coco para comercialização da água de coco verde, e gera resíduos da sua produção, descartando toneladas de casca de coco verde, as quais entram em estado de decomposição. Assim as amostras em estado avançado de decomposição também foram coletadas para isolamento de fungos decompositores, utilizando frascos esterilizados.

### 3.2.2 *Isolamento dos fungos*

Os fungos foram isolados das amostras de casca de coco verde de frutos saudáveis (endofíticos), e das amostras em decomposição (decompositor). Amostras (1,2 cm x 0,5 cm) foram lavadas em água corrente com detergente, e então desinfestadas em etanol 70% por 30 segundos e por último em hipoclorito 10% por 5 minutos. Após estes procedimentos as amostras foram lavadas 3 vezes em água destilada esterilizada e secas em papel de filtro esterilizado, em câmara de fluxo laminar. Para o controle de contaminação foi retirada uma alíquota de 100 µL da última água destilada esterilizada utilizada para lavagem e adicionada em meio BDA. As amostras de casca de coco foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA com 100 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol e incubadas a 28 °C (LIMA et al. 2001).

Após um período de 7 a 14 dias, as colônias fúngicas crescidas sobre as superfícies vegetais foram isoladas e purificadas em meio de cultura BDA (contendo 100 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol), de acordo com métodos propostos por Lima et al. (2001). Inicialmente as culturas foram armazenadas em tubos de ensaio com YEPD (20 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar) e depois de alguns meses passaram a ser mantidas em BDA.

### 3.3 SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS

A seleção dos fungos celulolíticos foi realizada utilizando o seguinte meio de cultura CMC sólido ( $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$  (3.0);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1.0);  $\text{MgSO}_4$  (0.5);  $\text{KCl}$  (0.5);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01); carboximetilcelulose – CMC (10.0) e ágar (20.0) (RUEGGER et al. 2004). Os fungos isolados foram inoculados com palitos esterilizados, em quatro posições sobre meio CMC 1%, e após 5 dias de crescimento a 28 °C, as placas foram coradas com 0.2 % de vermelho Congo durante 15 minutos, e depois lavadas com água destilada e com  $\text{NaCl}$  1M por 15 minutos. A atividade celulolítica é observada ao redor da colônia pela formação de um halo amarelado contrastando com o vermelho do corante na área não degradada (adaptado de RUEGGER et al. 2003).

A atividade lignolítica foi identificada pela reação de Bavendamm em meio sólido malte (extrato de malte:  $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $20,0 \text{ g.L}^{-1}$  de bacto ágar,  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido tânico, pH 4,5). As placas de Petri contendo os inóculos dos fungos foram incubadas a 28 °C no escuro. Após, foi observada diariamente a formação de halo amarronzado ao redor das colônias (URS et al. 2004). Os fungos selecionados também foram crescidos em meio sólido contendo fibras da casca de coco não deslignificada e sais minerais tais como o da seção 3.5.1. Os fungos foram inoculados em uma concentração inicial de  $10^7$  esporos por grama de substrato, em umidade inicial de 50 – 60%. As culturas selecionadas estão armazenadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA) com as siglas de BTF0948 e BTF0919.

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR

#### 3.4.1 Identificação morfológica

##### 3.4.1.1 Microcultivo

Microcultivos foram utilizados para a realização da identificação microscópica, assim placas de Petri foram esterilizadas contendo: papel toalha, lâminas sobre um suporte e lamínulas. Cerca de 100  $\mu\text{L}$  do meio BDA foi colocado sobre a superfície das lâminas de vidro. Após a solidificação, foram depositadas opostamente, ou em

fendas, duas gotículas da suspensão fúngica à concentração de  $10^9$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Sobre as lamínulas, com uma micropipeta, foi depositada homoganeamente uma película de BDA (temperatura menor que 40 °C), e estas foram cuidadosamente colocadas sobre as lâminas. Água destilada esterilizada foi vertida nas placas para mantê-las úmidas, e as mesmas foram vedadas. O microcultivo foi incubado a 28 °C em um período de 48 – 72 horas. Após esse período, as lâminas foram observadas em microscópio óptico e as estruturas fúngicas identificadas de acordo com a literatura. As lâminas foram coradas com azul de metileno ou fucsina (MARTINS et al. 2008).

### 3.4.2 *Identificação molecular*

#### 3.4.2.1 Crescimento da biomassa fúngica

Inóculos de 5 mm de diâmetro ('plugs') dos micélios fúngicos foram adicionados em 100 mL de meio malte (10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 4 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 g.L<sup>-1</sup> glicose de extrato de levedura) em erlenmeyers de 250 mL, e crecidos por 3 dias a 28 °C com agitação de 150-160 rpm. Após o crescimento, a biomassa foi centrifugada a 11.000 rpm, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e o micélio acondicionado em tubos falcons a 4 °C.

#### 3.4.2.2 Extração do DNA fúngico

Cerca de 50 mg de micélio fúngico congelado foi macerado com nitrogênio líquido, utilizando almofariz de porcelana previamente congelado, até o micélio virar pó. O pó foi então acondicionado em microtubos eppendorf (1,5 mL) previamente congelados. Foram adicionados 500 µL de tampão de extração (0,5% de SDS 10%; 25 mmol de EDTA 0,5 M pH 8,0 ; 200 mmol de Tris HCl 1 M pH 8,5; 250 mmol de NaCl 1 M) e a solução foi ressuspendida por agitação. Foram adicionados à mistura 350 µL de fenol equilibrado, misturando até ficar homogêneo, logo após foram adicionados 150 µL de clorofórmio e novamente misturado. A suspensão foi centrifugada por 1 hora a 1.300 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 25 µL de solução de RNase A e incubadas por 5 a 10 minutos a 37 °C. A amostra foi então extraída com um volume de clorofórmio, agitadas

suavemente, e centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado foi adicionado. A amostra foi acondicionada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 a 4 horas ou a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  de 16 a 18 horas. Após transcorrido o tempo, foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos, o máximo de líquido foi retirado com uma pipeta sem causar distúrbio no precipitado, e um spin (5 seg) para retirar o líquido remanescente. A amostra foi lavada com etanol 70%, para retirar o sal, e uma vez com etanol 95% e seca a vácuo, o pellet foi ressuspendido em 100  $\mu\text{L}$  de TE (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA) pH 8,0. Em cada poço do gel de agarose foram colocados 10  $\mu\text{L}$  da amostra e tampão de amostra (Biolabs) (gel 0,8% agarose feito com TAE 1X), e a corrida de eletroforese realizada por 2 horas em 60 Volts. O gel foi corado com brometo de etídeo  $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  seguido de fotodocumentação digitalizada em transluminador L. Pix (Lotus Biotecnologia® Molecular Imaging). A qualidade dos extratos e a quantidade de ácido nucléico foram estimadas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific Spectrophotometer). Para cada dosagem foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  da amostra (RAEDER; BROEDA, 1987).

#### 3.4.2.3 Reação em cadeia polimerase (PCR)

A reação de PCR ocorreu em tubo de reação 0,2 mL contendo 3  $\mu\text{L}$  de tampão 10X, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, 3  $\mu\text{L}$  de dNTP 2 mM, 1  $\mu\text{L}$  de primer F (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de primer R (10  $\mu\text{M}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase 5U/  $\mu\text{L}$  (kit com tampão 10X e  $\text{MgCl}_2$ ) 500U (Cenbiot/Ludwig Biotec), alíquota de 1  $\mu\text{L}$  de DNA (cerca de 20 ng) e água para completar 30  $\mu\text{L}$  de reação. A ciclagem foi com aquecimento inicial de  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, com temperatura de anelamento de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 90 segundos, e  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 90 segundos, concluindo a extensão final com  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\infty$ , em termocilador Veriti 96 well, (Thermal cycler Applied Biosystems). Os ‘amplicons’ foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em transluminador, utilizando marcador plus ladder 1kb e 100 pb, para observar uma banda de 600 pb. As regiões D1/D2 das linhagens foram amplificadas por PCR, utilizando-se os iniciadores NL1 (5’ GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3’) e NL4 (5’ GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3’). A purificação foi realizada utilizando o Kit Centrisep spin columns (Princeton separation Inc, Applied Biosystems, São Paulo, Brazil ).

#### 3.4.2.4 Preparo das amostras e sequenciamento

Com os 'amplicons' purificados seguiu-se a reação de sequenciamento, ou de marcação, usando-se: 3,2 pmol de cada primer, 8 µL de 'big dye', 5 – 20ng de 'template', água milli-Q q.s.p 20 µL. . A ciclagem foi com aquecimento inicial de 96° C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, com temperatura de anelamento de 50 °C por 15 segundos, e 60 °C por 4 minutos, concluindo a extensão final com 60 °C por 4 minutos, e 4 °C/∞, em termocilador Veriti 96 well, (Thermal cycler Applied Biosystems, EUA). As bandas de 600 pb foram analisadas em gel de agarose 0,8%, após a corrida. Os 'amplicons' foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em transluminador, para observar uma banda de 600 pb. Para a quantificação foi utilizado o marcador 'low DNA mass ladder'.

As amostras provenientes da reação de sequenciamento foram purificadas utilizando-se 40 µl de isopropanol 75% e, homogeneizadas no vortex, sendo então incubadas por 20 minutos no freezer. As amostras foram centrifugadas a 3.700 rpm durante 45 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250 µl de etanol 60%, seguiu-se com centrifugação a 3.700 g durante 15 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e a amostra colocada no evaporador rotatório por 20 minutos. As amostras foram encaminhadas para ACTGene Análises Moleculares Ltd. (*Centro de Biotecnologia*, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) e sequenciadas usando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer, usando capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems, São Paulo, Brazil).

A análise de similaridade das sequências de ácidos nucleicos geradas foi realizada usando BLAST, as sequências geradas foram analisadas contra sequências depositadas no EMBL-EBI tal como contra as do NCBI. A identificação morfológica foi realizada de acordo com Martins et al. (2008) e Houbraken et al. (2011). As árvores filogenéticas foram construídas usando alinhamento das sequências sob o programa CLUSTALW2, dentro EMBL-EBI, usando o método de clusterização de Neighbour-joining.

### 3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

#### 3.5.1 *Fermentação submersa*

Para produção de celulasas foi utilizada a fermentação submersa e assim os fungos foram crescidos a uma concentração inicial de  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup> em 100 mL de meio de cultura, em um frasco erlenmeyer de 250 mL a 28 °C, na agitação de 180 rpm por um período de 7 dias. A composição do meio de cultura usado para o crescimento fúngico e produção enzimática foi a seguinte (g.L<sup>-1</sup>): CMC (10.0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2.0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.3); CaCl<sub>2</sub> (0.3) e 1 mL de solução de elementos traços contendo: ácido cítrico (5.0); ZnSO<sub>4</sub>(5.0).7H<sub>2</sub>O; Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O (1.0); Cu SO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O (0.25); MnSO<sub>4</sub>.4 H<sub>2</sub>O (0.05); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.05); NaNO<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.05) (adaptado de DUFF et al. 1985; DAKAM et al. 1995, JUHÁSZ et al. 2004). Após 7 dias, uma alíquota do meio de cultura foi centrifugada a 10.000 g, a uma temperatura de 4 °C por 10 minutos para remoção do micélio, e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de atividades celulásicas como extrato bruto celulásico. Estes foram estocados a -10 °C (adaptado de SUKUMARAN et al. 2009).

### 3.5.2 Medida de sacarificação celulásica usando alta pressão hidrostática

O potencial de sacarificação foi quantificado usando como substrato o papel de filtro 'Whatman' n° 1 (1.2 cm x 0.2 cm) e celulasas produzidas por fermentação submersa dos fungos padrões, *T. reesei* RUT C30 e *A. niger*, individualmente e combinadas como mistura (proporção de 1:1) em tampão acetato de sódio 0.1 M pH 5.0 (2% p/v) (Eveleigh et al. 2009). Os tratamentos de alta pressão hidrostática foram realizados em diferentes valores com níveis crescentes de pressão (50, 150 e 300 MPa), as reações foram incubadas nas temperaturas de  $22 \pm 1$  °C e de  $50 \pm 1$  °C. O equipamento de alta pressão hidrostática, utilizado nos ensaios, foi anteriormente descrito por Palhano et al. (2004). A célula de alta pressão foi pré-aquecida para incubar o substrato e extratos brutos enzimáticos a  $50 \pm 1$  °C, em condições de alta pressão hidrostática. Toda bolha de ar contida na mistura reacional foi removida e a pressão hidrostática foi rapidamente aplicada usando um pistão cilíndrico de BeCu (Eureka Ltda, Minas Gerais, Brazil), e medida usando uma manômetro mecânico (Woler Ind. Brasileira, Minas Gerais, Brazil). Os diferentes tratamentos de pressão foram realizados durante 30 minutos e, após este período, a pressão foi retornada à atmosférica, e sua hidrólise medida imediatamente pelo método de Miller (1959) (adaptado de Yang et al. 2009). A atividade celulásica total foi quantificada para todos os tratamentos de pressão, foi feita uma média para

todas as atividades celulásicas dos extratos brutos celulásicos dos fungos, e o mais efetivo tratamento de pressão foi escolhido para ser aplicado aos outros métodos analíticos de atividades celulásicas.

### 3.5.3 Métodos analíticos de atividades celulásicas

Os extratos brutos celulásicos dos fungos, *T. reesei* RUT C30, *A. niger* e suas enzimas misturadas (1:1) (v/v), foram utilizadas como celulasas padrões para ensaios de atividades celulásicas, e também como padrão de comparação para as medidas de atividades das celulasas produzidas pelos fungos selecionados da casca de coco verde.

O ensaio de papel de filtro foi utilizado para estimar a atividade celulásica total e o ensaio de carboximetilcelulase para estimar a atividade endoglicanásica dos extratos brutos celulásicos. As atividades celulásicas totais e as endoglicanásicas foram ensaiadas por incubação do extrato celulásico bruto com o substratos de papel de filtro 'Whatman' n° 1 (1.2 cm x 0.2 cm) e o substrato de carboximetilcelulose 1% (Sigma, St. Louis, USA), respectivamente, em tampão acetato de sódio 0.1 M pH 5.0 (2% w/v) a  $50 \pm 1$  °C por 30 minutos (EVELEIGH et al. 2009). Os açúcares redutores foram dosados usando DNS (ácido 2,4-dinitrosalicílico/Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), método de Miller (1959), e quantificados usando uma curva padrão de glicose. A leitura, realizada em espectrofotômetro, a 540 nm (foi conduzida em aparelho de marca Thermo Spectronic, modelo BIOMATE 3).

A atividade  $\beta$ -glicosidásica foi determinada de acordo com o método de Ghose (1987). O extrato celulásico bruto foi incubado com o substrato celobiose 0.5 % (Sigma, St. Louis, USA) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.0 a 50 °C durante 30 minutos. A glicose liberada foi quantificada usando o kit de glicose oxidase (Glucox 500 kit, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Brazil). A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto por mL, e foi expressa como atividade específica (unidades por miligrama de enzima). Todas as reações foram realizadas com um volume na proporção de (1:1) (extrato bruto celulásico: tampão). As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1985), usando albumina como padrão. Amostras do extrato bruto enzimático (100  $\mu$ l) foram

adicionadas a 5 mL de reagente de Bradford e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, antes de serem lidas a 595 nm (BRADFORD, 1985).

#### 3.5.4 Precipitação das celulases dos extratos brutos enzimáticos e ensaios celulásicos

Os extratos brutos celulásicos, de todos os fungos, foram precipitados pela adição de 4 volumes de acetona para 2 volumes de amostra, para a remoção de açúcares redutores, os quais interferem com a atividade celulásica total. Após a adição da acetona, a solução foi levemente misturada e então centrifugada a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. Logo, o sobrenadante foi descartado, e os precipitados obtidos foram ressuspensos em tampão acetato de sódio 0,1 M (para a realização das atividades celulásicas totais) ou em 50 mM (para a realização de atividades  $\beta$ -glicosidásicas), ambos em pH 5,0 (GHOSE, 1987). As atividades celulásicas totais e  $\beta$ -glicosidásicas foram realizadas. Celulases comerciais de *T. reesei* 26921 e  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* (Novozymes 188) foram diluídas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5, até a obtenção da ausência de glicose na solução enzimática. As atividades  $\beta$ -glicosidásicas, das amostras de celulases precipitadas e das comerciais diluídas em tampão, foram realizadas na presença de diferentes concentrações de glicose (1,2; 10; 20 e 30 mg.mL<sup>-1</sup>).

### 3.6 APLICAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CASCA DE COCO

#### 3.6.1 Remoção da lignina (pré – tratamento)

Cascas de coco foram obtidas *in natura* dos campos de produção e dos comerciantes de água de coco, na cidade de Vitória no estado do Espírito Santo/Brasil, e estocadas a -10 °C. As cascas foram lavadas fortemente em água destilada para remoção de resíduos, e secas primeiramente ao sol antes de serem secas em estufa a uma temperatura de 80 – 82 °C até atingirem um peso constante, em um período de 24 horas. Após a secagem, foram moídas em moinho de disco vibratório por cerca de 5 minutos (adaptado de SILVA et al. 2010). As fibras da casca de coco obtidas tiveram suas partículas padronizadas em uma peneira 40 –

mesh com aberturas de 0,42 mm. Para a deslignificação, as fibras foram misturadas em uma solução de NaOH 2,5 M, e a solução resultante foi colocada em agitação de 150 -160 rpm a 28 °C em shaker por 30 minutos. Após este período em shaker, a solução alcalina foi autoclavada por 30 minutos. O produto resultante da saponificação, após ser esfriado, foi lavado com água, utilizando funil de Büchner, até atingir um pH neutro. As fibras deslignificadas foram secas em estufa, a uma temperatura de 80 – 82 °C, até atingir um peso constante (adaptado de SUKUMARAN et al. 2009).

### 3.6.2 *Dosagens de polifenóis*

Para este ensaio, foram utilizadas amostras das fibras tratadas, oriundas do tratamento de deslignificação anteriormente descritos. A análise do conteúdo de fenóis totais foi realizada usando metanol 70% como agente de extração e Folin-Ciocalteu para a quantificação de polifenóis. Primeiramente, a 300 mg das fibras de coco de cada amostra foram adicionados 4 mL de metanol 70% e deixados em repouso por 1,5 hora, com três agitações em intervalos de tempos iguais. Logo após, o material foi centrifugado a 11.000 g por 15 minutos. A 150 µL do sobrenadante foram adicionados 3 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 2% m/v em tubo de ensaio com capacidade para 10 mL. Homogeneizou-se, deixando o sistema em repouso, por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água ultrapura, na proporção de 1:1 v/v; e aguardados 20 minutos (GUZZO et al. 1999). O branco foi feito substituindo 150 µL do sobrenadante do metanol por água destilada. Algumas dosagens, como as de sobrenadantes resultantes de hidrólise, foram realizadas sem extração com metanol. Para isso, sabendo-se que proteínas também reagem com reagente Folin–Ciocalteu, a absorbância nos primeiros segundos antes da hidrólise foi medida, logo após a centrifugação. Esta absorbância foi subtraída da absorbância final, após a hidrólise, para calcular a quantidade de fenóis no sobrenadante hidrolisado (modificado de CAO et al. 2011; KIM et al. 2011). A leitura, realizada em espectrofotômetro, a 750 nm foi conduzida em aparelho de marca Thermo Spectronic, modelo BIOMATE 3. A curva de calibração foi construída com solução-padrão de ácido clorogênico.

### 3.6.3 Desenho experimental para estudo do efeito da alta pressão hidrostática nas fibras da casca de coco e nas celulases

Foram estudados cinco diferentes tratamentos combinados. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os métodos analíticos para medida de atividade celulásica total (item 3.5.3). Foram utilizados os extratos brutos celulásicos produzidas em fermentação submersa, dos fungos padrões *T. reesei* RUT C30 e *A. niger*, e também a mistura de suas celulases combinadas em proporção de volume de 1:1 (v/v).

1. As fibras da casca de coco moídas e deslignificadas, não pressurizadas, foram incubadas com os extratos brutos celulásicos não pressurizados, em pressão atmosférica, na temperatura de  $50 \pm 1$  °C por 30 minutos.
2. As fibras da casca de coco moídas e deslignificadas foram tratadas separadamente, em alta pressão hidrostática, por 30 minutos, sendo subsequentemente incubadas com os extratos brutos celulásicos não pressurizados, em pressão atmosférica, na temperatura de  $50 \pm 1$  °C por 30 minutos.
3. Os extratos brutos celulásicos foram tratados separadamente, em alta pressão hidrostática por 30 minutos, sendo subsequentemente incubados com as fibras da casca de coco deslignificadas em pressão atmosférica a uma temperatura de  $50 \pm 1$  °C por 30 minutos.
4. As fibras da casca de coco moídas e deslignificadas foram incubadas juntamente com os extratos brutos celulásicos, em alta pressão hidrostática, na temperatura de  $22 \pm 1$  °C por 30 minutos.
5. As fibras da casca de coco moídas e deslignificadas foram incubadas juntamente com os extratos brutos celulásicos, em alta pressão hidrostática, na temperatura de  $50 \pm 1$  °C por 30 minutos.

A hidrólise das fibras da casca de coco deslignificadas, na ausência dos extratos brutos celulásicos, foi analisada em condições de alta pressão hidrostática. Assim, somente fibras da casca de coco deslignificadas (2% p/v) foram submetidas à alta pressão por 30 minutos, sendo realizadas subsequentemente as dosagens de açúcares redutores totais e de compostos fenólicos. Estas dosagens foram comparadas com as das fibras deslignificadas não pressurizadas (2% p/v).

#### 3.6.4 Hidrólise celulásica das fibras da casca de coco utilizando pressão hidrostática e celulases dos fungos isolados

As fibras da casca de coco moídas e deslignificadas foram incubadas com o extrato bruto celulásico dos fungos isolados (2% p/v), em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. A reação de hidrólise foi realizada durante 30 minutos a uma temperatura de  $50 \pm 1$  °C, sendo incubada em condições de HHP e à pressão atmosférica (controle). Decorridos os 30 minutos, a solução reacional foi rapidamente retirada das condições estabelecidas acima, e a quantidade de açúcar redutor liberada foi dosada conforme método analítico do item 3.5.3. A taxa de hidrólise foi calculada como a quantidade de enzima necessária, em miligramas, para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor.min.  $\text{mL}^{-1}$ , e a atividade expressa como atividade específica.

#### 3.6.5 Sacarificação enzimática utilizando alta pressão hidrostática

Para o processo de sacarificação enzimática, foram utilizadas celulases comerciais, que possuem uma maior concentração de enzimas e pureza em sua formulação do que os extratos brutos celulásicos da fermentação submersa produzidos neste trabalho.

Celulases de *T. reesei* 26921 e  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* (Novozymes 188) foram diluídas 100 vezes, separadamente, em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e após a diluição foram misturadas (1:1). A atividade celulásica total da mistura diluída (celulase de *T. reesei* 26921 e  $\beta$  – glicosidase de *A. niger*) foi quantificada (FPU. $\text{mL}^{-1}$ ), e a carga enzimática calculada por grama de substrato.

A sacarificação enzimática foi realizada durante um período de 96 horas usando uma carga enzimática de 7,5 FPU por grama de fibra da casca de coco moída deslignificada (2% p/v), em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 (2% p/v) a  $50 \pm 1$  °C. Foram testadas as seguintes condições: pressão atmosférica sem agitação, pressão atmosférica com agitação de 150 - 160 rpm e HHP. A glicose liberada foi quantificada usando o kit de glicose oxidase (Glucox 500 kit, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Brazil).

O mesmo procedimento foi repetido para as celulases precipitadas dos fungos isolados da casca de coco, as quais foram concentradas até 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  de proteínas,

por precipitação com acetona e incubadas nas condições citadas acima.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (Prism versão 5.0 e Origin 7.0 software, OriginLab Corporation, Northampton, EUA), os experimentos foram realizados em triplicata, com três repetições experimentais.

### 3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS FIBRAS DA CASCA DE COCO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Foram analisadas amostras das fibras de casca de coco deslignificadas e não deslignificadas, assim como também as submetidas por um período de 30 minutos à alta pressão hidrostática na ausência de celulasas e, aquelas submetidas à alta pressão hidrostática por um de 72 horas na presença e na ausência de celulasas. As medidas de comprimento e largura das fibras também foram realizadas no MEV.

As amostras secas foram metalizadas com uma camada fina de ouro. As superfícies das amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura. No MEV, a imagem é, ponto a ponto, formada na interação do feixe de elétrons com a amostra metalizada, durante a passagem do feixe de elétrons pela superfície da amostra, com voltagem de aceleração do feixe de elétrons de 10 kV. O aparelho utilizado foi o Scanning Electron Microscope, Fabricante: JEOL/Modelo: JSM 6610 LV.

### 3.9 ANÁLISE EM HPLC

As análises em HPLC ('High Performance Liquid Chromatograph') foram realizadas no 'Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology' (KU Leuven, Bélgica). As análises de ácido ferúlico e vanilina por HPLC foram realizadas de acordo com método proposto por Cogne et al. (2004). As fibras da casca de coco foram solubilizadas em tampão juntamente com as celulasas (2% p/v), centrifugado a 11.000 g por 5 minutos, e o sobrenadante foi dosado antes da realização da hidrólise. A fase móvel (1,5L) foi H<sub>2</sub>O /CH<sub>3</sub>OH /H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (640:350:10) (v/v), em

voltagem de 900mV, aparelho acoplado a um detector eletroquímico, a coluna utilizada foi Nucleosyl C18 100-10 (Machery Nagel) em uma taxa de fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, com injeção automática da amostra de 40 µL.

### 3.10 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

A análise das sequências das celulasas foi realizada utilizando ferramentas de bioinformática. O Server MRS (<http://mrs.cmbi.ru.nl>) foi utilizado para a busca das sequências e estruturas usando bancos de dados tais como PDB, TrEMBL, Uniprot e Swissprot, dentro do próprio server exclusivo para proteínas. Para a análise de similaridade das celulasas foi utilizado o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). As sequências das celulasas foram escolhidas a partir do seu PDB mais relevante considerado pelo Server, e as sequências consideradas similares a este PDB foram encontradas utilizando o BLAST no Server MRS. O múltiplo alinhamento das sequências foi realizado utilizando CLUSTALW2 no banco de dados do EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>). O alinhamento das estruturas, a análise dos aminoácidos e das sequências polipeptídicas foi realizada utilizando-se os programas YASARA versão 12.8.26 e WHAT IF. PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) foi utilizado para a análise e busca de motivos ou padrões protéicos significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS

Dos 40 fungos filamentosos isolados, foram selecionados dois fungos (um endofítico\*<sup>1</sup> e outro decompositor\*<sup>2</sup>, Tabela 1), apresentando maiores halos de degradação em CMC 1% do que o fungo padrão *A. niger* (Figura 10). Além das características apresentadas em CMC, estes fungos foram os únicos que apresentaram atividade lignolítica em placa (BTF0919\*<sup>1</sup> e BFT0948\*<sup>2</sup>) (Figura 10).

Tabela 1 Fungos isolados da casca de coco e selecionados pelo maior halo em meio CMC.

Fungo	Origem	Gênero/Espécie
BTF0919* <sup>1</sup> Endofítico	Casca de coco verde, fruto sadio (da indústria de envazamento de água de coco)	<i>Penicillium variable</i>
BTF0948* <sup>2</sup> decompositor	Casca de coco em decomposição (da indústria de envazamento de água de coco)	<i>Trichoderma</i> sp

Fungos decompositores e endofíticos isolados da casca de coco verde, com atividade celulolíticas e lignolíticas, não foram encontrados reportados na literatura até o momento. Fungos endofíticos isolados de sementes oleaginosas como amêndoas de coco, relatados como sendo dos gêneros *Penicillium* e *Trichoderma* foram reportados apresentando atividade lipolítica, proteolítica, amilolítica e celulolítica (VENKATESAGOWDA et al. 2012) .

Fungos decompositores são bem conhecidos por suas atividades lignocelulolíticas, principalmente os do gênero *Trichoderma* (RUEGGER et al. 2004; SCHUSTER; SCHMOLL. 2010). Porém, pouco se conhece sobre as atividades lignocelulolíticas de fungos endofíticos, já que estes não causam danos às plantas e possuem uma relação mutualística com as plantas hospedeiras, recebendo nutrientes e proteção. A maioria dos estudos relatados com endofíticos esta correlacionada com a produção de metabólitos secundários tornando a planta mais competitiva ao ambiente de estresse (SCHULZ et al. 2002).

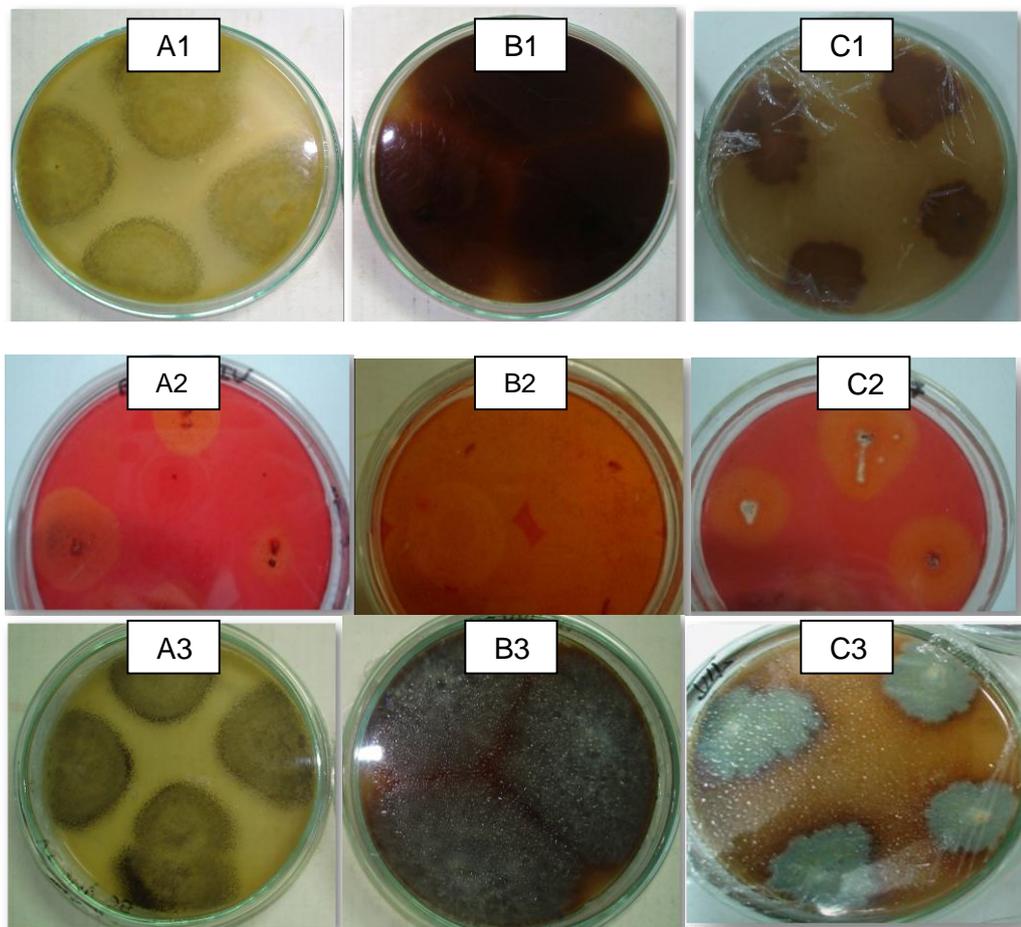


Figura 10 Atividades lignocelulolíticas em placas de Petri. (A) *A. niger*. (B) *Trichoderma* sp (BTF0948) (decompositor). (C) *P. variable* (BTF0919) (endofítico). (1 e 3) Atividades lignolíticas (reações de Bavendamm), o escurecimento do meio demonstrou a atividade de fenoloxidasas, principalmente lacase. (2) Atividade celulolítica, o maior halo demonstrou a maior degradação da CMC.

Porém, quando a planta se encontra em condições adversas, o endófito tornar-se patógeno ou saprófita, e manifesta seu potencial decompositor. Para colonizar os tecidos vegetais, estes são capazes de produzir enzimas, liberando lignases e celulasas que quebram a parede celular dos vegetais (SCHULZ et al. 2002). *Monotospora* sp, *Fusicoccum* sp e *Periconia* sp são alguns dos fungos endofíticos relatados por produzir celulasas e ligninases (WANG et al. 2006; KANOKRATANA et al. 2008; HARNPICHARNCHAI et al. 2009). Alguns genes destes fungos expressando CBH (celobiohidrolases) e Bgl ( $\beta$ -glicosidase) foram inseridos em *Pichia pastoris* (KANOKRATANA et al. 2008; HARNPICHARNCHAI et

al. 2009) e após a expressão destes genes, esta levedura demonstrou uma alta atividade celulásica para aplicação biotecnológica, principalmente, no que se refere à produção do etanol de segunda geração.

Os poucos relatos a cerca das atividades lignocelulolíticas de alguns fungos endofíticos com demasiada importância demonstra a necessidade de mais estudos relacionados. Os dois fungos selecionados foram crescidos em meio sólido contendo fibras da casca de coco moída não designificadas e sais minerais (Figura 11).

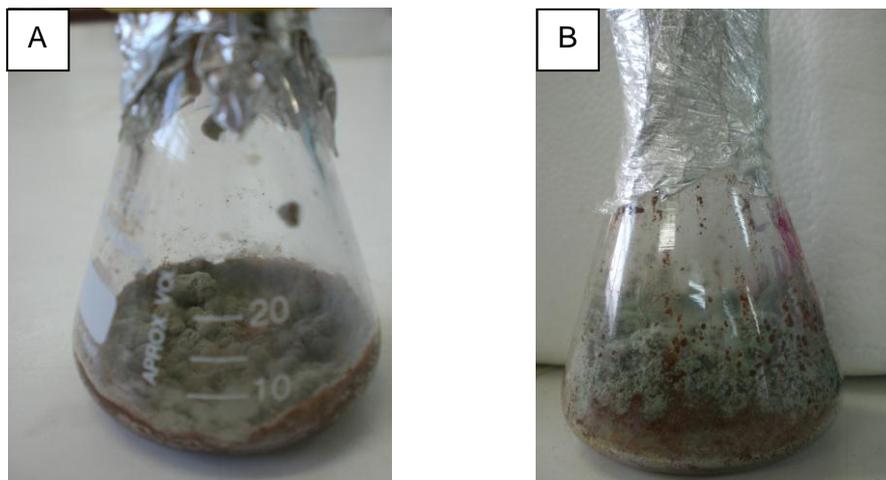


Figura 11 Crescimento dos fungos *P. variable* (BTF0919) (A) e *Trichoderma* sp (BTF0948) (B), em meio sólido de fibras da casca de coco não designificada, demonstrando atividade de degradação da lignocelulose.

Após cerca de 5 dias, os fungos cresceram normalmente demonstrando que mesmo em presença de uma alta concentração de fenóis, o crescimento micelial e a esporulação não são inibidos, o que confirma a presença de fenoloxidasas e a sua capacidade de degradar a lignina. Os fungos *Penicillium variable* e *Trichoderma* sp também demonstraram crescimento em meio de cultura mínimo contendo como única fonte de carbono a xilana. *Penicillium* sp e *Trichoderma* sp são bem reportados por produzirem xilanases (DWIVEDI et al. 2011; HERPOËL-GIMBERT et al. 2008)

#### 4.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR

Com a finalidade de identificar as espécies dos fungos isolados da casca de coco, a identificação molecular foi realizada a partir da análise dos 'amplicons'

gerados pelas reações de PCR e de marcação para sequenciamento (Figura 12 A). As relações de 260/230 e 260/280, dos ‘amplicons’ purificados, ficaram entre 1,70 – 2,02, demonstrando que a purificação foi eficiente (Figura 12 B). Após a purificação foi obtida uma concentração de ácidos nucleicos que variou de 60 – 90 ng.µL<sup>-1</sup>. A reação de sequenciamento gerou ‘amplicons’ na região de 600 pb que foram observados em gel de agarose (Figura 12 C e D). A quantidade de ‘amplicons’ gerados com a reação de sequenciamento, de acordo com a intensidade das bandas (marcador ‘low mass ladder’), ficou entre 60 – 100 ng. Os fungos filamentosos isolados da casca de coco utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

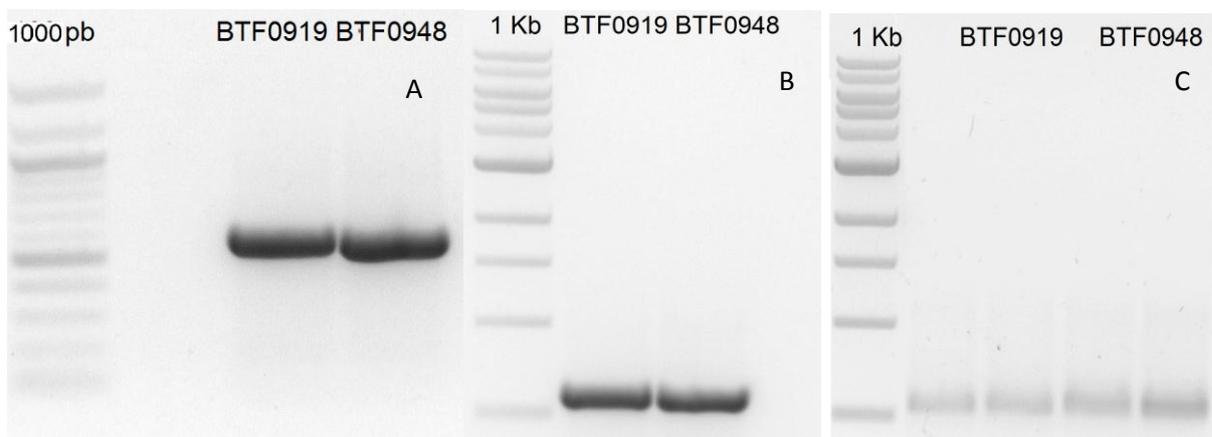


Figura 12 Gel de agarose com bandas características na região de 600 pb. (A) ‘Amplicons’ sem purificação. (B) ‘Amplicons’ purificados. (C) ‘Amplicons’ da reação de sequenciamento.

A morfologia mostrou que os fungos BTF0919 e BTF0948 pertencem respectivamente aos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium* (Figura 14 e 15). Utilizando identificação molecular baseada na amplificação e análise de sequências da região D1/D2 do rDNA de *Penicillium* sp (BTF0919) e de *Trichoderma* sp (BTF0948), as sequências foram analisadas por similaridade de alinhamento e as espécies identificadas como mais próximas foram: *Penicillium variable* KUC1476 (acc. n°. HM469398, similaridade de 98%) e o *Trichoderma* sp clone KL 2W E11 (acc. n°. JF449619, similaridade de 99%) (Figura 13). As sequências do rDNA geradas no sequenciamento e utilizadas para a análise filogenética podem ser encontradas no apêndice deste trabalho.

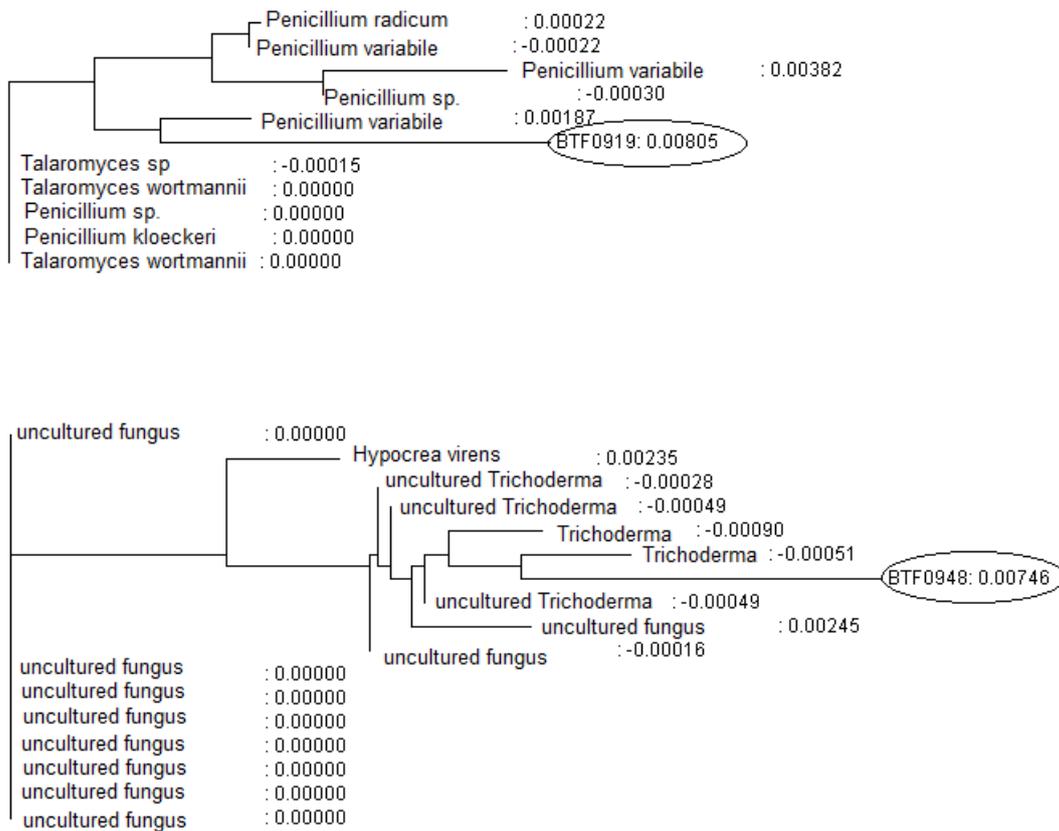


Figura 13 Análise das distâncias filogenéticas das sequências geradas de rDNA, realizada no banco de dados do EMBL-EBI, *P. variabile* (BTF0919) e *Trichoderma* sp (BTF0948).

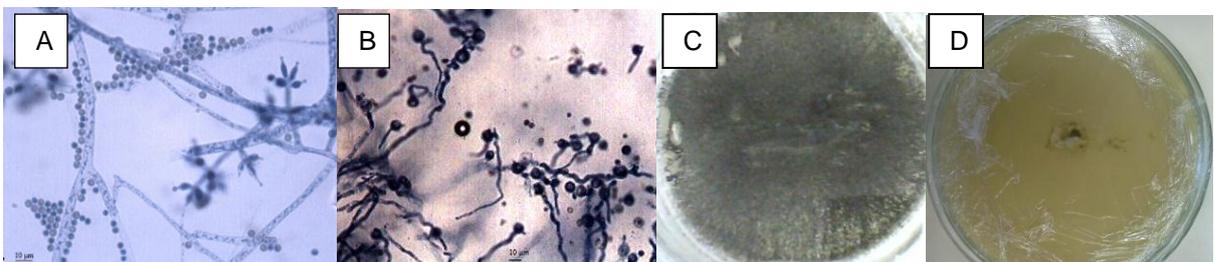


Figura 14 Imagem das estruturas reprodutivas de *Trichoderma* sp em microscópio óptico (aumento: 400 X) e a olho nu. (A) Conidióforos e conídios. (B) Clamidosporos. (C) Micélio em esporulação após 3 semanas de crescimento, cor verde escuro. (D) Reverso da placa, crescimento do micélio de cor creme.

Classificação proposta por Persoon C.H. 1794 (MYCOBANK, 2012):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Sordariomycetes

Ordem: Hypocreales

Família: Hypocreaceae

Gênero: *Trichoderma*

*Trichoderma* é um fungo filamentosamente largamente distribuído no solo, em materiais vegetais, ou vegetação em decomposição, e em madeiras. *Hypocrea* spp. são teleomórficos das espécies do gênero *Trichoderma*. Colônias de *Trichoderma* crescem rapidamente e são maduras em 5 dias. Estes fungos proliferam facilmente a 25 °C e em meio BDA, as colônias são de aspecto algodonoso e tornam-se compactadas com o tempo. Inicialmente o micélio é branco, e quando os conídios são formados com a esporulação algumas manchas azuis esverdeadas ou amarelas esverdeadas tornam-se visíveis. O reverso da placa é de cor creme a amarelada.

Microscopicamente foram notadas hifas hialinas septadas, conidióforos, fiálides e conídios. Conidióforos são hialinos, ramificados e podem ocasionalmente exibir um arranjo piramidal. Fiálides são hialinas, em forma de balão e insufladas na base. Elas estão ligadas aos conidióforos em ângulos retos. As fiálides podem ser solitárias ou organizadas em 'clusters'. Seus conídios possuem cerca de 3 µm de diâmetro, são unicelulares e arredondados ou elipsoidal em sua forma. Eles são lisos ou ásperos e agrupados nas pontas das fiálides. Esses aglomerados frequentemente são interrompidos durante o procedimento de preparação de lâminas microscópicas. A cor dos conídios é principalmente verde (DE HOOG apud DOCTORFUNGUS 2012; PUTZKE; PUTZKE 1998; MENEZES; OLIVEIRA 1993) .

De acordo com Martins et al. (2008) o gênero *Trichoderma* é capaz de produzir clamidósporos, além dos conídios e conidióforos. *Trichoderma* sp pode ser principalmente isolado de amostras ambientais, o fungo *Trichoderma* clone KL 2W E11 foi isolado de madeira em decomposição, provenientes de espécies arbóreas de 'Beech' na Áustria, apresentando características de biodeteriorização e de biodegradação, semelhantemente ao isolado deste trabalho (MOLL et al. 2011).

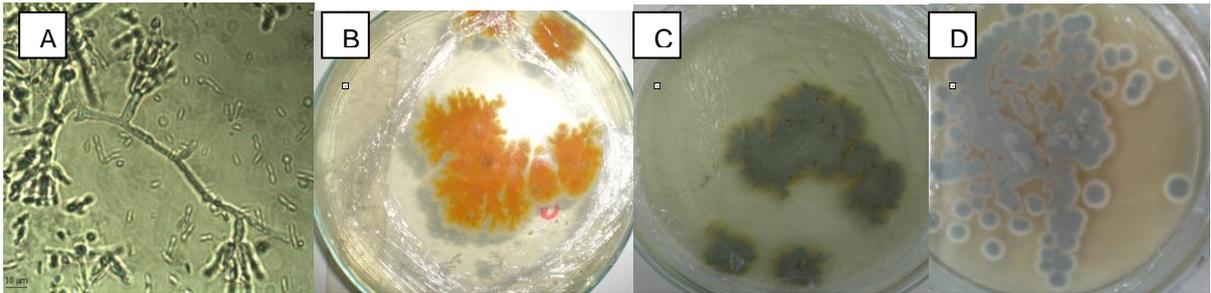


Figura 15 Imagem das estruturas reprodutivas de *Penicillium variable* em microscópio óptico (aumento: 400 X) e a olho nu. (A) Conidióforos e conídios em microcultivo. (B) Verso da placa de cor alaranjado. (C) Micélio em esporulação, cor verde cinzentado. (D) Micélio com 7 dias de crescimento, esporulado de coloração verde cinzentado.

Classificação proposta por Link. H.F. 1809 (MYCOBANK, 2012)

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Eurotiomycetes

Ordem: Eurotiales

Família: Trichomaceae

Gênero: *Penicillium*

As colônias de *Penicillium* sp, com exceção de *Penicillium marneffe*, são de crescimento rápido, liso, filamentosas e aveludadas, lanosas, ou cotonosas na sua textura. As colônias são inicialmente brancas e tornam-se azuis, verdes, cinzas, verdes cinza oliva, amareladas ou rosadas com o tempo. O inverso da placa é geralmente pálido a amarelo. As hifas de *Penicillium* sp são hialinas e septadas, suas estruturas reprodutivas são formadas por conidióforos, métulas, fiálides e conídios, as métulas podem se ramificar nos conidióforos. As fiálides são suportadas pelas métulas e sobre as fiálides existem as cadeias de conídios, arredondados, as quais podem medir de 2,5 – 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (de HOOG et al. 2000). A forma anamórfica de *P. variable* possui fase teleomórfica chamada *Talaromyces variable*, na sua fase anamórfica o fungo *P. variable* KUC1476 foi reportado por Jang et al. (2011) como isolado de madeira do tipo coníferas, na Korea, exibindo alto grau de descoloração de madeiras do tipo *Pinus* assim como também atividades de fenoloxidasas em meio MEA (meio extrato de malte ágar). Estes dados corroboram com os dados demonstrados neste trabalho, visto que o *P. variable* foi isolado da

casca de coco, a qual possui alto grau de rigidez e uma alta concentração de fenóis como a da madeira. *P. variabile*, tal como *Trichoderma* sp, foi capaz de crescer em meio malte exibindo atividade fenoloxidase e na casca de coco em meio sólido.

#### 4.3 MEDIDA DE SACARIFICAÇÃO CELULÁSICA USANDO ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Para identificar o melhor valor de pressão para sacarificação enzimática foram usados como controles os extratos brutos celulásicos dos fungos padrões tais como *T. reesei* RUT C30 e de *A. niger*. Estas enzimas foram provenientes da fermentação submersa e foram testadas separadamente e como mistura. O ensaio padrão de papel de filtro foi usado como medida de sacarificação (EVELEIGH et al. 2009).

Níveis crescentes de pressão hidrostática causaram um aumento na atividade enzimática para as celulases testadas. Este aumento demonstrou ser dependente de pressão, e o efeito foi mais pronunciado a  $50 \pm 1$  °C do que a  $22 \pm 1$  °C (Figura 16). Portanto, a temperatura ótima de 50 °C descrita para celulases (EVELEIGH et al. 2009, GHOSE, 1987) juntamente com a HHP aumenta a hidrólise. Na temperatura de  $22 \pm 1$  °C em condições de pressão, a única celulase que não alcançou um aumento relativo da atividade celulásica total foi a de *A. niger*.

Em determinadas condições, os aumentos de temperatura e de pressão hidrostática podem ter um efeito de estabilização ou, ao contrário, de desnaturação da enzima. Aumentos moderados de temperatura e pressão hidrostática podem estabilizar enzimas, porém é reportado que temperaturas elevadas e valores de pressão acima de 300 MPa desnaturam e inativam enzimas. Mudanças na solubilidade e diminuição de volume são capazes de aumentar a estabilidade e a atividade das enzimas em HHP. Além disso, o aumento da solubilização de muitas moléculas, tais como a do substrato e das proteínas e suas regiões hidrofóbicas podem ocorrer em condições de pressão, assim estes efeitos combinados podem levar ao aumento da atividade (EISENMENGER; CORCUERA, 2009).

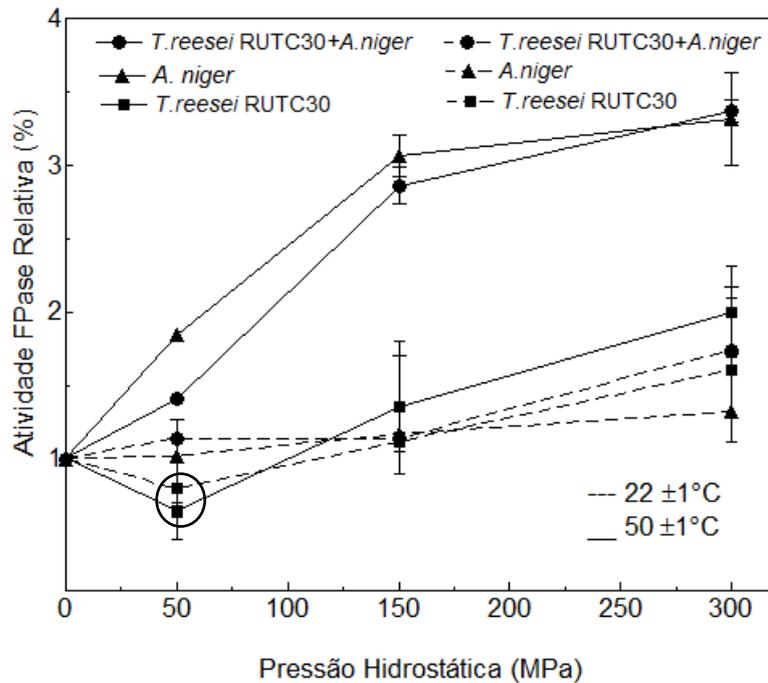


Figura 16 Atividades celulásicas totais (FPase) dos extratos brutos celulásicos em crescentes valores de alta pressão hidrostática. ( $p < 0,05$ ). Dentro do círculo, atividades diminuídas.

Este aumento da atividade celulásica pode ser explicado também pela mudança conformacional e desdobramento ou desordem das enzimas em condições de alta pressão hidrostática, os quais podem ocorrer a valores de pressão de até 400 MPa (MICHIELS et al. 2008). Estas mudanças afetam as interações proteína-proteína ou interações proteína-substrato, neste último caso o substrato ao se ligar no sítio ativo pode estabilizar a enzima, deslocando o desdobramento ou desordem de volta para seu estado nativo ou ordenado (EISENMENGER; CORCUERA, 2009).

Algumas proteínas nas condições de pressão atmosférica, quando em estado desordenado utilizam de ligantes para voltar ao seu estado ordenado, como exemplo a proteína CREB, uma proteína regulatória de gene (fator de transcrição). Esta proteína utiliza do substrato para moldar si mesma e adquirir uma nova conformação. Proteínas como Sic1 (proteína de sinal, regulatória do ciclo celular) e p53 (proteína fator de supressão tumoral) também apresentam domínios desordenados, que interagem com ligantes específicos, adquirindo novas funções,

ou exercendo funções específicas (CHOUARD, 2011). Assim proteínas que adquirem uma desordem em condições de alta pressão podem possivelmente adquirir novas funções, visto que existem proteínas desordenadas funcionais em condições de pressão atmosférica.

Ao analisarmos os resultados apresentados no gráfico da Figura 16 foi notado a presença de um decréscimo da atividade celulásica de *T. reesei* RUTC30 em baixas pressões (valores de 50 MPa) enquanto observou-se o aumento da atividade em altas pressões (valores de 150 e 300 MPa). Murao et al. (1992) reportou o valor ótimo de aumento das atividades avicelásicas e endoglicanásicas de *Aspergillus aculeatus* entre 200 - 400 MPa. Após este valor, ocorreu o decréscimo da atividade nos dados publicados por Murao et al. (1992). Assim podemos esperar que para as atividades reportadas na Figura 16 ocorra um decréscimo da atividade após 400 MPa. Ainda, os dados reportados corroboram com os apresentados nesse trabalho, na Figura 16, pois foi encontrada uma cinética de atividade celulásica de *T. reesei* RUTC30 similar à reportada para as atividades celulásicas de *A. aculeatus* em condições de HHP. Isto demonstra que existe similaridade entre os dois complexos de celulasas e em suas conformações protéicas, as quais podem reagir à pressão hidrostática semelhantemente. Pode-se notar, analisando a cinética enzimática, o decréscimo das atividades celulásicas a valores menores de pressão (50 MPa) para as celulasas destes dois fungos (*T. reesei* RUTC30 e *A. aculeatus*), o que possivelmente está ligado a fenômenos de instabilidade da proteína provocada pela pressão. Visto que a ligação do substrato à enzima pode estabilizá-la em condições de pressão, o aumento das atividades a 150 MPa e 300 MPa, seria devido a esta ligação aos carboidratos-substratos. O aumento da pressão diminuiria o volume e aumentaria a superfície de contato da proteína com substrato ou carboidratos, promovendo sua ligação, estabilizando a enzima e aumentando sua atividade. (BOONYARATANAKORNKIT et al. 2002).

Sabemos que proteínas possuem regiões de glicosilação onde os carboidratos podem ser ligados. Com o intuito de analisar a presença destas regiões, a análise de similaridade das sequências de CBH (celobiohidrolases), EG (endoglicanases) e Bgl ( $\beta$ -glicosidase) de *A. aculeatus* foi realizada no MRS,

utilizando ferramentas de alinhamento contra o 'protein databank' (PDB). De todas as sequências de celulases analisadas (CBH, EG e Bgl), apenas Bgl1 demonstrou alta similaridade. Dos 119 'hits' gerados para a Bgl1 de *A. aculeatus* (BGL1\_ASPAC), pelo alinhamento, Bgl1 de *T. reesei* (PDB:3ZYZ) foi encontrada como primeiro 'hit' de estrutura similar, com uma similaridade de 61%. Assim as Bgl1 destes fungos supracitados, possuidores de cinéticas celulásicas semelhantes em HHP, possuiriam relação com aumento da atividade celulásica na pressão.

Ao analisarmos no Swissprot a sequência de *A. aculeatus* (BGL1\_ASPAC) pode-se notar a presença de numerosas regiões de *N*-glicosilação (N-X-T/S), as quais poderiam estar envolvidas no processo de estabilização da enzima. Como também aumenta as reações, a mesma poderia aumentar as reações de glicosilação, ou até as reações de glicação, as quais são o primeiro passo da reação de Maillard. Assim, regiões de ligação ao carboidrato da proteína poderiam estar envolvidas com a estabilização da enzima ou mudança da conformação para uma mais ativa (JAEGER et al. 2010, CHOUARD, 2011).

Foi reportado que regiões de *N*-glicosilação de *T. reesei* estão relacionadas com o aumento da estabilidade térmica das celulases e proteção contra proteases, por interação a carboidratos (MERIVUORI et al. 1985). Enquanto que regiões de *O*-glicosilação foram reportadas como relacionadas com a secreção destas enzimas (KUBICEK et al. 1987). Assim, essas regiões de *N*-glicosilação poderiam estar relacionadas com a estabilidade em condições de pressão.

Ao alinharmos as sequências de Bgl1 de *A. aculeataus* e de *T. reesei* (PDB:3ZYZ) apenas duas regiões de glicosilação foram encontradas como similares, estas regiões foram analisadas na estrutura protéica de *T. reesei* (PDB:3ZYZ) (Figura 17). Pode-se notar que estas regiões são situadas em estruturas secundárias do tipo  $\beta$ -pregueadas, altamente hidrofóbicas, como também eram próximas ao sítio ativo.

Boonyaratanakornkit et al. (2002) reporta que baixas pressões (50 MPa) facilitam a hidratação dos resíduos de aminoácidos mais externos, ou hidrofílicos, normalmente situados em sua superfície. Porém, pressões elevadas (300 MPa) podem mudar a conformação das proteínas, acessando primeiramente os resíduos

de aminoácidos hidrofóbicos, e posteriormente hidratando resíduos do sítio ativo e de cavidades. Assim, hipoteticamente, nestes maiores valores de pressão, existe um efeito da pressão nos resíduos hidrofóbicos, nas cavidades e nos resíduos do sítio ativo de Bgl1 quando a atividade é aumentada (Figura 17).

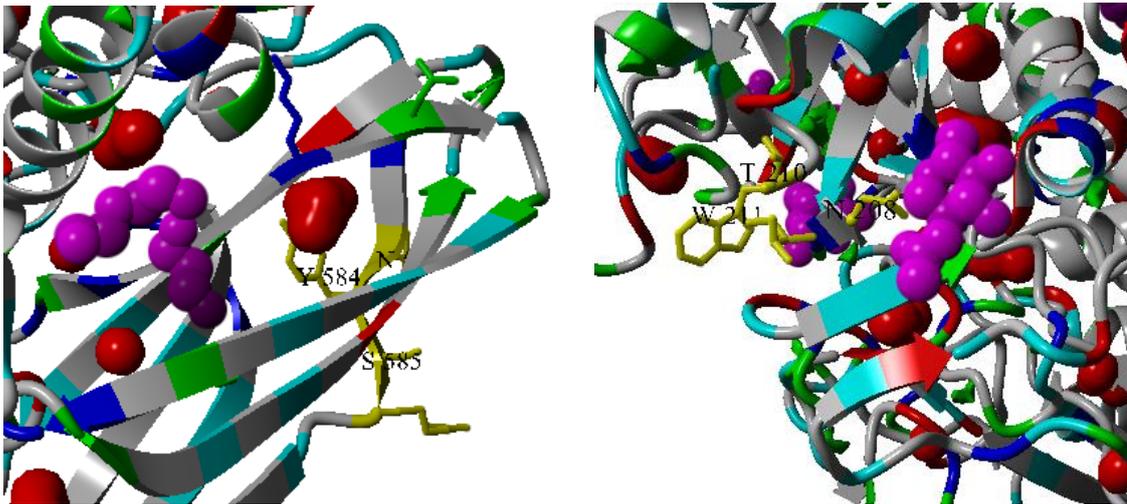


Figura 17 Análise da estrutura protéica de Bgl1 de *T.reesei* (PDB:3ZYZ) e de suas regiões de *N*-glicosilação (N-X-T/S) idênticas a Bgl1 de *A. aculeatus* (amarelo). Aminoácidos hidrofóbicos (cinza), aminoácidos hidrofílicos (vermelho, verde e azul), aminoácidos alcoólicos (azul cian), ligantes do sítio ativo em roxo e cavidades em vermelho.

Messner et al. (1990) reportou um polissacarídeo heteroglicano isolado da parede celular de *T. reesei* capaz de aumentar a atividade  $\beta$ -glicosidase deste fungo, composto de glicose, manose, ácido glucorônico e ácido galacturônico. Ainda, Messner propõe que este aumento é devido a um mecanismo de reconhecimento, ou à ligação desses carboidratos negativamente carregados à  $\beta$ -glicosidase que é uma proteína positivamente carregada. Este relato demonstra que pode existir uma relação do aumento da atividade enzimática e a ligação aos carboidratos.

Assim a região de *N*-glicosilação encontrada na estrutura secundária  $\beta$ -pregueada (Figura 17), destaca-se como uma região importante, visto que estas estruturas possuem os resíduos de valina, triptofano, isoleucina, tirosina, treonina e fenilalanina, resíduos altamente hidrofóbicos, e que facilmente se ligam a carboidratos (BORASTON et al. 2004). Podemos também notar na região de *N*-

glicosilação (Bgl1 de *T. reesei*) a presença de arginina bem relatada para processos de glicação ocorridos com o aumento dos valores de pressão hidrostática (SCHWARZENBOLZ et al. 2002). 'In vitro' ligação de aminoácidos tais como arginina, lisina a açúcares tais como ribose, glicose, frutose e outros, foram demonstradas pela formação de pentosidina (ABED et al. 1995). Arginina (R586) é um aminoácido positivamente carregado, podendo se ligar a açúcares negativamente carregados, estes relatos parecem comprovar as evidências de Messner et al. (1990) supracitadas. Como evidenciam uma possível ligação dos carboidratos à arginina em condições de HHP.

Também podemos notar como mostrado nos resultados da Figura 17, o resíduo de tirosina que se localiza próximo a uma cavidade. Após a modificação da estrutura da enzima, e conseqüente hidratação das cavidades por pressão de 300 MPa, esse resíduo poderia ser acessado. Assim, com a hidratação das cavidades esse resíduo se deslocaria e tornaria a enzima mais ativa para se ligar a carboidratos (NIMLOS et al. 2007). Pela teoria de Ramachandran, com a rotação das cadeias laterais dos resíduos, ângulos dos aminoácidos poderiam ser mudados o que afeta a conformação da proteína ou do polipeptídeo.

Assim, a queda da atividade a pressões menores como mostrado nos resultados da Figura 16, pode ser devido à não glicosilação de Bgl1 e conseqüentemente perda da estabilidade. Este valor de pressão não aproxima a proteína do substrato suficientemente para a ligação e principalmente não acessa as cavidades. Contudo o aumento da atividade celulásica aconteceria devido ao acesso das regiões hidrofóbicas, das cavidades protéicas e de regiões de *N*-glicosilação, a altas pressões. A HHP agiria expondo estes resíduos de aminoácidos favorecendo a ligação aos carboidratos e estabilizando a enzima. A pressão pode também aumentar a hidratação dos resíduos localizados no 'pocket', aumentando assim a atividade enzimática pela maior formação de ligações de hidrogênio (BOONYARATANAKORNKIT et al. 2002). O valor de pressão de 300 MPa liberou uma maior quantidade de açúcares redutores e apresentou uma maior atividade celulásica total relativa. Assim este valor foi aplicado para as análises das outras atividades celulásicas dos fungos isolados da casca de coco e dos fungos padrões.

#### 4.4 ATIVIDADES CELULÁSICAS EM CONDIÇÕES DE ALTA PRESSÃO DAS CELULASES DOS FUNGOS ISOLADOS DA CASCA DE COCO

O efeito da HHP nas atividades celulásicas de *A. aculeatus* e *T. reesei* RUT C30, como a análise de bioinformática, sugeriram que as enzimas  $\beta$ -glicosidásicas são mais susceptíveis ao tratamento de pressão. Assim, com a finalidade de investigar o efeito da HHP nas atividades  $\beta$ -glicosidásicas, e seu efeito nas outras atividades celulásicas, o tratamento de pressão foi aplicado às atividades celulásicas das enzimas dos fungos padrões e dos isolados da casca. De modo geral, pode-se perceber que os fungos isolados da casca de coco apresentaram suas atividades celulásicas maiores do que a dos fungos padrões (*T. reesei* RUT C30 e *A. niger*), tanto em HHP quanto à pressão atmosférica (Figura 18). Analisando as atividades  $\beta$ -glicosidases, pode-se notar que as atividades de *T. reesei* RUT C30, *Trichoderma* sp e *P. variable* foram aumentadas em condições de HHP quando comparadas à pressão atmosférica. As atividades  $\beta$ -glicosidásicas aumentadas por pressão tanto a  $22 \pm 1$  °C quanto a  $55 \pm 1$  °C não foram estatisticamente diferentes entre si (Figura 18 A). Rath et al. (1995) propôs que existe um mecanismo geral de aumento da atividade  $\beta$ -glicosidase de ascomicetos via ligação com o heteroglicano isolado da parede celular de fungos. Em seus resultados, os heteroglicanos aumentaram cerca de duas vezes a atividade  $\beta$ -glicosidase de dois ascomicetos filogeneticamente distantes (*T. reesei* e *A. niger*). O relato ainda cita *Talaromyces flavus* (*Penicillium*) como possível possuidor do mesmo mecanismo. Assim, podemos supor que exista um mecanismo em comum de aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica em condições de HHP para as  $\beta$ -glicosidases dos ascomicetos testados neste trabalho, visto que os fungos do gênero *Trichoderma* e *P. variable* também são filogeneticamente distantes. Ainda, visto a alta similaridade com relação a regiões de *N*-glicosilações nas  $\beta$ -glicosidases (Figura 18) de ascomicetos filogeneticamente distantes, *T. reesei* e de *A. aculeatus*, poderíamos supor esta região como um efector para um mecanismo comum ligado à estabilidade e o aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica usando pressão.

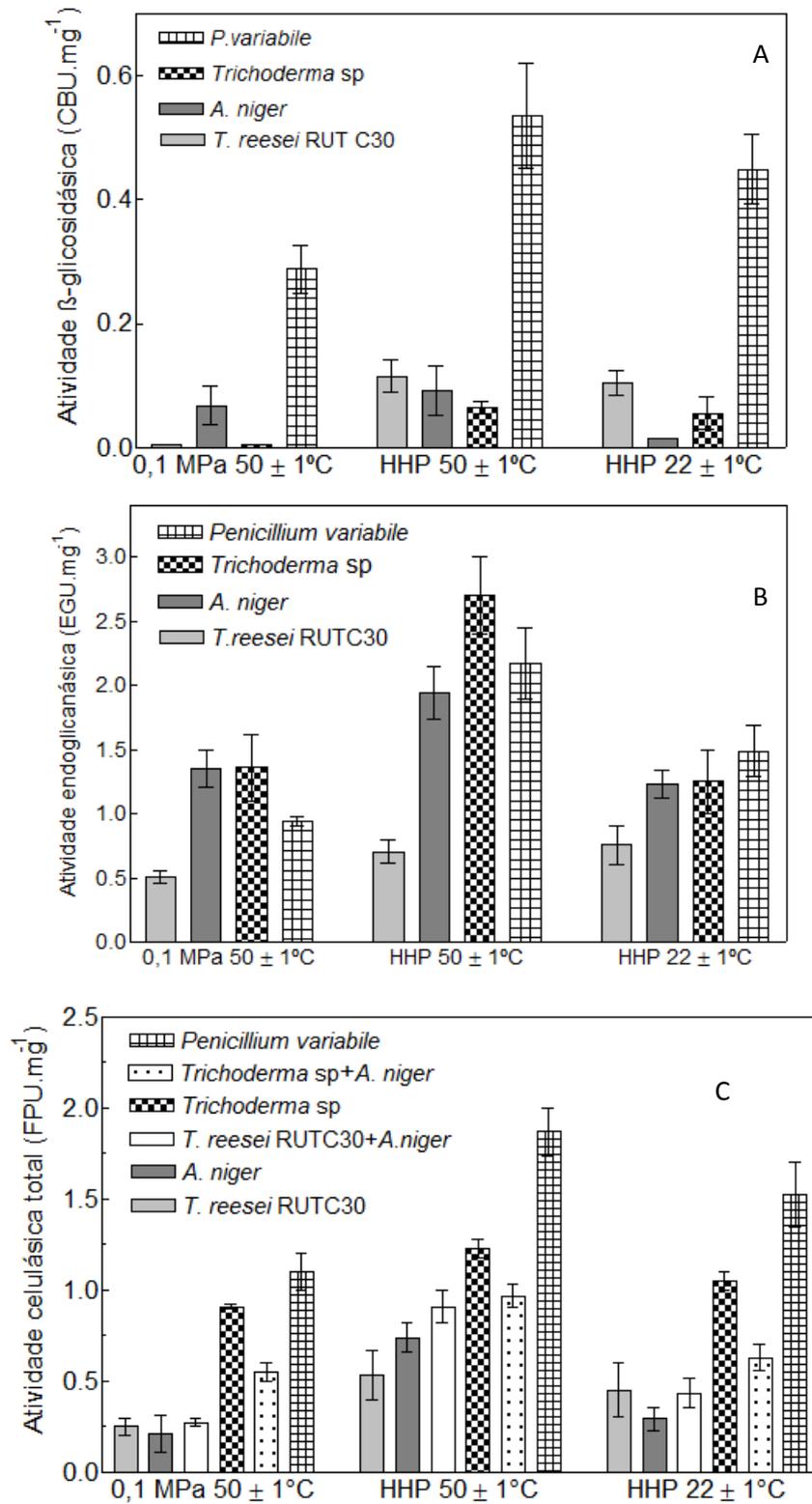


Figura 18 Atividades celulásicas dos extratos brutos celulásicos dos fungos isolados da casca de coco comparada às atividades dos fungos padrões em condições de HHP e de pressão atmosférica. (A) Atividade β-glicosidásica. (B) Atividade endoglucanásica. (C) Atividade celulásica total ( $p < 0,01$ ).

Visto que as atividades  $\beta$ -glicosidases dos gêneros de *Trichoderma* e de *P. variabile* foram aumentadas ao usarmos a alta pressão hidrostática a  $22 \pm 1$  °C, temperatura de baixa entropia, podemos dizer que a pressão foi capaz de afetar as estruturas dessas enzimas. Assim as  $\beta$ -glicosidases sofrem modificação da sua estrutura adquirindo uma estrutura mais ativa. Essa estrutura mais ativa provocaria o aumento de suas atividades  $\beta$ -glicosidásicas, e assim as atividades celulásicas totais dos mesmos fungos seriam aumentadas ao usarmos HHP à temperatura de  $22 \pm 1$  °C e a  $50 \pm 1$  °C. O aumento da entropia da molécula promovida pela temperatura de  $50 \pm 1$  °C também acrescentaria um aumento na atividade celulásica total (MORILD, 1981).

Analisando primeiramente a atividade celulásica total de *A. niger*, percebemos que apenas ocorreu aumento na HHP a  $50 \pm 1$  °C, e que a sua atividade celulásica total em condições de HHP a  $22 \pm 1$  °C não diferiu estatisticamente da sua atividade à pressão atmosférica em  $50 \pm 1$  °C. Com isso podemos concluir que o fator que proporcionou o aumento da atividade celulásica total de *A. niger* ao usarmos HHP a  $50 \pm 1$  °C foi a sua atividade endoglicanásica e não a  $\beta$ -glicosidásica, já que esta última não obteve aumento ao usarmos HHP (Figura 18 A, B e C). Ao analisarmos as atividades endoglicanásicas em condições de pressão, pode-se notar que as atividades de *A. niger* e de *Trichoderma* sp não foram aumentadas a  $22 \pm 1$  °C, porém as de *P. variabile* e a de *T. reesei* RUT C30 foram aumentadas. As atividades endoglicanásicas de todos os fungos foram aumentadas em HHP a  $50 \pm 1$  °C (Figura 18 B). Assim percebe-se que as atividades endoglicanásicas necessitam de um acréscimo de temperatura para que alcancem um maior aumento, com isso podemos dizer que existe um mecanismo comum dependente de maior entropia para que esta atividade seja aumentada na pressão.

O aumento das atividades celulásicas totais de *T. reesei* RUT C30, *Trichoderma* sp e de *P. variabile* foi alcançada em condições de HHP tanto em  $50 \pm 1$  °C quanto a  $22 \pm 1$  °C, não sendo estatisticamente diferentes entre si. Provavelmente devido ao aumento de suas atividades  $\beta$ -glicosidásicas.

Ao analisarmos as misturas (*T. reesei* RUTC 30 e *A. niger*, *Trichoderma* sp e *A. niger*) nota-se que a atividade celulásica total em condições de HHP é mais

pronunciada na temperatura de  $50 \pm 1$  °C do que na de  $22 \pm 1$  °C. Na temperatura de  $22 \pm 1$  °C apenas a mistura de *T. reesei* RUT C30 e de *A. niger* foi aumentada em condições de HHP, provavelmente devido ao aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. reesei*. A mesma mistura alcançou um maior aumento da atividade celulásica total em HHP a  $50 \pm 1$  °C, provavelmente devido ao acréscimo da atividade endoglicanásica de *A. niger*. A mistura de *Trichoderma* sp e *A. niger* só foi significativamente aumentada por pressão a  $50 \pm 1$  °C, provavelmente devido ao aumento da atividade endoglicanásica de *A. niger* pela alta pressão nesta temperatura (Figura 18 C). Nossos dados corroboram com os dados de Murao et al. (1992), o mesmo reporta as atividades endoglicanásica de *A. niger* sendo mantidas praticamente inalteradas no valor de pressão de 200 - 400 MPa a  $37 \pm 1$  °C. Assim o aumento da atividade endoglicanásica de *A. niger* usando HHP neste trabalho provavelmente é devido ao aumento da temperatura para  $50 \pm 1$  °C.

A fim de analisar as sequências e suas diferenças polipeptídicas, e também de explicar os aumentos das atividades celulásicas alcançadas na HHP, as estruturas de  $\beta$ -glicosidases e de endoglicanases dos fungos foram pesquisadas no MRS contra o PDB. Contudo, sequências e estruturas de celulases de *Trichoderma* sp e de *P. variable* ainda não foram reportadas ou resolvidas. Assim apenas as estruturas celulásicas de *T. reesei* e de *A. niger* foram analisadas. Para *A. niger* apenas PDBs de endoglicanases foram encontrados: 1KS4 e 1KS5, os dois com a mesma estrutura, porém 1KS4 é a estrutura final. Utilizando análise de similaridade e alinhamento contra o PDB observou-se que a estrutura 1KS4 apresentou maior identidade para a endoglicanase de *T. reesei* (PDB:1OA2), cerca de 66% de similaridade. Ao analisarmos as sequências das endoglicanases realizando o alinhamento das estruturas no YASARA, obteve-se uma similaridade de 51,3%. Pode-se perceber que existem alguns 'gaps' e que estes 'gaps' foram providenciados por aminoácidos que estão presentes em 1KS4 e ausentes em 1OA2. O maior 'gap' foi encontrado em 1KS4 apresentando aminoácidos como glutamina, alanina, glicina e alanina (Q153, A154, G155, A156), outros 'gaps' com apenas um aminoácido também foram observados tais como resíduos de treonina (T2) e prolina (P210, P13) (Figura 19). Glutamina é um aminoácido hidrofílico,

enquanto que os outros aminoácidos observados presentes em 1KS4 são aminoácidos hidrofóbicos (A, G, P) ou de hidrofobicidade indeterminada (tais como treoninas). Estes aminoácidos poderiam ser reponsáveis pela resistência à pressão na temperatura de  $22 \pm 1$  °C. Vale lembrar que a prolina é altamente rígida, e o seu posicionamento em alças pode dificultar a mudança conformacional. Apesar de mudanças conformacionais ocorrerem a 300 MPa, esta modificação a  $22 \pm 1$  °C não foi suficiente para aumentar a atividade endoglicanásica de 1KS4. Possivelmente estes aminoácidos hidrofóbicos e o maior grau de hidrofobicidade das regiões  $\beta$ -pregueadas são responsáveis pela baixa hidratação de 1KS4 em condições de HHP a  $22 \pm 1$  °C, dificultando a interação hidrofóbica com o substrato. Assim, ao aumentarmos a temperatura para  $50 \pm 1$  °C, estes resíduos de aminoácidos tendem a ser solvatados e a proteína tende a expandir o seu tamanho, o que também reforça a hidratação dos resíduos hidrofóbicos provocando um maior contato com o substrato e um aumento da atividade a  $50 \pm 1$  °C.

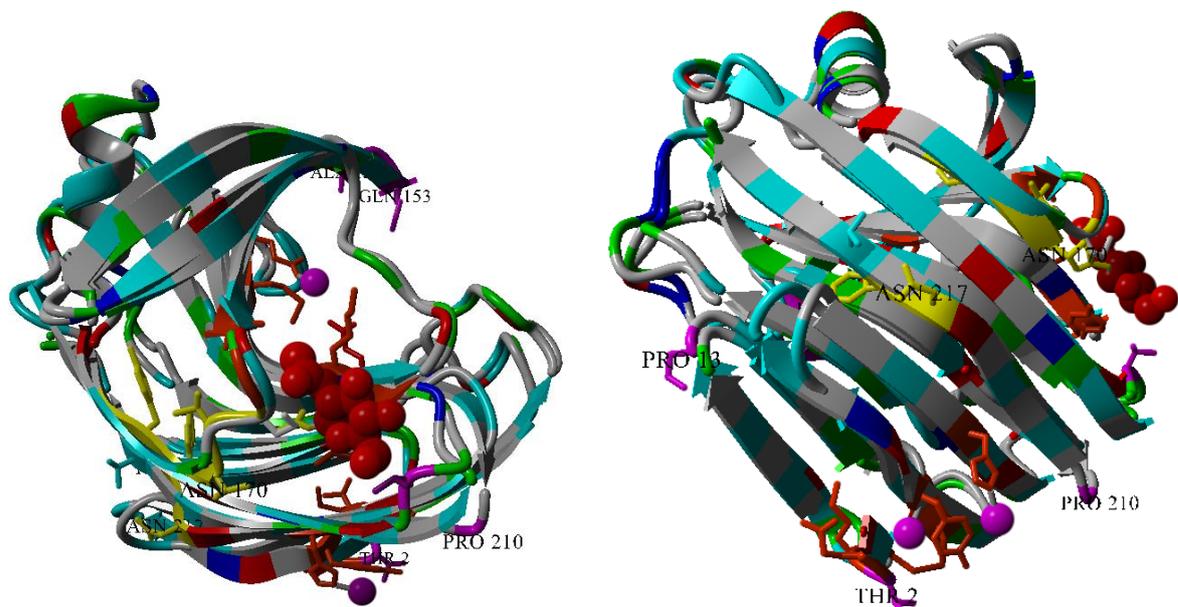


Figura 19 Alinhamento estrutural dos PDBs de: 1KS4 (endoglicanase de *A. niger*) e 10A2 (endoglicanase de *T. reesei*). Regiões de *N*-glicosilação em amarelo. Resíduos hidrofóbicos (cinza), resíduos hidrofílicos (vermelho, verde e azul), resíduos alcoólicos (azul cian). Ligantes do sítio ativo de 1KS4 (roxo) e do sítio ativo de 10A2 (vermelho). Cadeias laterais dos resíduos dos sítios ativos em vermelho. Cadeias laterais de 'gaps' em roxo.

A 1KS4 também possui regiões de *N*-glicosilação (ASN217), as quais não se alinham com as de 1OA2 (ASN170). A região de *N*-glicosilação de 1OA2 é próxima dos resíduos do sítio ativo, o que facilita a ligação da enzima aos carboidratos, e também a sua catálise após a aproximação entre o substrato e o sítio ativo pela pressão. Porém 1KS4 não possui região de *N*-glicosilação próxima ao sítio ativo, assim possivelmente esta região funcionaria apenas como estabilizante.

O aumento da atividade endoglicanásica de *A. niger* na temperatura de  $50 \pm 1$  °C usando HHP pode ter ocorrido devido a mudanças conformacionais proporcionadas pelas regiões Q153, A154, G155 e A156, e por T2 na região N-terminal de 1KS4. Alguns destes aminoácidos fazem parte do sítio ativo e não foram alinhados com 1OA2. Glutamina (Q153) é um resíduo hidrofílico que é facilmente hidratado e glicina é um aminoácido hidrofóbico e flexível, assim a HHP poderia proporcionar a rotação da glicina nesta região e provocar também o deslocamento da glutamina, a glutamina (Q153) então poderia participar dos resíduos do sítio ativo, já que outras glutaminas são frequentemente encontradas no sítio ativo de 1KS4.

Visto que atividades endoglicanásicas e  $\beta$ -glicosidásicas de *T. reesei* RUT C30 foram aumentadas pela HHP a  $22 \pm 1$  °C, e que tanto em 1OA2 quanto em 3ZYZ de *T. reesei* foram observadas regiões de *N*-glicosilação próximas ao sítio ativo e situadas em regiões  $\beta$ -pregueadas, podemos concluir que possivelmente a pressão hidrostática possui um maior efeito nas sequências que possuem este padrão de ligação a carboidratos (Figura 17 e 19).

O aumento das atividades  $\beta$ -glicosidásicas dos gêneros *Trichoderma* por HHP é interessante para a indústria, pois o mesmo possui baixa atividade  $\beta$ -glicosidásica, o que faz necessário a mistura com  $\beta$ -glicosidases de alta atividade, tais como as de *A. niger* para melhorar a eficiência da hidrólise. A atividade  $\beta$ -glicosidásica transforma celobiose em glicose, diminuindo desta maneira a concentração do inibidor (celobiose), e conseqüentemente desinibindo as outras enzimas, com um posterior aumento das atividades celulásicas. O aumento desta atividade pela alta pressão pode explicar o aumento das outras atividades celulásicas em condições de pressão hidrostática (ANDRIÉ et al. 2010).

A atividade  $\beta$ -glicosidásica de *P. variable* foi cerca de 2 vezes maior em condições de HHP do que à pressão atmosférica. O aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica dos gêneros *Trichoderma* pela HHP foi cerca de 5 vezes maior do que à pressão atmosférica. Assim o aumento reportado neste trabalho para a atividade  $\beta$ -glicosidase é maior do que o aumento alcançado por Rath et al. (1995) e Messner et al. (1990), os autores reportam um aumento para a atividade  $\beta$ -glicosidásica de cerca de duas vezes na presença do heteroglicano e da manana.

Este é o primeiro relato de aumento de atividade  $\beta$ -glicosidásica em condições de HHP, de fungos das espécies *T. reesei* RUT C30, *Trichoderma* sp e *P. variable*. Ainda, é a primeira vez que um endofítico do gênero *P. variable* é isolado da casca de coco verde, com altas atividades celulásicas, as quais podem ser aumentadas pela HHP. O *P. variable* apresentou a maior atividade  $\beta$ -glicosidásica na pressão atmosférica e em alta pressão hidrostática, e ainda podemos dizer que suas atividades celulásicas foram resistentes em condições de pressão, o que reforça a importância do isolamento destes microrganismos endofíticos.

*Periconia* sp, outro endófito, foi reportado produzindo  $\beta$ -glicosidases (ou celobiasas) com alta atividade, termoestáveis e resistentes a variações de pH (HARNPICHARNCHAI et al. 2009). Como os endofíticos são isolados em condições de estresse, isso pode pré-dispor o microrganismo a suportar condições extremas, assim o isolado endofítico deste trabalho poderia possuir características de um extremófilo, o que poderia também explicar a resistência à pressão (HAMON et al. 1996; EISENMENGER; CORCUERA, 2009).

Como o maior aumento da atividade celulásica total ocorreu com a utilização da HHP na temperatura de  $50 \pm 1$  °C, este valor de tratamento foi escolhido para experimentos posteriores.

#### 4.5 PRECIPITAÇÃO DAS CELULASES DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO E ENSAIOS CELULÁSICOS

Os extratos brutos celulásicos foram precipitados com acetona no intuito de remover os açúcares redutores e aumentar a atividade celulásica total. Estas atividades foram então medidas na presença e ausência de HHP. Após a remoção dos açúcares, por precipitação, ao compararmos as atividades de enzimas não precipitadas com precipitadas (Figura 19 e 20), observou-se que, ocorreu o aumento da atividade celulásica total das celulases precipitadas, de todos os fungos testados, em condição de pressão atmosférica. Porém, não ocorreu o aumento da atividade celulásica das enzimas precipitadas quando usamos HHP (Figura 20). Isto indicou que os açúcares redutores possuem uma função de estímulo da atividade das celulases ou de estabilização da enzima em condições de HHP.

Rath and Herndl (1994) também reportou o decréscimo da atividade  $\beta$ -glicosidásica de 'marine snow' após a remoção de polissacarídeos presentes no seu meio de crescimento, e concluiu que estes polissacarídeos tinham uma função de estabilização das atividades. Este efeito é semelhante ao observado em nossos resultados da Figura 20. Estes relatos poderiam ser semelhantes, pois, durante a fermentação submersa e produção das celulases ocorre degradação da celulose, com a liberação de açúcares redutores, os quais se ligam às celulases. Estes açúcares se ligam em seus sítios ativos ou aos seus módulos ligantes de carboidratos (CBMs), inibindo-os. Concentrações de glicose em torno de 1–14 mM são reportadas por inibirem as atividades celulásicas, mais especificamente  $\beta$ -glicosidases, o que leva ao acúmulo de celobiose no meio reacional, inibindo todo o sistema celulásico (CANILHA et al. 2009; GHOSE, 1987). Porém, nos nossos resultados, estes carboidratos parecem estimular a atividade celulásica em condições de pressão.

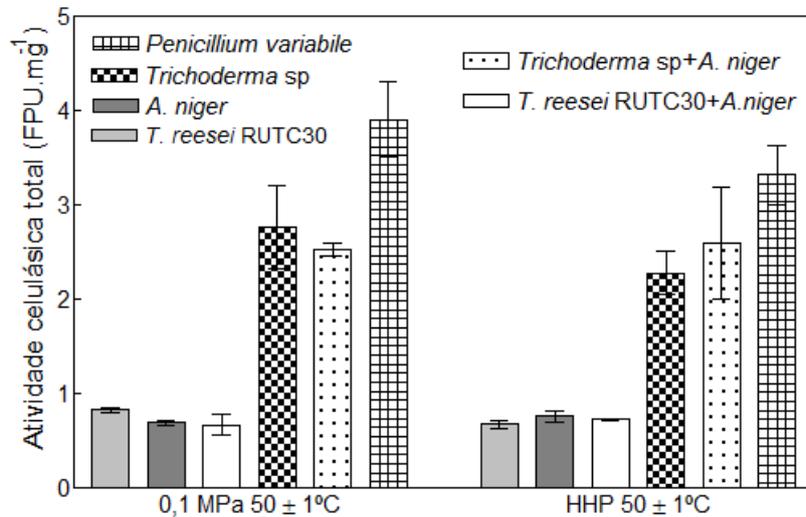


Figura 20 Atividade celulásica total dos extratos enzimáticos precipitados com acetona a  $50 \pm 1$  °C. Pressão atmosférica (0,1 MPa) e alta pressão hidrostática (HHP). ( $p > 0,05$ ).

As hidrolases glicosídicas geralmente possuem uma estrutura modular, que consiste de um domínio catalítico, ligado ou não via a um peptídeo glicosilado a um ou mais domínios não catalíticos denominados de módulos protéicos ligantes de carboidratos (CBMs). CBMs podem se ligar a vários carboidratos durante a hidrólise. Estas regiões de CBMs são responsáveis por aumentar a atividade celulásica de seu domínio adjacente, neste caso o catalítico, pois se ligam aos carboidratos hidrolisáveis concentrando as celulasas nas regiões dos substratos a serem clivados. Assim, a remoção desses açúcares redutores se faz necessária para expor as regiões catalíticas das celulasas e também as regiões de CBMs, promovendo assim a ligação aos carboidratos que serão hidrolisados (GHOSE, 1987, ARAI et al. 2003, HENRISSAT; BAIROCH, 1993).

As regiões de CBMs são ricas em aminoácidos hidrofóbicos, principalmente em resíduos de aminoácidos aromáticos, sendo as interações hidrofóbicas essenciais para que os CBMs de celulasas se liguem aos substratos ou carboidratos derivados da celulose (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011). Em condições de HHP, múltiplos domínios internos hidrofóbicos de cavidades das proteínas são expostos à água com a desorganização protéica. Possivelmente este evento de pressurização seleciona regiões de aminoácidos hidrofóbicos, com CBMs ou não, que se ligam aos

açúcares redutores disponíveis para a hidrólise e aumentam a atividade celulásica. As CBMs mais conhecidas e estudadas são as CBMs de endoglicanases e celobiohidrolases de *T. reesei*. Pouco se conhece a cerca das CBMs de  $\beta$ -glicosidases, quase nenhuma estrutura é relatada (BORASTON et al. 2004, NIMLOS et al. 2007). Estas regiões, dentro do próprio gênero *Trichoderma*, demonstram uma homologia com uma identidade de sequência em torno de 70% em diversas endoglicanases e exoglicanases. Porém, até então suas  $\beta$ -glicosidases não foram relatadas quanto à presença de CBMs (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011). Nimlos et al. (2007) reportou por simulação computacional, que a CBM de celobiohidrolase I de *T. reesei* possuindo resíduos de tirosina na sua superfície hidrofóbica, foi capaz de se ligar via sua cadeia lateral à extremidade redutora adjacente da celulose. Este mecanismo foi governado por quatro tirosinas da CBM, e estes resíduos de tirosina moveram de sua posição interna para formar interação de Van der Waals com a superfície de celulose. Este dado parece corroborar com os resultados encontrados na Figura 16 e 20, em que a tirosina interna (Y584, Y636, Y639) é situada próxima à cavidade, assim após a aplicação de pressão sua cadeia lateral poderia deslocar e se ligar às extremidades redutoras dos carboidratos por interações hidrofóbicas, aproximando o carboidrato do sítio ativo. Ao analisarmos os resíduos hidrofóbicos desta região na estrutura podemos encontrar resíduos semelhantes aos resíduos de regiões CBM tais como tirosina (Y) e fenilalanina (F), que formam a plataforma de ligação hidrofóbica nos sítios de reconhecimento de CBMs. Pode-se notar também que estes resíduos podem fazer parte do sítio ativo que contém os aminoácidos Y135, F654, T668, F669 e N670 (Figura 20 A e B). Assim a pressão ao aproximar esta enzima do substrato provocaria uma interação hidrofóbica ao expor, além dos resíduos de tirosina, também os de fenilalanina. Esta região  $\beta$ -pregueada pode provavelmente funcionar como uma CBM, visto que possui uma possível plataforma para CBMs e que as regiões do sítio ativo são próximas a essa região. Existem três tipos de CBMs, tipo A, B e C. Os tipos de CBMs A e B são ligantes da superfície dos polissacarídeos, o CBM tipo B possui uma maior especificidade de acordo com o polissacarídeo. As cadeias laterais aromáticas dos ligantes são imprescindíveis para o reconhecimento dos carboidratos pelas CBMs (BORASTON et al. 2004). CBMs do

tipo C são semelhantes à lectina, ligando-se a mono, di, ou trissacarídeos. Este tipo de CBM é chamado de ligante de pequenos açúcares. Rath et al. (1995) relatou o aumento da atividade  $\beta$ -glicosidase de *T. reesei* pela presença de manana de *Saccharomyces cerevisiae*, propondo que o aumento seria devido a ligação da proteína à manana, via manose. A manose é um monossacarídeo semelhante à glicose, assim os mecanismos de aumento das atividades  $\beta$ -glicosidásicas reportadas neste trabalho e reportadas por Rath et al. (1995) poderiam ser similares. Assim, visto que a remoção dos açúcares redutores afetou o aumento da atividade celulásica total dos fungos em condições de HHP, foi proposto investigar os efeitos de diferentes níveis de concentrações de glicose nas atividades glicosidásicas em condições de alta pressão hidrostática, usando as celulases precipitadas e celulases comerciais. Os resultados demonstraram que a crescente adição de glicose (Figura 21) juntamente com os efeitos da HHP, aumentaram as atividades de todas as  $\beta$ -glicosidases testadas, com exceção para a de *A. niger* (NOVOZYMES 188).

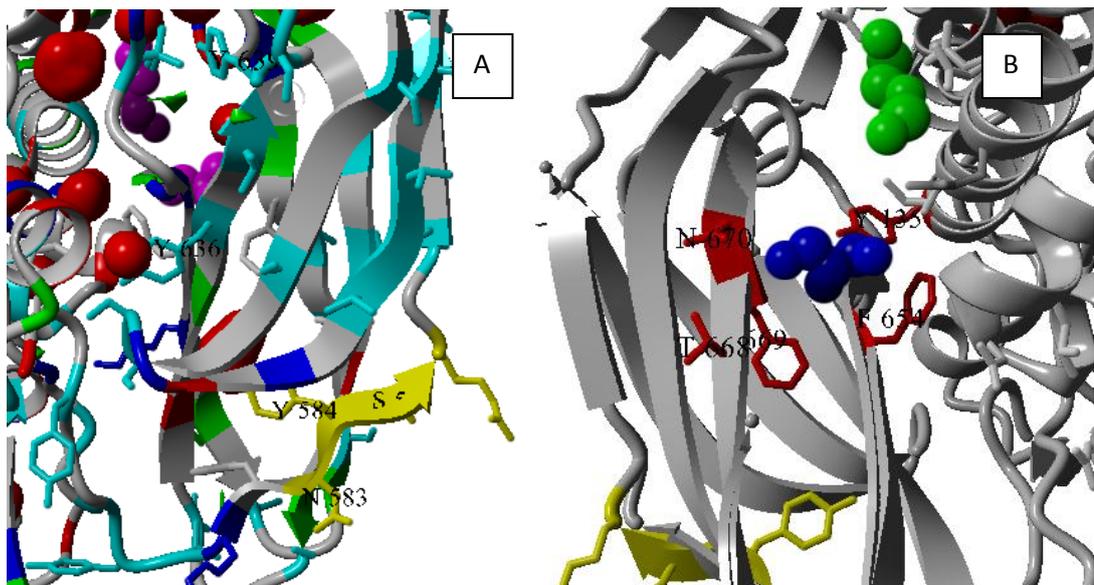


Figura 21 Estrutura de Bgl1 de *T. reesei* (PDB:3ZYZ). (A) Estrutura  $\beta$ -pregueada mostrando regiões hidrofóbicas (cinza), cavidades (vermelho), N-glicosilação (amarelo), aminoácidos Y636, Y584 e Y639 próximas às cavidades, e regiões com treoninas e serinas (azul). (B) regiões do sítio ativo (vermelho) com os aminoácidos Y135, F654, T668, F669 e N670 próximos à região de N-glicosilação (amarelo).

Este aumento foi estimulado por concentrações de até  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  (55 mM), com exceção para a  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* (NOVOZYMES 188), a qual teve sua atividade inibida com valores de concentrações acima deste nível, porém a mesma foi resistente à pressão. Observou-se também que as  $\beta$ -glicosidases de *P. variable* e de *Trichoderma* sp obtiveram as maiores atividades estimuladas por glicose, em condições de pressão atmosférica e HHP, aumentando sua atividade na presença de altas concentrações de glicose.

Algumas celulasas de microrganismos são reportadas como tolerantes ou estimuladas por glicose, como por exemplo  $\beta$ -glicosidase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Scytalidium thermophilum*, *Trichoderma viride* e *Microbispora bispora* (ZANOELO et al. 2004; NASCIMENTO et al. 2010). O térmita *Neotermes koshunensis* também possui uma  $\beta$ -glicosidase que é estimulada por glicose (UCHIMA et al. 2010).

Os resultados deste trabalho demonstraram pela primeira vez o aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. reesei* (26921), *P. variable* e de *Trichoderma* sp usando HHP em presença de glicose. A atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. viride*, fungo do mesmo gênero de *T. reesei* e filogeneticamente próximo, foi reportada sendo estimulada por glicose à pressão atmosférica em concentrações de glicose similares às reportadas neste trabalho. A  $\beta$ -glicosidase de *T. viride* foi isolada do extrato enzimático bruto e sua atividade foi testada contra diferentes concentrações de glicose, o aumento da atividade foi encontrada entre 4 mM - 85 mM de glicose. Porém, quando a concentração de glicose foi maior do que 85 mM a atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. viride* começou a decrescer rapidamente e chegou a zero em 162 mM nas condições de pressão atmosférica (MAGUIRE et al. 1977).

Esta cinética enzimática demonstrou-se similar à cinética encontrada neste trabalho para as  $\beta$ -glicosidases de *T. reesei* em similares condições de temperatura, tampão e pH, porém em condições de alta pressão hidrostática. As maiores atividades foram encontradas nas concentrações entre 55 mM e 110 mM de glicose, decrescendo após 110 mM e chegando a zero a 165 mM de glicose. A diminuição das atividades, nestes relatos, após uma determinada concentração de glicose pode

estar ligada com o aumento da concentração de glicose e posterior competição entre o substrato e o sítio ativo da enzima, gradualmente, diminuindo a atividade  $\beta$ -glicosidásica a partir de 10 mg.mL<sup>-1</sup> (55 mM) (NASCIMENTO et al. 2010).

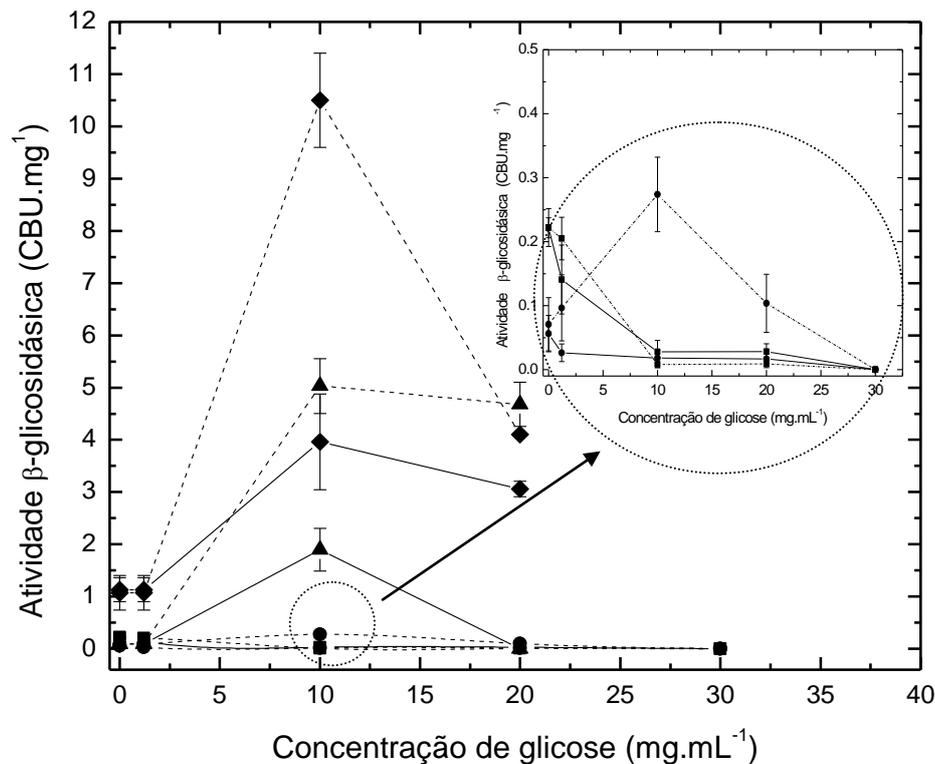


Figura 22 Atividade  $\beta$ -glicosidásicas a  $50 \pm 1$  °C das celulases de: *T. reesei* 26921 (Sigma) (●), *A. niger* (Novozymes 188) (■), *Trichoderma* sp (▲), *P. variabile* (◆). Atividade  $\beta$ -glicosidásica a 300 MPa (linha tracejada) ou em pressão atmosférica (linha sólida). ( $p < 0,05$ ).

Estes dados demonstraram que existe uma similaridade entre as sequências polipeptídicas das enzimas, e uma similaridade das atividades das  $\beta$ -glicosidas estudadas neste trabalho com as de *T. viride*. Ainda, que estas enzimas de *T. reesei* e dos isolados da casca de coco podem adquirir cinéticas semelhantes às de *T. viride* após a aplicação da pressão hidrostática. Assim como também os isolados da casca de coco podem adquirir atividades  $\beta$ -glicosidásicas semelhantes às de *T. viride* na pressão atmosférica quando em presença de glicose. Ainda, de acordo com os dados, a atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. reesei* na pressão foi capaz de

resistir a maiores concentrações de glicose do que a atividade reportada para *T. viride* à pressão atmosférica. Vale reassaltar que as atividades  $\beta$ -glicosidásicas dos isolados da casca de coco também foram maiores do que as de *T. viride*.

Os relatos de Maguire et al. (1977) e de Murao et al. (1992) juntamente analisados evidenciaram que fungos com  $\beta$ -glicosidases estimuladas por glicose à pressão atmosférica também podem ter suas celulases ativadas por HHP, tal como é relatado neste trabalho para *Trichoderma* sp e para *P. variable*. Como as cinéticas das  $\beta$ -glicosidásicas dos fungos se mostraram semelhantes com relação ao aumento das atividades  $\beta$ -glicosidásicas em presença de glicose, provavelmente as sequências polipeptídicas das  $\beta$ -glicosidases de *T. viride*, *T. reesei*, *Trichoderma* sp e de *P. variable* possuem semelhança, assim como diferenças que podem evidenciar um mecanismo em comum para o aumento provocado pela pressão. Ao realizarmos as análises de similaridade e alinhamento das sequências polipeptídicas de Bgl1 ( $\beta$ -glicosidase) de *T. reesei* (PDB: 3ZYZ) com a de outros organismos supracitados, apenas foi encontrado similaridade de 100% para Bgl1 de *T. viride* e de 60% para Bgl1 de *A. niger* (G3YD55\_ASPNA) no TrEMBL. Com isso as sequências foram alinhadas com a sequência peptídica da  $\beta$ -glicosidase de *A. aculeatus* (similaridade reportada anteriormente) a fim de analisar as similaridades existentes entre as  $\beta$ -glicosidases dos organismos tratados na pressão e dos estimulados por glicose (Figura 23).

Glicosilação de proteínas é importante para a estabilidade, secreção e localização (MERIVUORI et al. 1985). Assim, ao analisarmos as regiões de *N*-glicosilação e *O*-glicosilação nos resultados da Figura 22, notou-se que estas regiões são altamente conservadas em *T. reesei*, *T. viride* e em *A. aculeatus*. A presença destas regiões de glicosilação semelhantes nas proteínas demonstra a possibilidade do reconhecimento de glicose e manose, tanto à pressão atmosférica quanto em condições de HHP. Visto que a similaridade entre os resíduos de aminoácidos de Bgl1 de *T. viride* e de *T. reesei* foi de 100%, e que esta última foi estimulada por glicose somente em condições de pressão, podemos concluir que a Bgl1 de *T. viride* possui alguma região diferente em comparação à Bgl1 de *T. reesei*. Pois, se ambas possuem as mesmas sequências, *T. reesei* também deveria ser



glicosilação pode ser afetada por pressão. Ainda analisando os resultados, podemos notar que a região de *N*-glicosilação de *A. niger* não foi similar, o que corrobora com os nossos resultados, pois a atividade  $\beta$ -glicosidásica de *A. niger* não foi ativada por pressão. Isto evidenciou que durante a aplicação da pressão a glicose pode se ligar somente às  $\beta$ -glicosidases de *T. reesei*, *T. viride*, *A. aculeatus*, o que poderia estabilizar a Bgl e aumentar a sua atividade (Figura 23). Outras regiões de T e S também foram repetitivas em *T. reesei*, *T. viride* e *A. aculeatus* e também não são similares às de *A. niger*, porém estas regiões são frequentemente reportadas para reconhecimento de manose (BERG et al. 2002). Estas regiões de treoninas e serinas podem vir a confirmar o aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica para *T. reesei* provocada por manana e reportada por Rath et al. (1995). Regiões de arginina (R) também foram repetitivas, o que também evidenciou uma ligação à glicose. As regiões do sítio ativo também foram diferentes entre *T. reesei* e *A. niger*, o que provocaria diferentes reações ao usarmos a alta pressão, por exemplo uma V814 (de *A. niger*) no lugar de uma T668 (de *T. reesei*) (Figura 23). A treonina é um aminoácido alcoólico e valina (V) é um aminoácido hidrofóbico, treonina se liga facilmente aos carboidratos no sítio ativo via sua cadeia lateral alcoólica, o que não acontece com a valina (BERG et al. 2002). Estas diferenças encontradas poderiam explicar o motivo da atividade  $\beta$ -glicosidásica de *A. niger* não ser aumentada pela pressão hidrostática.

Visto as características analisadas acima das regiões polipeptídicas, poderíamos supor esta região  $\beta$ -pregueada como uma possível região CBM do tipo C, CBM como lectinas, por possuir a plataforma de aminoácidos tais como de CBMs, contendo tirosina, fenilalanina e triptofano, e por possuir regiões de *N*-glicosilação e *O*-glicosilação (repetitivas) e ser próxima dos aminoácidos do sítio ativo. CBMs e floculinas são proteínas como lectinas. A estrutura mais relevante do PDB para floculina foi encontrada usando o MRS (PDB: 2XJQ). Esta estrutura ao ser analisada no Swissprot (FLO5\_YEAST) demonstrou cerca de 6 regiões de *N*-glicosilação e duas regiões repetitivas ricas em treoninas e serinas, sendo a região de reconhecimento do açúcar rica em tirosina. Ao compararmos os PDBs de Flo5 (2XJQ) e da região  $\beta$ -pregueada de Bgl1 (3ZYZ) pode-se perceber também a

repetição de aminoácidos tais como T e S, e a presença de regiões de *N*-glicosilações e estruturas 3D semelhantes, assim como regiões de tirosinas que podem participar do reconhecimento dos açúcares de ambas (Figura 24). Manana da parede celular de *S. cerevisiae* é um polissacarídeo constituído de manose e envolvido no processo de floculação das leveduras através da interação das suas paredes celulares via ligação do monossacarídeo manose a proteínas da parede celular chamadas de floculinas. O aumento da atividade reportada para  $\beta$ -glicosidase de *T. reesei* via ligação à manana (RATH et al. 1995) indica que para esta enzima pode existir uma CBM do tipo C ou um mecanismo de reconhecimento de manose à pressão atmosférica.

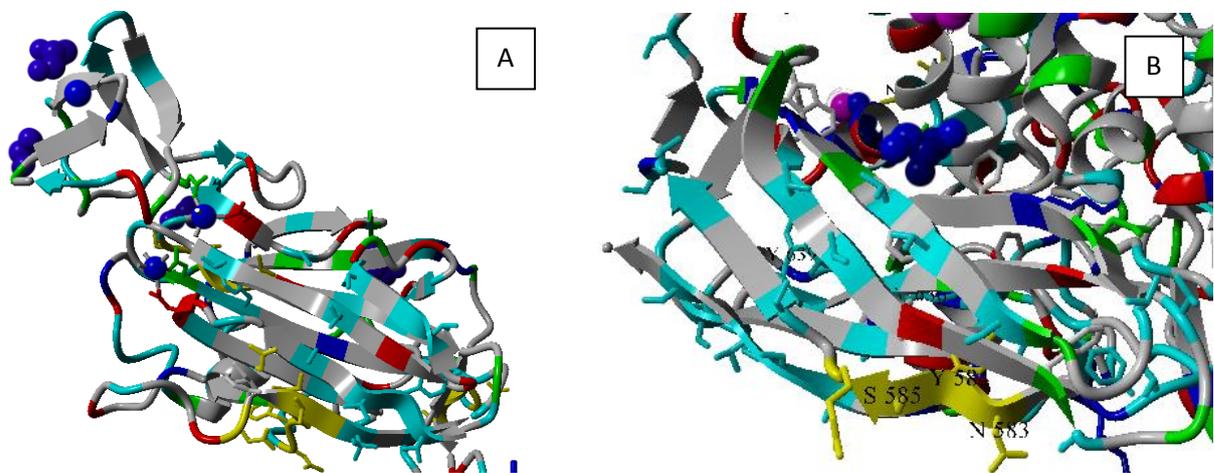


Figura 24 Análise das estruturas de 3ZYZ e de 2XJQ. (A) Flo5 (2XJQ) de *S. cerevisiae* (B) região  $\beta$ -pregueada de Bgl1 (3ZYZ) de *T. reesei*. Em azul, aminoácidos alcoólicos, serinas (S) e treoninas (T) e algumas tirosinas (Y). Em amarelo, regiões de *N*-glicosilações. Ligantes do sítio ativo em azul escuro.

Ainda,  $\beta$ -glicosidases de *T. reesei* podem ser ancoradas à parede celular quando a sua secreção é insuficiente via glicano âncora, tal como as floculinas que também são proteínas do tipo GPI ancoras. Estes dados mostram uma relação de  $\beta$ -glicosidases de *T. reesei* com floculinas, e alguma função relacionadas com lectina (MESSNER et al. 1990, VEELDERS et al. 2010). A rotação dos resíduos de tirosina (Figura 23) em condições de HHP poderia aumentar a ligação aos carboidratos e

essa região funcionaria como CBM do tipo C, resíduos de tirosina são comumente encontrados realizando ligações com carboidratos em lectinas (NIMLOS et al. 2007).

A análise da sequência de outra Bgl de *T. reesei*, a Bgl2, usando a análise de similaridade e alinhamento contra o TrEMBL e Swissprot, também demonstrou que esta  $\beta$ -glicosidase (PDB:3AHY) possui similaridade com algumas  $\beta$ -glicosidases estimuladas por glicose de organismos supracitados neste trabalho. As maiores similaridades foram encontradas para *T. viride* e *A. niger* (Tabela 2).

Tabela 2 Análise de similaridade e alinhamento das sequências homólogas de Bgl2 (PDB:3AHY).

Organismo	Similaridade	Score	E-value
<i>Aspergillus niger</i>	92%	2216	5.13e-249
<i>Trichoderma viride</i>	90%	2023	2.03e-226
<i>Neotermes koshunensis</i>	60%	808	1.75e-85
<i>Microbispora bispora</i>	58%	868	1.89e-92

Estas proteínas foram alinhadas para análise, como mostrado no múltiplo alinhamento abaixo (Figura 25). Apenas uma região de N-glicosilação foi encontrada como idêntica, e apenas nas  $\beta$ -glicosidases das espécies com maiores similaridades entre si (*T. reesei*, *T. viride* e *A. niger*). Essas regiões foram analisadas usando a estrutura de Bgl2 de *T. reesei* (PDB:3AHY), pois não foram encontrados os PDBs para as Bgl2 das outras espécies. A análise dessa região de glicosilação (N368-G369-T370) mostrou que a mesma é interna e próxima ao sítio ativo, também próxima das cavidades, o que confirma a presença de um padrão quanto à região de glicosilação nestas enzimas, assim como nos dados anteriores analisados (Figura 26, 17 e 19). Podemos perceber nos resultados da Figura 26, que existe uma tendência de aumento das cavidades ao redor do sítio ativo. Boonyaratanakornkit et al. (2002) reportou que pressões acima de 200 MPa podem acessar as cavidades, hidratando-as e promovendo um aumento do volume das mesmas. Os efeitos de hidratação tendem a desnaturar as proteínas por romper as ligações hidrofóbicas, porém, quando existem carboidratos no meio reacional, os mesmos diminuem a energia livre da água por modificação osmótica do meio, diminuindo a hidratação da proteína.

```

gnl|treml|Q9P456_ASPNG      YQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQ-PGKIADGSSGVTACDSYNRTAEDIAL 63
gnl|treml|O93785_HYPJE     YQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQ-PGKIADGSSGVTACDSYNRTAEDIAL 63
gnl|treml|Q7Z7X1_TRIVI     YQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQ-PGKIADGSSGVTACDSYNRTAEDIAL 63
gnl|treml|Q8T0W7_9NEOP     YQIEGAWDENKGPNIWDTLTHEHPDYVVDGATGDIADDSYHLYKEDVKI 93
gnl|sprot|BGLB_THEBI       YQIEGAWREDGRG--LWDVFSHT-PGKVASGHTGDIACDHYHRYADVDLR 97
*****  :*:.* :*:.* :* . . . * :* * * * : * : * :

gnl|treml|Q9P456_ASPNG      FITLFHWDL---LHQRYGGLLNRTFPLDFENYARVMFRALP-KVRNWN- 156
gnl|treml|O93785_HYPJE     FITLFHWDLPEGLHQRYGGLLNRTFPLDFENYARVMFRALP-KVRNWIT 162
gnl|treml|Q7Z7X1_TRIVI     FITLFHWDLPEGLHQRYGGLLNRTFPLDFENYARVMFRALP-KVRNWIT 162
gnl|treml|Q8T0W7_9NEOP     MVTMYHWDLP-QALQDLGGWPN-LVLAKYSENYARVLFKNFGDRVKLWLT 190
gnl|sprot|BGLB_THEBI       YPTLYHWDLP-QTLEDRGGWAARDTAYR-FAEYALAVHRRRLGDRVRCWIT 193
* : * * * * : * * : * * . . . : : * : * *

gnl|treml|Q9P456_ASPNG      --EPLCSAIPGYGSGS-FAPGRQST-SEPWTVGHNILVAHGRAVKAYRDD 202
gnl|treml|O93785_HYPJE     FNEPLCSAIPGYGSGT-FAPGRQST-SEPWTVGHNILVAHGRAVKAYRDD 210
gnl|treml|Q7Z7X1_TRIVI     FNEPLCSAIPGYGSGT-FAPGRQST-SEPWTVGHNILVAHGRAVKAYRDD 210
gnl|treml|Q8T0W7_9NEOP     FNEPLT-FMDGYASEIGMAPSINTPGIDYLAHTVIHAHARIYHLYDQE 239
gnl|sprot|BGLB_THEBI       LNEPWVA AFLATHRGA-----PGAADVPRFRAVHLLHGLGLRLR--- 235
** : . : . : . * : : . * . :

gnl|treml|Q9P456_ASPNG      FKPASGDGQIGIVLNGDFTYPWDAADPADKE----RLEFFTAWFADPIYL 248
gnl|treml|O93785_HYPJE     FKPASGDGQIGIVLNGDFTYPWDAADPADKEAAERRLEFFTAWFADPIYL 260
gnl|treml|Q7Z7X1_TRIVI     FKPASGDGQIGIVLNGDFTYPWDAADPADKEAAERRLEFFTAWFADPIYL 260
gnl|treml|Q8T0W7_9NEOP     FRAEQG-GKVGISLNIWCEP-ATNSAEDRASCENYQQFNLGLYAHPIFT 287
gnl|sprot|BGLB_THEBI       ---SAGAGQLGLTLS---LSPVIEARPGVRRGRRVDALANRQFLDPAALR 279
* * : * : * . * : . : : : *

gnl|treml|Q9P456_ASPNG      --GDYPASMRKQLG-----DRLPTFTPEERALVHGSNDFYGMNHY 286
gnl|treml|O93785_HYPJE     --GDYPASMRKQLG-----DRLPTFTPEERALVHGSNDFYGMNHY 298
gnl|treml|Q7Z7X1_TRIVI     --GDYPASMRKQLG-----DRLPTFTPEERALVHGSNDFYGMNHY 298
gnl|treml|Q8T0W7_9NEOP     EEGDYPAVLKDRVSRNSADEGYTDSRLPQFTAEVEVEYIRGTHDFLGINFY 337
gnl|sprot|BGLB_THEBI       --GRYPEEVLKIMAG-----HARLGHPRDLETIHQPVDDLGVNYY 318
* ** : . : . . . . . : : : : * : * : * *

gnl|treml|Q9P456_ASPNG      TSNYIRHRSSPASADDTVGNVDVLFTKQGNCIGPETQSPWLRPCAAGFR 336
gnl|treml|O93785_HYPJE     TSNYIRHRSSPASADDTVGNVDVLFTKQGNCIGPETQSPWLRPCAAGFR 348
gnl|treml|Q7Z7X1_TRIVI     TSNYIRHRSSPASTPSATSTCSSPTSR--ATASAPRRSPPLAPVRPAAT 346
gnl|treml|Q8T0W7_9NEOP     TA-LLGKSGVEGYEPSRYRDSGVILTQD---AAWPISASSWLVKVPWPGFR 383
gnl|sprot|BGLB_THEBI       SHVRLAAEGEPAN---RLPSGEIRFER-----PTAVTAWPGRDPDGLR 359
: : . . . . . : . . . .

gnl|treml|Q9P456_ASPNG      DFLVWTSSKRYGSPPIYVTENGTSIKGESDLPNEKILEDDFRVKYNEYIR 386
gnl|treml|O93785_HYPJE     DFLVWISKRYGYPPIYVTENGTSIKGESDLPKEKILEDDFRVKYNEYIR 398
gnl|treml|Q7Z7X1_TRIVI     SWCG--SARGTYYPPIYVTENGTSIKGESDLPKEKILEDDFRVKYNEYIR 394
gnl|treml|Q8T0W7_9NEOP     KELNWIKNEYNPPVFITENGFSDYGG-----LNDTGRVHYYTEHLK 425
gnl|sprot|BGLB_THEBI       TLLRLRSRDYPGVGLIITENGAAFFDDRAD---GDRVHDPERIRYLTATLR 406
. : * * * * : . : * * * * . : :

gnl|treml|Q9P456_ASPNG      AMVTAVELDGVNVR-----FGVTYVDYEN-GQKRF 415
gnl|treml|O93785_HYPJE     AMVTAVELDGVNVKGYFAWSLMDNFEWADGYVTRFGVTYVDYEN-GQKRF 447
gnl|treml|Q7Z7X1_TRIVI     AMVTAVELDGVNVKGYFAWSLMDNFEWADGYVTRFGVTYVDYEN-GQKRF 443
gnl|treml|Q8T0W7_9NEOP     EMLKAIHEDGVNVIGYTAWSLMDNFEWLRGYSEKFGIYAVDFEDPARPRI 475
gnl|sprot|BGLB_THEBI       AVHDAIMAG-ADLRGYFVWSVLDNFEWAYG-YHKRGIVYVDYTT--MRRI 452
: * : . . : : * : * : *

```

Figura 25 Múltiplo alinhamento das sequências polipeptídicas: *A. niger* (Q9P456\_ASPNG), *T. reesei* (O93785\_HYPJE), *T. viride* (Q7Z7X1\_TRIVI), *N. koschunensis* (Q8T0W7\_9NEOP), *M. bispora* (BGLB\_THEBI). Regiões em cinza demonstram as regiões do sítio ativo e de possíveis glicosilações. (\*) resíduos similares, (:.) resíduos com propriedades semelhantes e (-) ausência de aminoácidos.

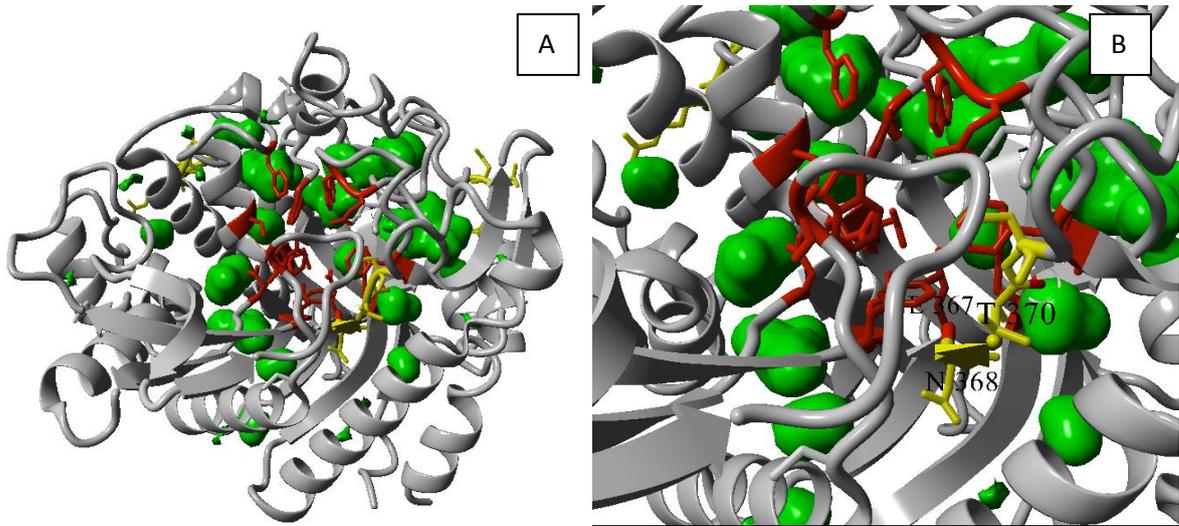


Figura 26 Análise da estrutura de Bgl2 de *T.reesei* (3AHY). (A) Regiões de glicosilação em amarelo, regiões do sítio ativo em vermelho, cavidades em verde. (B) Região de glicosilação em amarelo (N368-G369-T370), E367 (glutamato em vermelho) conectado à região de glicosilação, cavidade próxima a T370.

Ao mesmo tempo, a pressão ao comprimir as cavidades, pode aumentar o contato dos resíduos do sítio ativo com o substrato e com os carboidratos do meio reacional. Como o meio reacional das atividades testadas estava rico em carboidratos podemos concluir que existe uma diminuição da hidratação, e uma compressão das cavidades aproximando-os do sítio ativo. Podemos assim propor que a compressão promove a ligação da glicose a resíduos de glicosilação internos que foram expostos pelas flutuações conformacionais causadas pela pressão, modificando a conformação da enzima para uma forma mais ativa e estável (Figura 24). A ligação da glicose aos resíduos de treonina (T370) ou de asparagina (N368) poderia provocar a modificação da estrutura do sítio ativo, já que essa região de *N*-glicosilação é conectada a um resíduo do sítio ativo o glutamato (E367), assim este resíduo poderia ser deslocado após essa ligação à glicose e modificaria o seu mecanismo de retenção no sítio ativo da enzima. Durante o mecanismo de retenção o primeiro passo é o de ligação da celobiose ao sítio ativo via ligação de hidrogênio aos resíduos de W425, E424, W417, Q45, H119, após este evento, o glutamato (E367) age como um nucleófilo e ataca o carbono anomérico da ligação glicosídica

da celobiose se ligando à glicose e formando um covalente intermediário glicosil-enzima (EG). Assim a ligação glicosídica da celobiose é quebrada liberando a primeira molécula de glicose. No segundo passo, uma molécula de água ataca a ligação covalente do intermediário glicosil-enzima (EG) liberando a molécula de glicose e o glutamato para uma nova reação (JENG et al. 2012). Assim, a ligação da glicose ao N368 ou ao T370 poderia rotacionar E367, visto que o resíduo de glicina (G369) situado entre N368 e T370 é um aminoácido flexível, assim esta rotação hipoteticamente provocaria a mudança da posição do resíduo de E367 para próximo ao substrato/carboidrato. Visto que a pressão comprime as cavidades, durante este processo, juntamente com a ligação da glicose, todos os resíduos do sítio ativo poderiam ser aproximados do substrato. Desta maneira, E367 pode reagir facilmente ao substrato hidrolisando-o mais rapidamente, isto poderia ocorrer por diminuição da distância de ligação ao substrato e do tempo de reação, aumentando assim a velocidade da reação. Podemos notar que esta região de glicosilação está presente também em *A. niger*, uma explicação para a não estimulação de sua atividade  $\beta$ -glicosidásica por glicose em condições de HHP seria a ausência de resíduos do sítio ativo tais como E424, W425 e W417, os quais são responsáveis por reter a celobiose via ligação de hidrogênio com as hidroxilas no sítio ativo. O triptofano (W) é conhecido por possuir uma grande cadeia lateral aromática, assim, ao usarmos a pressão, a cadeia lateral deste resíduo poderia ser aproximada do substrato no sítio ativo e este aminoácido poderia se ligar facilmente ao substrato aumentando a velocidade de reação (BERG et al, 2002). Podemos perceber que todas as  $\beta$ -glicosidases estimuladas por glicose possuem idênticos aminoácidos no sítio ativo, principalmente E424, W425 e W417. Algumas  $\beta$ -glicosidases foram reportadas com suas atividades aumentadas pela pressão, entre elas podemos citar as de *Rubus idaeus*, *Fragaria xananassa*, *Sulfolobus sulfotaricus* e a de *Pyrococcus furiosus* (HAMON et al. 1996, EISENMENGER; CORCUERA, 2009), porém somente as duas últimas foram encontradas com sequências polipeptídicas e estruturas disponíveis em banco de dados (PDBs: 2CER e 3APG respectivamente). Assim o alinhamento das  $\beta$ -glicosidases de *S. sulfotaricus* e de *P. furiosus* foi realizado com as de Bgl2 (3AHY) de *T. reesei* e com a de *A. niger*, como mostrado abaixo na Figura 27.

```

gnl|pdb|3AHY|A          --MLPKDFQWGFATAAYQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQPQGIADGSSGV 48
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG --MLPKDLQWGFKAAYQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQPQGIADGSSGV 48
gnl|pdb|3APG|A          MAKFPKNFMFGYSWGSQFQFEMGLPGSE-VESDWWVWVHDKENIASGLVSG 49
gnl|pdb|2CER|A          MYSFPNSFRFGWSQAGFQSEMGTGSEDPNTDQYKVVHDPENMAAGLVSG 50
                        *: : : : *: * . . : * : : : * * .

gnl|pdb|3AHY|A          TACDS----YNRTAEDIALKSLGAKSYRFSISWSRIIPEGGRGDAVNQA 94
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG TACDS----YNRTAEDIALKSLGAKSYRFSISSR--IPEGGRGDAVNQA 92
gnl|pdb|3APG|A          DLPENGPAYWHLYKQDHDIAEKLGMDCIRGGIEWARIFPKPTFDVKVDVE 99
gnl|pdb|2CER|A          DLPENGPYWGNYKTFHDNAQKMGKLIARLNVEWSRIFPNP-LRPQNFD 99
                        :. : : : : * . . . : * : :

gnl|pdb|3AHY|A          GIDHYVKFVDDLLDAGITPFTTLFHWDLPEGLHQRYGG-----LLNR 136
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG GIDHYVKFVDDLLDAGITPFTTLFHWDL---LHQRYGG-----LLNR 131
gnl|pdb|3APG|A          KDEEGNIISVDVPESTIKELEKIANMEALEHYRKIYSDWKERGKTFILNL 149
gnl|pdb|2CER|A          ESKQ-DVTEVENENELKRLDEYANKDALNHRYREIFKDLKSRGLYFILNM 148
                        .. : : : : : : : : : : : : : * *

gnl|pdb|3AHY|A          TEFPLDFENYARVMFRALPKVRNWITFNEPLCSAIPGYGSGTFAPGRQST 186
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG TEFPLDFENYARVMFRALPKVRNWN---EPLCSAIPGYGSGSFAPGRQST 178
gnl|pdb|3APG|A          YHWPLPLWIHDP IAVRKLGPDRAPAGWLDKETTVEFVKFAAFVAYHLDDL 199
gnl|pdb|2CER|A          YHWPLPLWLHDP IRRR-GDFTGSPGWLSTRIVYEFARFSAYLAWKFDL 197
                        : * * : : : . * . . . . : : * : :

gnl|pdb|3AHY|A          SEPWTVGHNILVAHGRAVKAYRDDFKPASGDGQIGIVLNGDFTYPWDAAD 236
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG SEPWTVGHNILVAHGRAVKAYRDDFKPASGDGQIGIVLNGDFTYPWDAAD 228
gnl|pdb|3APG|A          VDMWSTMNEPNVVYNQGYINLRSGFPPGYLSFEAAEKAKFNLIQAHIGAY 249
gnl|pdb|2CER|A          VDEYSTMNEPNVVGGLGYVGVKSGFPPGYLSFELSRAMYNIIQAHARAY 247
                        : : : : : * . . . . : : * * . . . . : : . *

gnl|pdb|3AHY|A          PADKEAAERLEFFFTAW-FADPIYLGDPASMRKQLGDRLPFTTPEER-- 283
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG PADKE----RLEFFFTAW-FADPIYLGDPASMRKQLGDRLPFTTPEER-- 271
gnl|pdb|3APG|A          DAIKEYSEKSVGVIYAFAWHDLAAEYKDEVEEIRKKD--YEFVTILH-- 295
gnl|pdb|2CER|A          DGIKSVSKKPVGI IYANSFQPLTDKMEAVEAENDNRWFFDAIIRGE 297
                        . * . : : * : * : . : * . :

gnl|pdb|3AHY|A          -----ALVHGSNDFYGMNHYTSNYIRHRSSPASADDTVGNVDVLF 323
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG -----ALVHGSNDFYGMNHYTSNYIRHRSSPASADDTVGNVDVLF 311
gnl|pdb|3APG|A          -----SKGKLDWIGVNYYSRLVYGAKDGHVPLPGYG---FMS 330
gnl|pdb|2CER|A          ITRGNEKIVRDDLKGRLDWIGVNYYSRTVVKRTEKGYVSLGGYG---HGC 344
                        : * * : * * : : . . *

gnl|pdb|3AHY|A          TNKQGNICIGPETQSPWLRPCAAGFRDFLVWISKRYGYPPYYVTENGTSIK 373
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG TNKQGNICIGPETQSPWLRPCAAGFRDFLVWTSKRYGSPPIYVTENGTSIK 361
gnl|pdb|3APG|A          ERGGFAKSGRPASDFGWEMYPEGLENLLKYLNNAYELP-MIITENGMADA 379
gnl|pdb|2CER|A          ERNSVSLAGLPTSDFGWEFFPEGLYDVLTKYWNRYHLY-MYVTENGIADD 393
                        . * : : . . . * : : * : * : : * * * :

gnl|pdb|3AHY|A          SLMDNFEWADGYVTRFVTTYVDYENGQKRFPK-----KSAKSLKPLFDEL 462
gnl|tr Emb1|Q9P456_ASPNG -----FVTTYVDYENGQKRFPK-----KSAKSLKPLFDEL 430
gnl|pdb|3APG|A          -LTDNYEWAQGFMRREGLVYVDFETKKRYLRPSALVFREIATQKEIPEEL 461
gnl|pdb|2CER|A          -LADNYEWAAGFSMRREGLLVYVDFETKKRYLRPSALVFREIATNGAITDEI 475
                        * * : * * : : : : : : : : : * * :

```

Figura 27 Múltiplo alinhamento das sequências de Bgl2 de: *A. niger* (Q9P456\_ASPNG), *T. reesei* (3AHY), *S. sulfotaricus* (2CER) e *P. furiosus* (3APG). Regiões em cinza demonstram as regiões do sítio ativo e de possíveis glicosilações. (\*)resíduos similares, ( : .) resíduos com propriedades semelhantes e (-) ausência de aminoácidos similares 'gaps'.

Ao analisarmos os resultados do alinhamento da Figura 27 foi observada a existência de similaridade da maioria dos resíduos do sítio ativo, com exceção para

os resíduos de E424, W425 e W417, onde encontramos um 'gap' para Bgl2 de *A. niger* (Q9P456\_ASPNG). Os resíduos de E424 e W425 foram similares para 3AHY, 2CER e 3APG. Este resultado novamente reforça os resultados do alinhamento da Figura 25. Podemos assim concluir que estes resíduos poderiam ser afetados por pressão, e que estariam envolvidos no aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. reesei* na presença de glicose ao usarmos HHP.

O múltiplo alinhamento destas sequências polipeptídicas demonstrou alguns resíduos do sítio ativos que não foram similares entre as  $\beta$ -glicosidases estimuladas por pressão. Assim, o alinhamento das estruturas de  $\beta$ -glicosidases de *S. sulfotaricus* (2CER) e de *P. furiosus* (3APG) contra a Bgl2 de *T. reesei* (3AHY) foi realizado no YASARA a fim de encontrar qual destes resíduos realmente não seria alinhado. A similaridade das estruturas de 2CER e de 3AHY foi de 29,25%, enquanto que para as estruturas de 3APG e de 3AHY foi de 28,1%. Como a similaridade encontrada para 2CER foi maior, seguiu-se com a investigação deste alinhamento estrutural (Figura 28). Nos resultados da Figura 28, podemos perceber que as estruturas secundárias  $\beta$ -pregueadas do sítio ativo das proteínas se alinham ao redor do ligante. Assim podemos dizer que as estruturas, ao que se refere aos resíduos de aminoácidos do sítio ativo, são conservadas.

A análise dos resíduos do sítio ativo demonstrou que o resíduo W339 de 3AHY não se alinha com o W361 de 2CER, ocupando uma posição e rotação diferente dentro do 'pocket' (Figura 27). Assim o resíduo W339 poderia estar envolvido com o mecanismo de estímulo por glicose. 2CER é ativada na pressão sem presença de glicose, e as  $\beta$ -glicosidases de *T. reesei* (3AHY) foram ativadas por pressão na presença de glicose. Já que o resíduo de triptofano (W339) supracitado não encontrou alinhamento na estrutura de 2CER, podemos concluir que este resíduo estaria ligado com o aumento da atividade na presença de glicose.

Podemos observar nos resultados do alinhamento da Figura 25, que W339 alinha com outros triptofanos (W) de  $\beta$ -glicosidases estimuladas por glicose, tais como de *N. koshunensis*, de *M. bispora*, e também se alinha com a prolina (P) de *T. viride*, a prolina é rígida tal como o triptofano e apresenta propriedades semelhantes. Estes dados podem confirmar o envolvimento deste resíduo no mecanismo de

estimulação por glicose (BERG et al. 2002). O W339 não faz parte do mecanismo de retenção realizado pela enzima 3AHY, porém por ser o resíduo com maior cadeia lateral aromática, pode estar envolvido com o deslocamento de resíduos próximos.

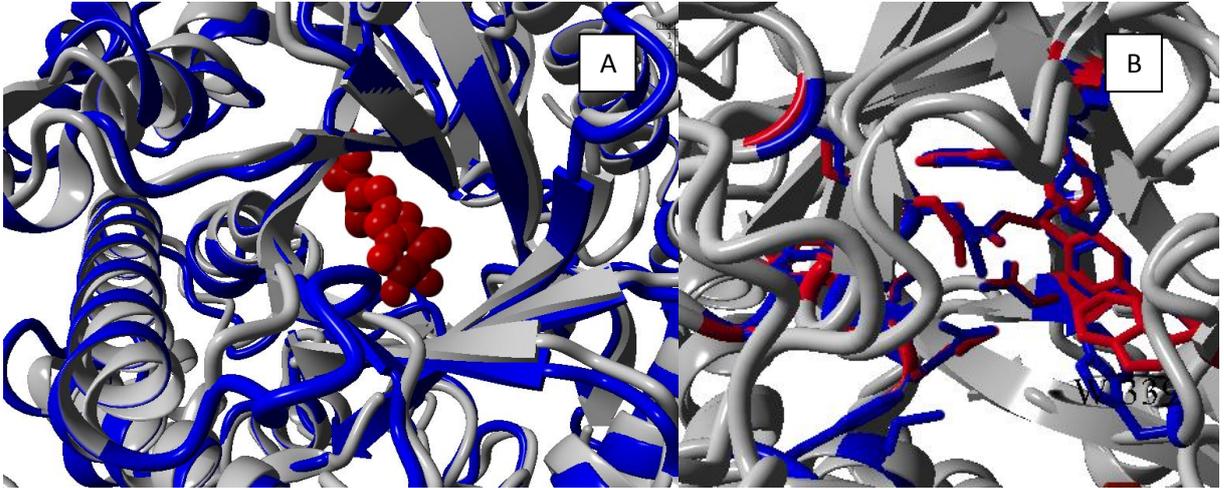
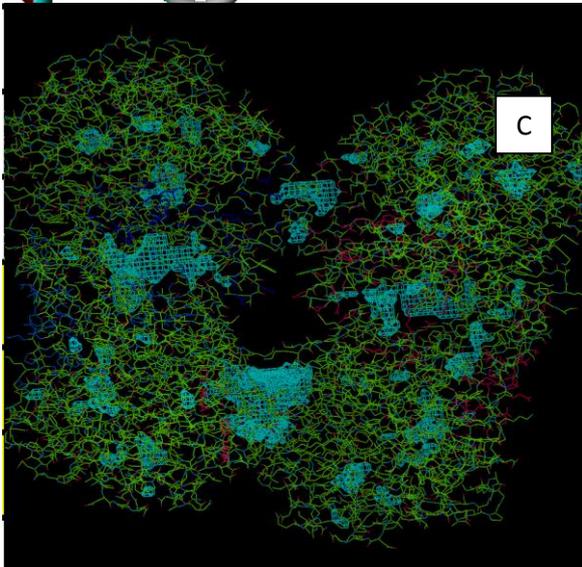
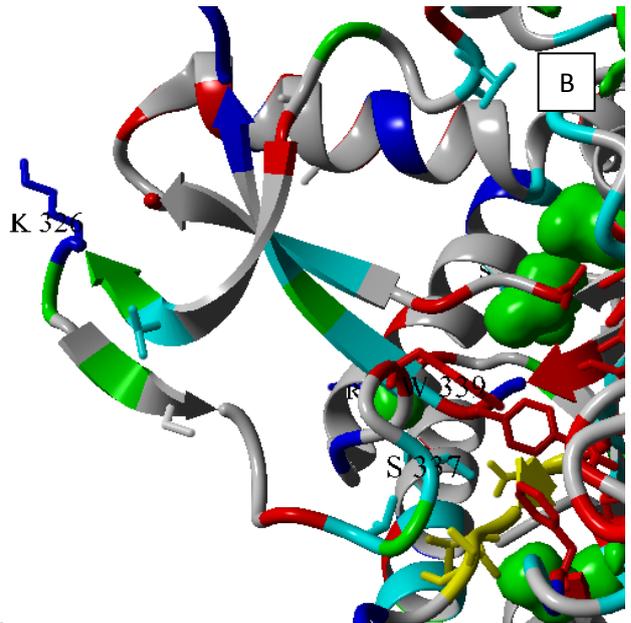
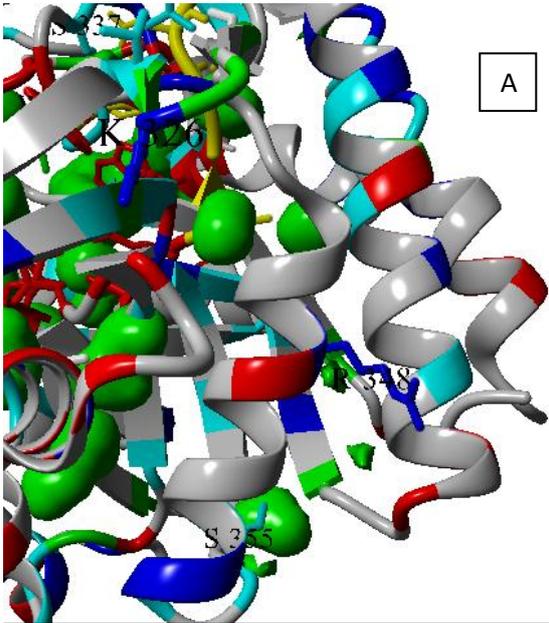


Figura 28 Alinhamento estrutural dos PDBs: 2CER e de 3AHY. (A) 2CER em cinza e 3AHY em azul, ligante do sítio ativo em vermelho. (B) Resíduos do sítio ativo alinhados, resíduos de 3AHY (azul) e os resíduos de 2CER (vermelho). Resíduo não alinhado W339.

Jeng et al. (2012) reportou o W339 da Bgl2 de *T. reesei* possuindo a mesma posição estrutural que o W374 de *N. koshunensis*, e ainda reportou a estrutura do sítio ativo da  $\beta$ -glicosidase de *N. koshunensis* com alta similaridade para a Bgl2 de *T. reesei* com apenas dois resíduos diferentes, uma metionina (M207) no lugar de uma fenilalanina (F179), e uma treonina (T192) no lugar de uma cisteína (C168). Como estas duas enzimas são estimuladas por glicose e são enzimas de organismos filogeneticamente distantes, estes dados supracitados confirmariam o envolvimento destes resíduos no estímulo da atividade por glicose (JENG et al. 2012). Ao analisarmos a região que contém o W339, nos resultados da Figura 25, podemos notar que a Bgl2 de *T. viride* (a qual possui 90% de similaridade com Bgl2 de *T. reesei*), apenas difere da Bgl2 de *T. reesei* na sequência que inicia em T312 e termina em T355. Nota-se que nesta região de Bgl2 de *T. viride* existe uma repetição de resíduos de Serina e Treonina, onde a glicose poderia se ligar. Isto explicaria o aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica à pressão atmosférica na presença de glicose

como reportado por Maguire (1976). Ao analisarmos os resíduos idênticos de glicosilação nesta região para as sequências de Bgl2 de *T. viride* e de *T. reesei*, alguns resíduos de Bgl2 de *T. viride* foram encontrados como similares em 3AHY de *T. reesei*, tais como T315, T324, K326, C330, T335, S337, S340 e R348. Treoninas e serinas são aminoácidos alcoólicos e envolvidos nos processos de glicosilação, lisina (K) e arginina (R) são envolvidos em processos de glicação, e cisteína é extremamente reativa podendo promover ligações. Como não existem estruturas reportadas para a Bgl2 de *T. viride*, as estruturas de Bgl2 de *T. viride* e de *T. reesei* não foram alinhadas no YASARA, contudo, o PDB de 3AHY foi utilizado para análise das sequências de aminoácidos similares (Figura 29 A e B). Pode-se notar que W339 é próximo a S337, a ligação da glicose a S337 ou a outros resíduos desta parte da sequência (como T315, T324, K326, C330, T335, S337, S340 e R348) provocaria o deslocamento da cadeia lateral de W339 para uma posição mais ativa. Observou-se também que S337 e T335 são próximos à região interna de *N*-glicosilação (N368-G369-T370), o que aumenta a possibilidade de glicosilação e uma mudança conformacional do sítio ativo.

A Bgl2 de *T. reesei* é uma molécula formada por 4 subunidades e ao analisarmos a presença de suas cavidades, usando WHAT IF, foi encontrado que a região de aminoácidos estudada em questão (A312-G359 em *T. reesei*/T312-T355 em *T. viride*) é localizada próxima às cavidades da proteína (Figura 29 C), ainda, estas cavidades e estes aminoácidos foram encontrados na região de interação hidrofóbica (Figura 29 D). A análise utilizando WHAT IF demonstrou que os resíduos de números: 314, 315, 318, 326, 327, 339, 342, 345, 348, 349,352, 353, 355,356, 359, 360, 361 são próximos ou embebidos nas cavidades. Assim os resíduos T315, K326, R348 e S355 podem ser importantes resíduos no aumento da atividade de Bgl2 (Figura 29 A e B). Usando YASARA alguns resíduos tais como T324, K326 e C334 foram encontrados na região de interação hidrofóbica com ausência de cavidades, porém em uma região  $\beta$ -pregueada interna hidrofóbica que poderia ser acessada por HHP (Figura 29 B).



D

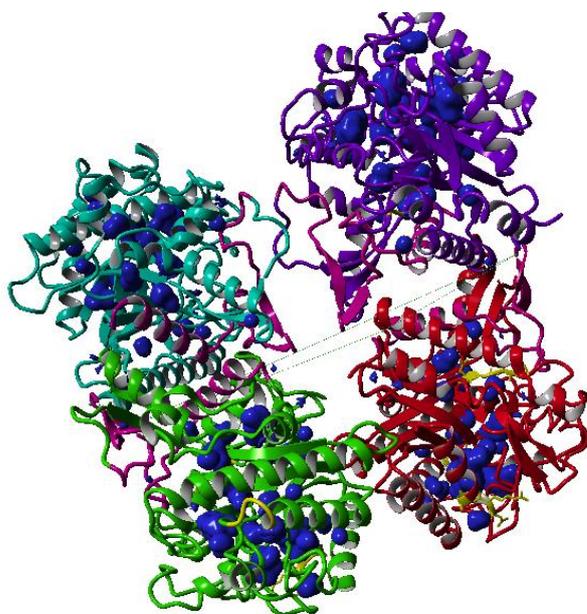


Figura 29 Análise dos resíduos de aminoácidos de 3AHY (A312 - G359 em *T. reesei*/T312-T355 em *T. viride*). (A) Resíduos hidrofílicos (azul escuro, verde, vermelho), resíduos alcoólicos (azul claro), resíduos hidrofóbicos (cinza) e cavidades (verde). Cadeias laterais de treoninas (T) e serinas (S) (azul cian), argininas e lisinas (azul escuro) e cisteína (cinza). *N*-glicosilação (amarelo). (C) Cavidades (azul) visualizadas no WHAT IF próximas à região (A312 - G359). (D) 3AHY e suas quatro subunidades, a região pontilhada demonstra a região de interação hidrofóbica, região em rosa demonstra a região A312-G359, cavidades (azul).

Sabe-se que a pressão é capaz de romper as interações hidrofóbicas das proteínas. Contudo, neste estudo provavelmente quando a HHP acessa as cavidades e as regiões de interação hidrofóbicas durante as flutuações conformacionais, concomitantemente os carboidratos podem se ligar às regiões de glicosilações, o que estabilizaria a proteína, ou mudaria sua estrutura para uma mais ativa. A ligação dos carboidratos a essa região provavelmente impede o rompimento das interações hidrofóbicas (BOONYARATANAKORNKIT et al. 2002).

As  $\beta$ -glicosidases de 2CER e 3APG, respectivamente  $\beta$ -glicosidases com duas subunidades e quatro subunidades, tiveram suas atividades aumentadas por pressão a 250 MPa e 100 MPa respectivamente. Hamon et al. (1996) reporta que provavelmente o substrato ao se ligar à proteína foi capaz de manter a estabilidade das  $\beta$ -glicosidases de *S. sulfotaricus* (2CER). Li et al. (2012) reportou que o

carboidrato xilana seria capaz de estabilizar xilanases de *T. reesei*, tornando-as resistentes à pressão. Estas enzimas possuem duas subunidades, o que em condições de HHP poderia levar à quebra das interações hidrofóbicas, contudo a presença do carboidrato xilana impediu esta desnaturação. Parodi and Souza (1995) também reportaram que muitas das desordens conformacionais, tais como as de exposição de grupos hidrofóbicos, foram encontradas como potenciais aceptores de glicose. Hong et al. (2006) reportou que regiões hidrofóbicas de Bgl2 de *Thermoascus aurantiacus* são requeridas como ligante para hiperativar esta enzima à partir de solventes orgânicos. Taylor et al. (2011) demonstrou por investigação computacional que uma mutação na região de CBMs, com a substituição de resíduos de tirosina por de triptofano (W) (aminoácido hidrofóbico), aumentou a afinidade de ligação por carboidratos. Este aminoácido possuiu alta afinidade de ligação aos carboidratos, e a sua ligação com resíduos de manose ou de glicano foi reportado por modificar fortemente os padrões de glicosilação das CBMs, aumentando a afinidade pelos carboidratos e a atividade celulásica.

Os resultados de bioinformática demonstraram que regiões hidrofóbicas e de glicosilações das  $\beta$ -glicosidases poderiam estar envolvidas com o aumento da atividade em condições de HHP na presença de glicose. Assim, as atividades celulásicas totais das celulasas precipitadas de fungos isolados e de celulasas comerciais foram testadas na presença de glicose ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), e o aumento foi alcançando usando HHP (Figura 30). Este efeito possivelmente seria devido à ligação do monossacarídeo a uma região específica de glicosilação na  $\beta$ -glicosidase, provocando o aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica e da sua atividade celulásica total (NASCIMENTO et al. 2010).

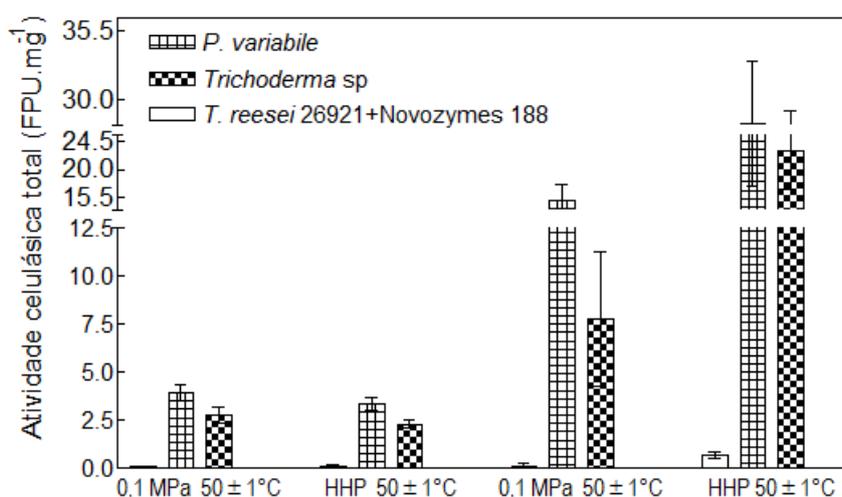


Figura 30 Atividade celulásica total. (1,2) Ausência de glicose. (3,4) Presença de glicose na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>(55 mM). (2,4) 300 MPa a 50 ± 1 °C. (1,3) 0,1 MPa a 50 ± 1 °C. (p<0,05).

Assim a HHP poderia ser um mecanismo para aumentar a sacarificação da biomassa, e ainda, visto que a HHP pode acessar regiões hidrofóbicas de enzimas e que pouco se conhece a cerca do potencial destas regiões, a mesma poderia funcionar como uma ferramenta para selecionar sequências polipeptídicas interessantes para o melhoramento e o aumento destas atividades enzimáticas (BOONYARATANAKORNKIT et al. 2002).

#### 4.6 APLICAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA PARA HIDRÓLISE CELULÁSICA DA CASCA DE COCO

##### 4.6.1 Remoção da lignina (deslignificação ou pré – tratamento)

O pré - tratamento com hidróxido de sódio foi capaz de reduzir a quantidade de lignina contida nas fibras em até 90%. Este tipo de processo tem sido muito utilizado para remover a lignina para produção de etanol celulósico. Sukumaran et al. (2009) reportou a produção de etanol à partir do bagaço de cana e de cascas de arroz, usando o pré-tratamento alcalino. Atualmente o mesmo foi reportado para produção de etanol da casca de coco, porém muito mais severo, utilizando até três vezes mais a concentração de NaOH do que o utilizado neste trabalho, e por um

tempo de até 3 horas (VAITHANOMSAT et al. 2011). A deslignificação alcalina remove grande parte da xilana, polímero da hemicelulose, diminuindo desta maneira com grande eficiência a lignina. Assim, a celulose é mais exposta aos ataques enzimáticos das celulasas, aumentando a hidrólise e a liberação de glicose para a fermentação. De acordo com a literatura o tratamento alcalino produz uma quantidade menor de inibidores da hidrólise e da fermentação do que o tratamento ácido, por ser um tratamento mais brando, liberando menor concentração de ácidos aromáticos, catecol, 4-hidroxibenzaldeído e vanilina solúveis. A saponificação (pré - tratamento hidrotérmico alcalino) em condições brandas, isto é, menor que 140 °C, induz a clivagem de ligações éster que une os ácidos fenólicos. A substituição nucleofílica do grupamento acil da ligação éster ocorre com a reação do hidróxido de sódio, para formar um sal carboxílico e um álcool à temperatura ambiente (Figura 31) (PEDERSEN et al, 2010).

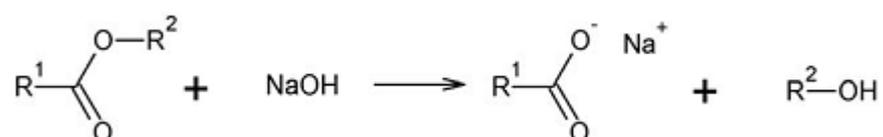


Figura 31 Reação de saponificação, formação de sal carboxílico e álcool. Fonte: Pedersen et al. (2010).

As ligações de éter que ligam os lignols na matriz de lignina, contudo, são clivadas cataliticamente somente a altas temperaturas, sendo a extensão de clivagem dependente também da alcalinidade e temperatura (PEDERSEN et al. 2010). A metodologia usada para o pré-tratamento neste trabalho utiliza dessas duas etapas citadas acima, uma saponificação à temperatura ambiente e a outra à alta temperatura, o que pode explicar a grande remoção de fenóis por clivagem dos dois tipos de ligações descritas acima.

As fotos de microscopia de varredura de cada etapa do processo de deslignificação são mostradas na Figura 32. Nota-se que as fibras são descamadas aos poucos em cada etapa. As fibras da casca de coco possuem em sua superfície rugosa algumas protruções globulares e pontuações (*pinholes*) (Figura 32, A), e ainda componentes tais como ceras e ácidos graxos que fazem parte do

preenchimento e ligações entre as fibras, além de ésteres de ácidos, tais como os fenóis formando ligações para constituir a lignina, a qual une as fibras de celulose e confere resistência (BISMARCK et al. 2001).

Nota-se que a trituração em moinho de disco vibratório iniciou a descamação na superfície da fibra (Figura 32, B e C), e após o tratamento com NaOH a fibra fica aparentemente mais lisa e tem sua rugosidade suavizada e apresenta porosidades e poros sobre a superfície (Figura 32, D,E,F). Essas perfurações podem ser provenientes da remoção de depósitos gordurosos, chamados de tiloses, das fibras. Estas características das fibras da casca de coco também foram observadas por Bismarck et al. (2001), o mesmo ainda reporta que existe um grande número de depósitos de gordura globulares escondidas abaixo das superfícies não tratadas.

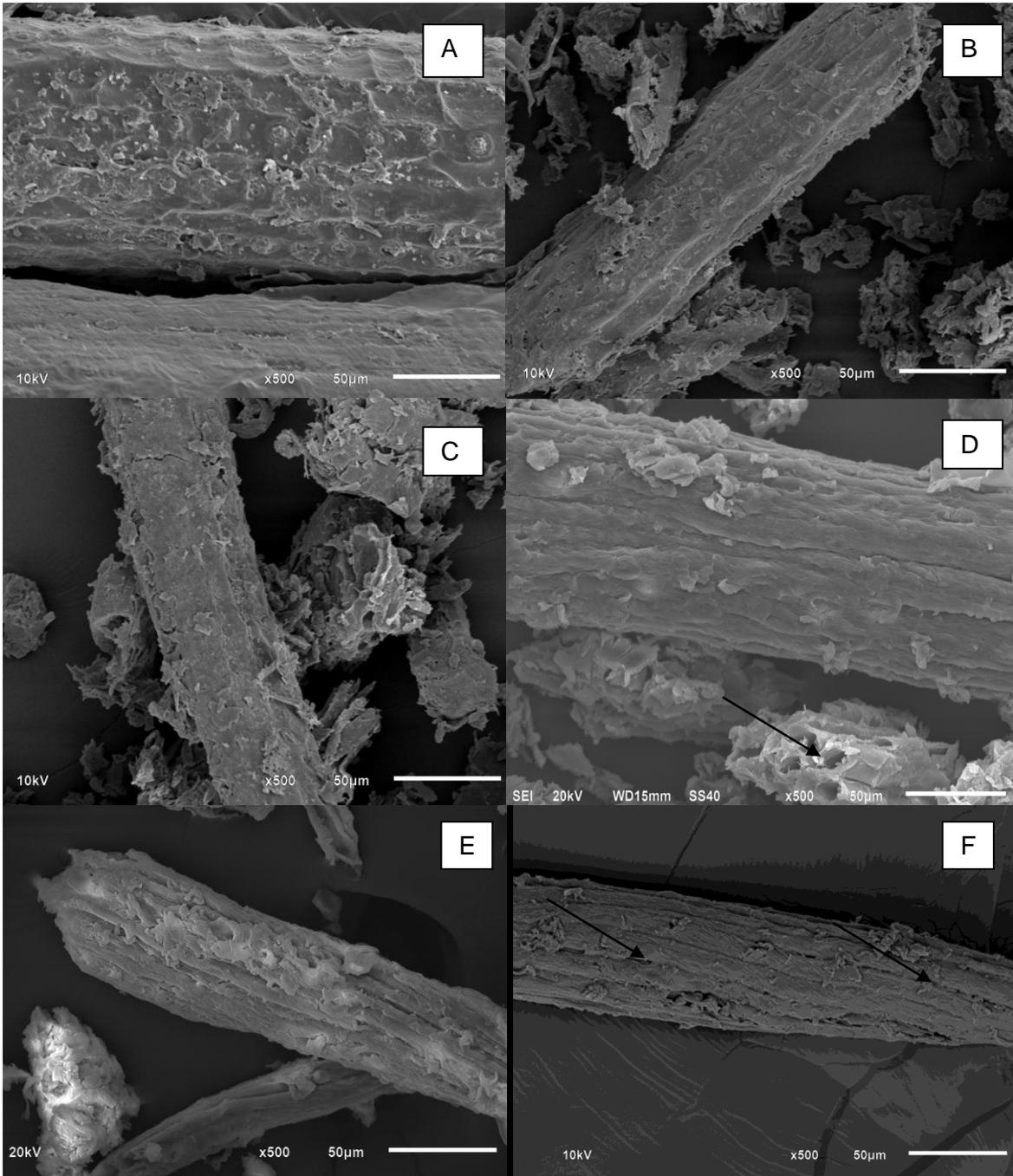


Figura 32 Imagem das fibras da casca de coco em diferentes etapas do processo de deslignificação. (A) Fibra da casca de coco sem triturar. (B) Fibra da casca de coco triturada. (C) Fibra da casca de coco triturada e lavada com água destilada. (D) Fibra da casca de coco deslignificada com NaOH 2,5 M, presença de porosidade no interior da fibra (seta). (E) Fibra da casca de coco deslignificada com NaOH 2,5 M, presença de escamas. (F) Fibra da casca de coco deslignificada com NaOH 2,5 M, presença de furos na superfície (seta).

A medida do comprimento e largura das fibras após o pré-tratamento demonstrou uma distribuição do comprimento das mesmas em torno de 100 a 500  $\mu\text{m}$  e uma largura em torno de 20 a 40  $\mu\text{m}$  (Figura 33). Silva et al. (2010) reportou que fibras de bagaço e palha de cana também foram pré-tratadas e trituradas em moinhos de discos vibratórios. Este tratamento foi capaz de desfibrilar e minimizar a modificação das fibras de celulose, ou degradação, quando comparado ao tratamento com moinho de bolas. Nesse relato a distribuição do comprimento das fibras foi em torno de 20 a 65  $\mu\text{m}$ , assim fibras com menores modificações estruturais foram alcançadas usando o moinho de disco. Estes dados corroboram com os alcançados neste trabalho, pois uma menor modificação estrutural foi alcançada ao utilizar também moinhos de discos. Além disso, os comprimentos das fibras de celulose alcançadas neste trabalho foram maiores do que os reportados por Silva et al. (2010). As fibras da casca de coco deslignificadas apresentaram comprimentos semelhantes aos das fibras de celulose comercial (sigma), a qual apresentou comprimento em torno de 100 a 600  $\mu\text{m}$  (Figura 33). Porém com relação à largura, as duas fibras não demonstraram semelhança, a comercial apresentou uma largura em torno de 19 a 23  $\mu\text{m}$ . Podemos assim dizer que as fibras de coco após a deslignificação apresentaram menor degradação, e que a maior largura caracteriza a menor desfibrilação.

Um exemplo de obtenção de desfibrilação é mostrado na Figura 41, em que as pontes de hidrogênio entre as fibrilas de celulose foram rompidas, caracterizando a obtenção de uma menor largura nas fibras. A quebra das pontes de hidrogênio entre as fibras poderia levar à obtenção das microfibras de celulose, com larguras similares ao da celulose comercial (sigma). Na verdade, fibras de celulose provenientes das fibras da casca de coco com tamanhos similares à celulose comercial (sigma), foram obtidas a partir das fibras deslignificadas provenientes da polpação reportada neste trabalho, produto obtido juntamente ao projeto VALE. Estes fatos demonstram que as fibras foram menos degradadas. A obtenção dos comprimentos ideais foi devido ao tempo de trituração em disco vibratório, cerca de 5 minutos, o que determinou a menor degradação. Estes dados corroboram com os

reportados por Ding et al. (2012), o autor reportou que os melhores pré-tratamentos para hidrólise enzimática são aqueles capazes de remover a lignina sem modificar a estrutura microfibrilar nativa da celulose. Portanto, o pré-tratamento reportado neste trabalho foi capaz de remover uma grande parte da lignina e de manter comprimentos consideráveis sem grandes modificações na estrutura da fibra de celulose. Podemos assim dizer que o tratamento foi capaz de manter a estrutura cristalina da celulose eficientemente, porém que necessita de modificações quanto à melhoria da perda de carboidratos. As amostras obtidas do pré-tratamento foram então utilizadas para os testes de hidrólise enzimática em condições de alta pressão hidrostática.

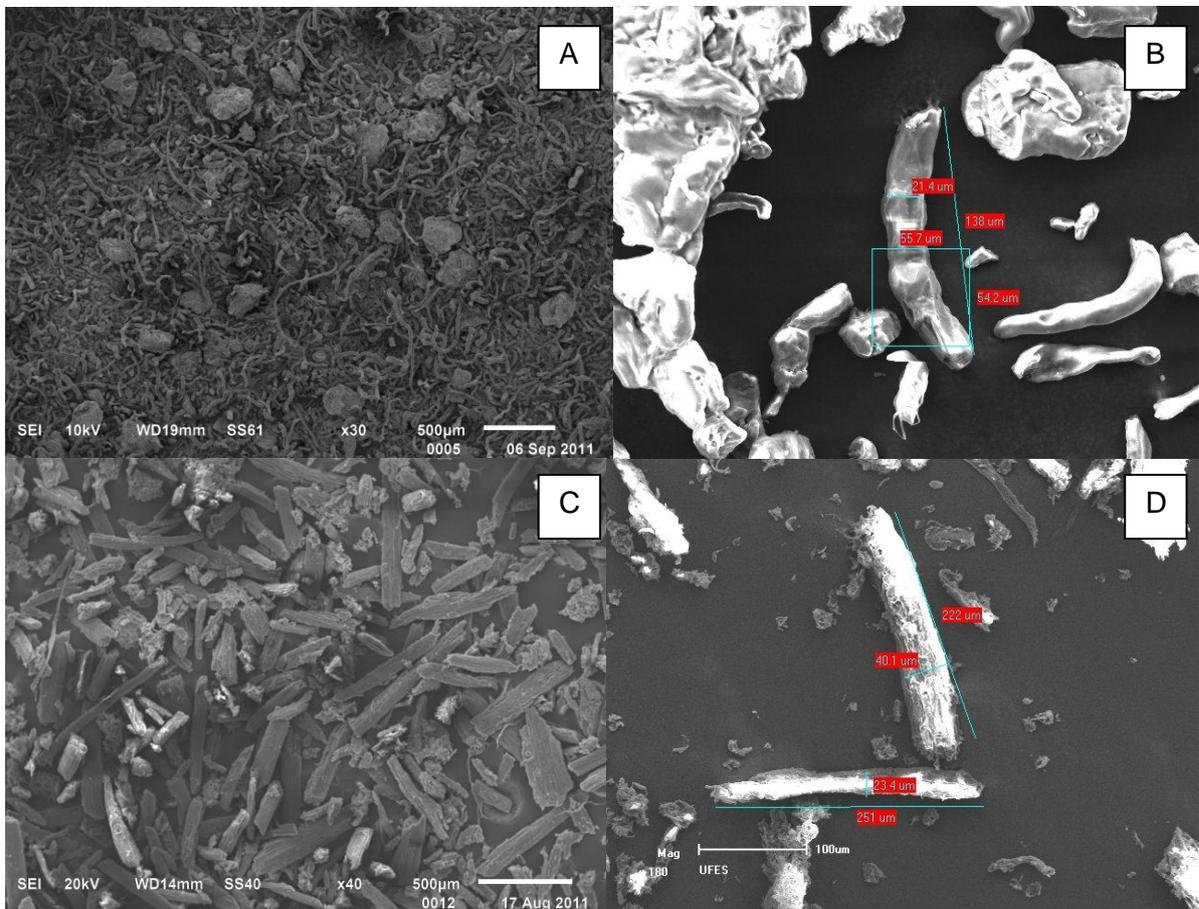


Figura 33 Imagem demonstrando a distribuição do tamanho das fibras em celulose comercial (sigma) (A) e em fibras da casca de coco deslignificada (C). Medidas dos comprimentos e das larguras das fibras tratadas com NaOH 2,5M (D) e das fibras de celulose comercial (sigma) (B) .

#### 4.6.2 Estudo do efeito da alta pressão hidrostática nas fibras da casca de coco e em celulasas padrões

O efeito da alta pressão hidrostática foi analisado na casca de coco e em celulasas padrões. Para os ensaios foram utilizadas as enzimas padrões de *T. reesei* RUTC 30 e de *A. niger*. A hidrólise das fibras da casca de coco deslignificadas usando HHP foi significativamente maior do que na pressão atmosférica, quando o substrato e as enzimas foram incubados juntamente em HHP a  $50 \pm 1$  °C (Figura 34, 1 e 5). Um aumento similar, embora menos pronunciado, foi igualmente notado quando a incubação em HHP foi realizada em  $22 \pm 1$  °C (Figura 34, 1 e 4). Contudo, quando somente o substrato (Figura 34, 2) ou enzimas (Figura 34, 3) foram pressurizados antes da incubação em HHP, nenhum aumento de hidrólise foi observado.

Este efeito sugere que os benefícios da HHP são reversíveis. Nossos resultados estão de acordo com os reportados por Salvador et al. (2010), em que a pressão não aumentou a atividade celulásica total de *A. niger*, quando os substratos e enzimas foram pressurizados separadamente antes de serem incubados à pressão atmosférica. No presente trabalho uma alta hidrólise enzimática das fibras da casca de coco deslignificadas usando HHP foi alcançada com as celulasas de *T. reesei* RUT C30 e *A. niger*, produzidas em fermentação submersa, com níveis significativamente acima daqueles alcançados com as enzimas individualmente. Estes resultados sugerem um efeito da pressão na conformação das enzimas, e que este efeito é reversível quando a enzima é pressurizada e incubada à pressão atmosférica. Os aumentos de atividades enzimáticas são reportados como uma consequência do efeito da pressão no substrato, enzima ou tampão (EISENMENGER; CORCUERA, 2009).

Assim, as fibras da casca de coco deslignificadas (o substrato) também foram pressurizadas separadamente, na ausência de enzimas, e observou-se um efeito da HHP na hidrólise da mesma (Figura 35 A e B). Os dados sugerem que ocorre uma quebra do substrato, diferentemente dos resultados reportados para a hidrólise de polissacarídeos e lignina do pericardo dos frutos de 'longan', em que

autores relatam a ausência de um efeito da pressão na hidrólise destes compostos (YANG et al. 2009).

Ensaio de hidrólise do substrato na ausência de celulases demonstraram um pequeno aumento na liberação de açúcares redutores em condições de alta pressão hidrostática quando comparado à pressão atmosférica (Figura 35, A). Porém, com relação à concentração de fenóis, notou-se um aumento significativo na sua liberação após a aplicação da pressão por 30 minutos (Figura 35, B).

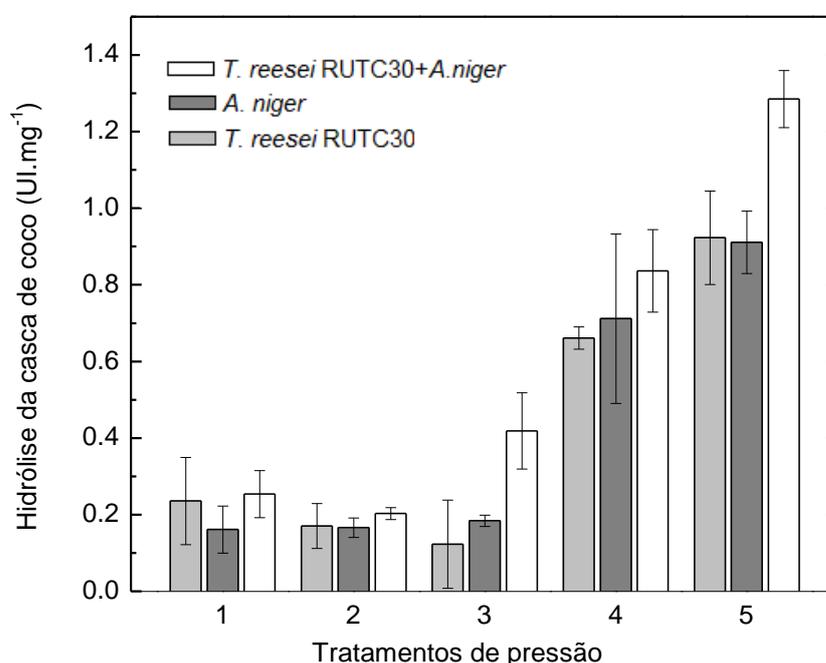


Figura 34 Hidrólise das fibras da casca de coco desdesignificadas em diferentes condições de pressão e temperatura. 1: incubação a 0,1 MPa em  $50 \pm 1$  °C; 2: substratos pressurizados a  $22 \pm 1$  °C, e após incubados com as enzimas não pressurizadas a 0,1 MPa em  $50 \pm 1$  °C; 3: enzimas pressurizadas a  $22 \pm 1$  °C, e após incubadas com substratos não pressurizados a 0,1 MPa em  $50 \pm 1$  °C; 4: substratos incubados com enzimas em HHP a  $22 \pm 1$  °C; 5: substratos incubados com enzimas em HHP a  $50 \pm 1$  °C. ( $p < 0,05$ ).

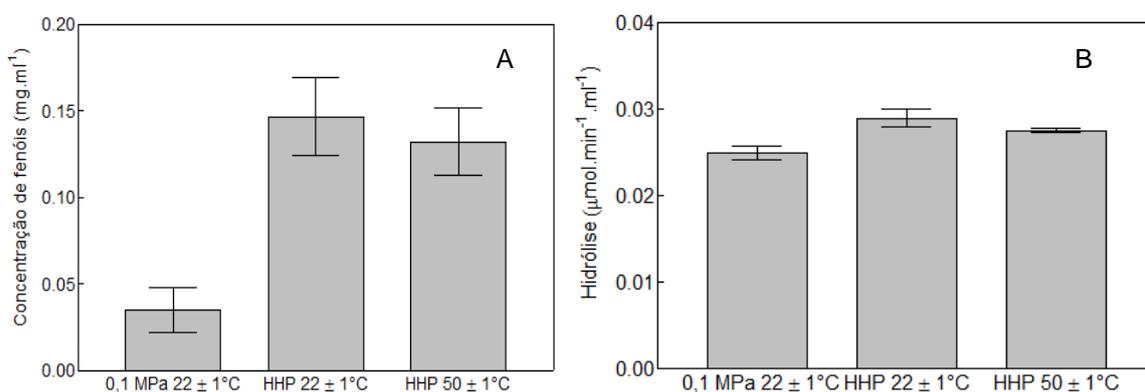


Figura 35 Hidrólise das fibras da casca de coco deslignificadas durante a aplicação de pressão por 30 minutos, na ausência de celulases. (A) Concentração de fenóis. (B) Açúcares redutores.

A maior concentração de fenóis liberada em condições de HHP, após 30 minutos, demonstrou a ação da compressão exercida pela HHP sobre a lignina, hidrolisando este composto fenólico. Quando observamos a liberação de açúcares redutores usando HHP é notável o menor efeito da pressão na hidrólise, o que provavelmente comprova a ação inicial sobre a camada externa de lignina, clivando-a, para posteriormente ter acesso às fibras de celulose ou hemicelulose.

Atualmente a utilização da HHP para a hidrólise das fibras de polpa Kraft de *Eucalyptus globulus* foi reportada, estas fibras foram pré-hidratadas por um período de 24 horas e após este período foram pressurizadas por um tempo de até 45 minutos. Após o tratamento de pressão esta polpa foi incubada à pressão atmosférica com as enzimas xilanases e a desagregação das fibras foi aumentada (OLIVEIRA et al. 2012).

Nos resultados do presente trabalho foram utilizadas as fibras da casca de coco deslignificadas, as fibras não necessitaram de uma pré-hidratação para que o efeito de hidrólise em condições de pressão hidrostática ocorresse. Foi utilizado o mesmo tipo de tampão, acetato de sódio, contudo, este é o primeiro relato de hidrólise das fibras da casca de coco verde deslignificada usando alta pressão.

Observando as imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 36 B) das fibras de casca de coco deslignificadas e tratadas com pressão, verificou-se que existe uma pequena ruptura nas estruturas das fibras da casca de coco quando a

pressão é aplicada por 30 minutos, o que corrobora com os resultados citados anteriormente neste trabalho, de liberação de fenóis e de açúcares redutores.

A resistência à tração, ou tensão de ruptura das fibras da casca de coco foi reportada em torno de 131 – 175 MPa (BISMARCK et al. 2001; CORRADINI et al. 2009), assim possuindo as fibras da casca de coco vasta porosidade, suas fibras seriam facilmente rompidas em uma pressão superior aos valores supracitados, o que confirma os resultados.

É interessante lembrar que a HHP é uma força de compressão e que com a diminuição do volume, a água pode entrar pelos poros e aberturas das fibras, aumentando a hidratação da fibra e facilitando o rompimento da sua parede celular por quebra das ligações de hidrogênio (OLIVEIRA et al. 2012).

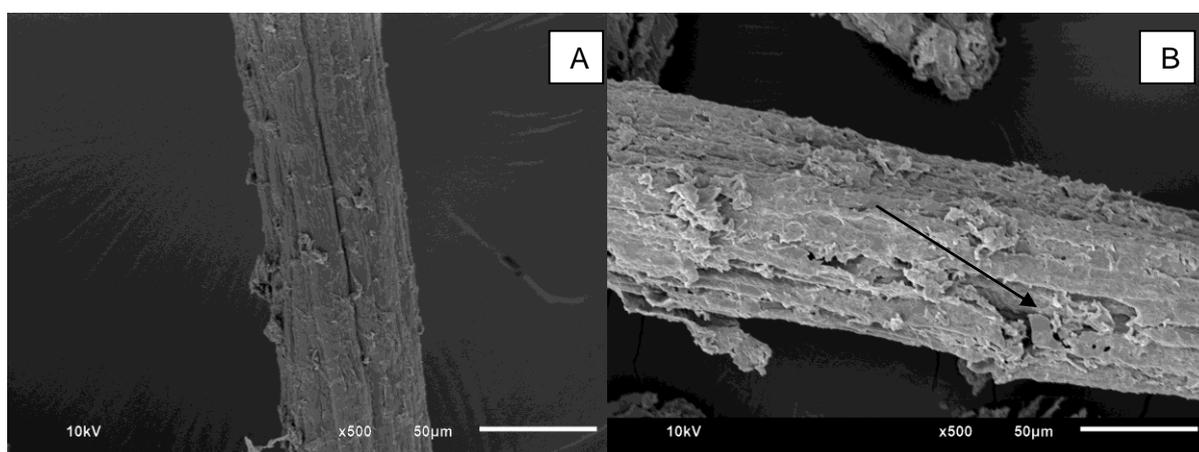


Figura 36 Imagem das fibras da casca de coco deslignificadas rompidas após o efeito da pressão hidrostática por 30 minutos, na ausência de celulases. (A) 0,1 MPa. (B) 300 MPa, ruptura em regiões porosas (seta).

Com isso, parece que concomitantemente à desagregação e ruptura das fibras da casca de coco pela HHP, regiões internas ou cristalinas (hidrofóbicas) da celulose são expostas, aumentando a hidrólise. Ding et al. (2012) reportou que algumas celulases tais como CBH I de *T. reesei* e CipA de *Clostridium thermocellum* são capazes de se ligarem a regiões hidrofóbicas da celulose cristalina por contatos hidrofóbicos. As enzimas CBH I e CipA possuem regiões de ligação aos

carboidratos, respectivamente, regiões do tipo CBM e 'cohesin', sendo a 'cohesin' um domínio da glicoproteína 'scaffoldin' que faz parte do complexo 'cellulosome' (celulases) de bactérias (Figura 37). Ainda, Ding et al. (2012) reportou que essas regiões hidrofóbicas da celulose são denominadas de 'CEF' (Fibrilas Elementares de Celulose) e que duas CEFs podem ser unidas horizontalmente em uma macrofibrila via suas regiões hidrofílicas. CEFs também são conectadas à hemicelulose de microfibrilas a fim de constituir uma macrofibrila por conexão com outras microfibrilas de celulose, a região entre duas microfibrilas é constituída por hemicelulose e lignina. Assim, provavelmente, a pressão ao agir nas macrofibrilas das fibras de coco, foi capaz de romper as ligações de hidrogênio e hidratar as regiões mais internas. A HHP também pode romper as ligações entre fenóis, hemicelulose e celulose, provocando desagregação das macrofibrilas o que liberou os fenóis (Figura 36 B).

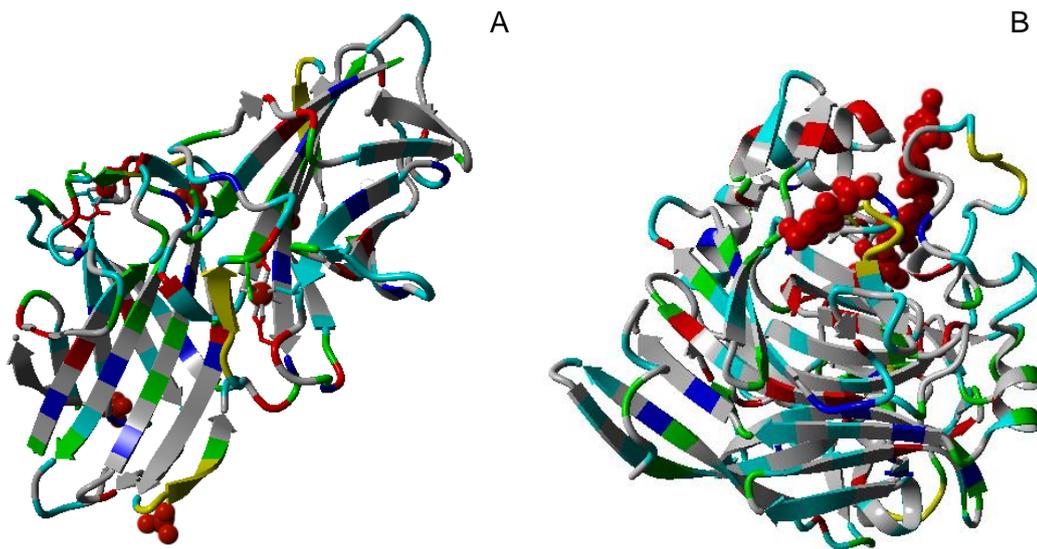


Figura 37 Análise das estruturas de CipA (PDB:4B9F) e (PDB:1Q2E) reportadas por Ding et al. (2012) com função de ligação à CEF. (A) CipA, 'Scaffoldin-cohesin' de *C. thermocellum*, cellulase tipo CBM (CtCBM3) 'cellulosome'. (B) CBH 1 de *T. reesei*, cellulase tipo CBM (TrCBM1). Em azul regiões ricas em aminoácido alcoólicos (Treonina, Serina e Tirosina), em amarelo região de N-glicosilação (N-X-T/S), em cinza regiões hidrofóbicas, regiões hidrofílicas (vermelho, verde e azul escuro) e ligantes do sítio ativo em vermelho.

Ao desagregar as microfibrilas a pressão pode expor regiões internas do tipo CEFs (regiões apolares) e proporcionar a ligação das regiões hidrofóbicas das celulasas a essas regiões da celulose através de interações hidrofóbicas. Altos valores de pressão são capazes de mudar a conformação das enzimas, assim, junto a este evento, a pressão poderia acessar os resíduos hidrofóbicos das proteínas em suas cavidades, expondo-os para se ligar aos carboidratos, aumentando assim a atividade e ganhando estabilidade. A análise da estrutura das celulasas citadas por Ding et al. (2012) demonstrou um perfil semelhante ao das análises das estruturas anteriores citadas neste trabalho, com regiões de glicosilação próximas ao sítio ativo e ricas em treoninas e serinas, em estruturas  $\beta$ -pregueadas, porém estas regiões são externas (Figura 37).

Visto a repetição dos padrões de regiões de *N*-glicosilação próximos ao sítio ativo, como o observado nos resultados da Figura 37, podemos dizer que este padrão estaria relacionado com o aumento da atividade em condições de HHP, portando regiões e funções semelhantes a celulasas que possuem CBMs.

#### *4.6.3 Hidrólise celulásica das fibras da casca de coco deslignificadas utilizando pressão hidrostática e celulasas dos fungos isolados da casca de coco verde*

A maior hidrólise das fibras da casca de coco deslignificadas foi alcançada usando alta pressão e as celulasas em mistura, incubados em condições de HHP e temperatura (Figura 34, 5). Assim este tratamento foi escolhido para posteriores hidrólises usando as celulasas dos fungos isolados da casca de coco verde. O efeito dos vários extratos brutos celulásicos fúngicos (produzidas em fermentação submersa) nas fibras da casca de coco, foram investigados em condições de alta pressão hidrostática durante um período de 30 minutos (Figura 37).

A taxa de hidrólise mais eficiente foi alcançada usando celulasas do fungo *P. variable* e de *Trichoderma* sp, em condições de pressão atmosférica e de alta pressão hidrostática (Figura 37). Este resultado era esperado, pois o isolamento dos fungos foi realizado a partir do mesmo substrato. Assim podemos dizer que as celulasas destes fungos podem ser resistentes a fenóis, e também podem ser

específicas para o substrato a ser hidrolisado, possuindo regiões de reconhecimento como um mecanismo (RATH; HERNDL, 1994). A adição de celulasas de *A. niger* ao complexo celulásico de *Trichoderma* sp aumentou sua hidrólise nas condições de alta pressão hidrostática. Igualmente, a hidrólise da casca de coco realizada individualmente por celulasas de *A. niger* também foi aumentada na pressão.

A adição de celulasas de *A. niger* ao complexo celulásico de *Trichoderma* sp foi realizada devido ao fato deste possuir baixa atividade  $\beta$ -glicosidásica. Observou-se que usando a HHP a atividade desta mistura foi aumentada, provavelmente devido ao fato de que a atividade  $\beta$ -glicosidásica de *Trichoderma* sp foi aumentada na mesma condição de pressão, e o somatório das duas atividades  $\beta$ -glicosidásicas (*A. niger* + *Trichoderma* sp) aumentou a hidrólise (Figura 38).

Porém, em condições de HHP e em pressão atmosférica, a hidrólise realizada por esta mistura foi semelhante a da mistura dos fungos padrões. Provavelmente, o aumento das atividades  $\beta$ -glicosidásicas dos fungos *T. reesei* RUT C30, *Trichoderma* sp e *P. variable* em condições de pressão (Figura 18, A), tenha estimulado o aumento das hidrólises pelas celulasas misturadas e individualmente. Contudo, o aumento da hidrólise realizada pelas celulasas de *A. niger*, seria resultado do aumento da atividade endoglicanásica na pressão, já que sua atividade  $\beta$ -glicosidásica permaneceu inalterada ao usarmos HHP.

Assim, um único isolado, *P. variable*, possui o melhor complexo celulásico para a hidrólise da casca de coco (Figura 34), com altas atividades endoglicanásicas e  $\beta$ -glicosidásicas (Figura 18 A e B), em condições de pressão atmosférica e de alta pressão hidrostática.

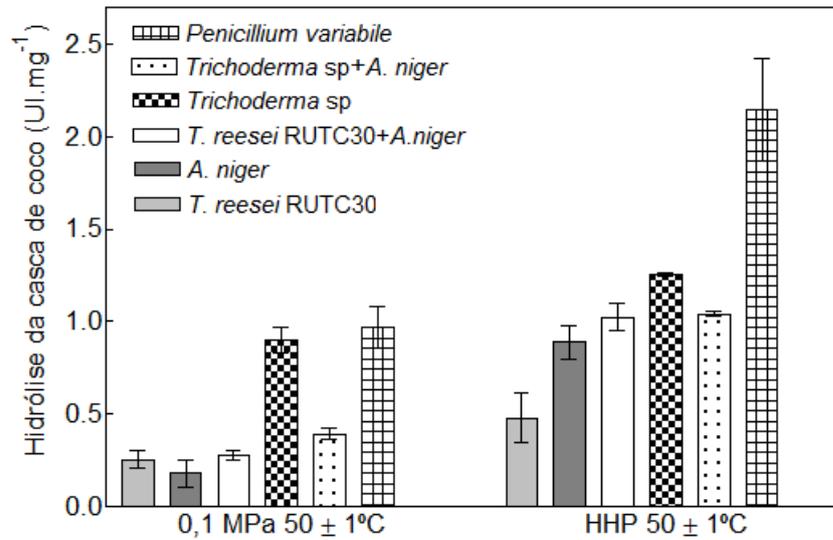


Figura 38 Hidrólise celulásica das fibras da casca de coco designificadas em condições de pressão atmosférica e em alta pressão hidrostática (HHP) ambas a  $50 \pm 1^\circ C$ , usando as celulasas dos isolados fúngicos e dos fungos padrões ( $p < 0,05$ ).

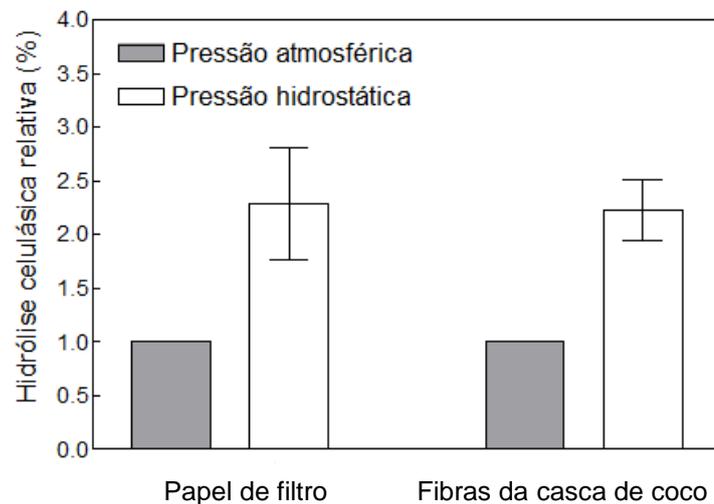


Figura 39 Média das atividades relativas de todas as hidrólises celulásicas a  $50 \pm 1^\circ C$ , utilizando as celulasas dos fungos isolados e dos fungos padrões. Papel de filtro (controle) e fibras da casca de coco (substrato lignocelulolítico). ( $p > 0,05$ ).

Em média, em condições de HHP, as taxas de hidrólise celulásica das fibras da casca de coco foram semelhantes às da hidrólise celulásica do papel de filtro

(controle) (Figura 39). A média do aumento da hidrólise celulásica usando HHP foi de cerca de duas vezes maior do que em pressão atmosférica, observou-se que esta atividade do papel de filtro não diferiu estatisticamente da hidrólise celulásica das fibras da casca de coco deslignificadas, o que demonstrou uma hidrólise eficiente.

É reportado que fenóis podem inibir a hidrólise em baixas concentrações que variam de  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ , contudo, é interessante notar que o aumento das hidrólises em condições de alta pressão ocorreu mesmo em presença de fenóis, cerca de  $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 34 B). Compostos fenólicos derivados da lignina são liberados durante a deslignificação, incluindo, ácidos aromáticos, catecol, hidroxibenzaldeído, ácido trans-cinnâmico, ácido hidroxibenzaldeído e vanilina (XIMENES et al. 2008, XIMENES et al. 2010). Estes compostos fenólicos inibem enzimas hidrolíticas por desnaturação e precipitação de endo e exo-celulases, e de  $\beta$ -glicosidases (PANAGIOTOU; OLSSON, 2007; XIMENES et al. 2010). O pré-tratamento alcalino com NaOH, é reportado como um processo para extração de fenóis em alguns resíduos agrícolas, liberando no final do processo, vanilina, ácido ferúlico e ácido p-cumárico solúveis, potenciais inibidores da hidrólise e fermentação (MAZZA; BURANOV, 2009).

Ao compararmos a hidrólise utilizando a casca de coco com a hidrólise utilizando papel de filtro (na qual não existiu presença de fenóis) (Figura 18 C e Figura 38), notou-se que as duas hidrólises para cada celulase fúngica, liberaram em média a mesma quantidade de açúcar redutor por miligrama de proteína (Figura 39). No trabalho, vanilina foi encontrada dissolvida no sobrenadante da reação de hidrólise em uma concentração que variou de  $1,58 - 1,75 \text{ mg.L}^{-1}$ , porém esta concentração não foi suficiente para inibir a reação de hidrólise das fibras da casca de coco após 30 minutos. Ximenes et al. (2010) reportou que uma taxa de  $4 \text{ mg.mg}^{-1}$  (vanilina.proteína<sup>-1</sup>) foi capaz de reduzir a taxa de hidrólise da celulose em até 50%, a taxa calculada para os resultados neste trabalho foi em torno de  $0,03 \text{ mg.mg}^{-1}$  (vanilina.proteína<sup>-1</sup>), o que novamente reforça o eficiente pré-tratamento. Ainda, foi reportado na literatura a inibição da hidrólise da celulose a partir de  $1 \text{ mM}$  de

vanilina, enquanto o que encontramos no sobrenadante é em torno de 0,01 mM (TEJIRIAN; XU, 2011).

Não foi encontrada a presença de ácido ferúlico no sobrenadante, talvez porque este foi convertido em vanilina durante a reação alcalina para a retirada da lignina. Vanilina pode ser formada da clivagem da dupla ligação da unidade de ácido ferúlico e da ligação éter entre lignina e ácido ferúlico no complexo carboidrato-fenol/lignina. A ausência de ácido ferúlico e a presença de pouca vanilina solúvel no sobrenadante demonstrou que a ligação do ácido ferúlico com os carboidratos foi rompida, e a maior parte da lignina foi então removida, considerando que o ácido ferúlico é o intermediário que faz a ligação da lignina aos carboidratos (MAZZA; BURANOV, 2009).

Normalmente, os fungos do gênero *Trichoderma* não são encontrados possuindo celulasas resistentes a fenóis, característica adquirida pela produção de lacases ou fenoloxidasas, porém podem adquirir respostas adaptativas à biomassa lignocelulósica (KIISKINEN, 2004; DWIVEDI et al. 2011), neste trabalho, *Trichoderma* sp e *P. variable* foram identificados como produtores de fenoloxidasas de acordo com o teste de reação de Bavendamm, o que pode ter auxiliado no aumento da hidrólise e ter conferido à mistura celulásica resistência aos fenóis contidos no substrato utilizado, as fibras da casca de coco. Ainda *Trichoderma* sp e *P. variable* apresentaram altas atividades  $\beta$ -glicosidásicas estimuladas por glicose, o que também poderia desinibir o processo.

Assim, tanto o *P. variable* quanto o *Trichoderma* sp são potenciais candidatos ao isolamento de genes celulolíticos para o melhoramento da produção de celulasas e para fermentação da casca de coco a etanol, visto que estes possuem altas atividades celulolíticas e de hidrólise da casca de coco, além de  $\beta$ -glicosidasas estimuladas por glicose. A expressão em *S. cerevisiae* do gene de  $\beta$ -glicosidasas (Bgl 4) tolerante a glicose, do fungo *Humicola grisea* var. *thermodeia*, foi reportada por Benoliel et al. (2011), porém até então não existe na literatura, a expressão de genes de  $\beta$ -glicosidasas em levedura ou bactérias sendo estimulados por glicose, assim como também não foi encontrado na literatura a transformação de *S. cerevisiae* com genes de fungos decompositores e endofíticos da casca de coco.

As celulasas dos fungos *P. variabile* e de *Trichoderma* sp também são potenciais candidatas à produção comercial, visto que apresentaram maiores atividades celulásicas específicas do que as dos padrões, assim como também maiores atividades de hidrólise da casca de coco usando HHP. Assim a hidrólise celulásica usando alta pressão hidrostática parece ser uma ferramenta eficaz para processos de sacarificação, para obtenção de novos polímeros e para seleção de genes de enzimas com alto potencial para melhoramento (OLIVEIRA et al. 2012).

#### 4.6.4 Sacarificação celulásica utilizando alta pressão hidrostática

Celulasas comerciais foram usadas para a sacarificação enzimática da casca de coco deslignificada em condições de HHP. É reportado na literatura e foi observado nos nossos resultados, que celulasas de *T. reesei* possuem uma baixa atividade  $\beta$ -glicosidásica, o que pode provocar a redução da sua atividade celulásica total, contudo  $\beta$ -glicosidase de Novozymes 188 (*A. niger*) possui uma atividade  $\beta$ -glicosidásica muito superior e libera uma maior concentração de glicose.

Sabendo que a atividade celulásica total das enzimas supracitadas, ou a hidrólise enzimática, podem ser estimuladas pela mistura celulásica de *T. reesei* com Novozymes 188 (*A. niger*), e que a HHP pode estimular a atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. reesei* em presença de glicose, assim como também a atividade endoglicanásica de *A. niger*, seguiu-se os experimentos de sacarificação das fibras da casca de coco deslignificada usando HHP e a mistura dessas enzimas.

Na presença de HHP, em 24 horas, a glicose liberada foi cerca de duas vezes maior do que à pressão atmosférica (Figura 40). Interessante notar que a glicose liberada continuou a ser crescente em condições de HHP até 72 horas, possivelmente pela ativação e estimulação da  $\beta$ -glicosidase de *T. reesei* em presença de glicose, com celobiose sendo convertida em glicose. A liberação de glicose tornou-se constante em torno de 72 horas, provavelmente devido à competição do produto (glicose) e do substrato (celobiose) pelo sítio ativo da proteína, diminuindo a atividade  $\beta$ -glicosidásica em uma concentração de glicose em torno de 8 - 10 mg.mL<sup>-1</sup> (55 mM) (ANDRIÉ et al. 2011). Uma quantidade semelhante

de glicose liberada foi alcançada no trabalho reportado por Gottschalk et al. (2010) utilizando uma mistura de concentrado celulásico de *Aspergillus awamori* e *T. reesei* para a sacarificação do bagaço de cana de açúcar a 2% (p/v) e uma carga enzimática de 10 FPU.g de bagaço pré-tratado, com agitação de 200 rpm à 50 °C por 72 horas.

Mesmo após um período de 96 horas de sacarificação usando HHP, a liberação de glicose continuou maior do que à pressão atmosférica sem agitação. Um dos gargalos da sacarificação é o tempo de hidrólise, a alta pressão hidrostática parece ser uma ferramenta que além de aumentar a hidrólise, antecipa a sacarificação quando comparada com a pressão atmosférica. Possivelmente, a aplicação de HHP juntamente com a agitação reduziria este tempo de hidrólise.

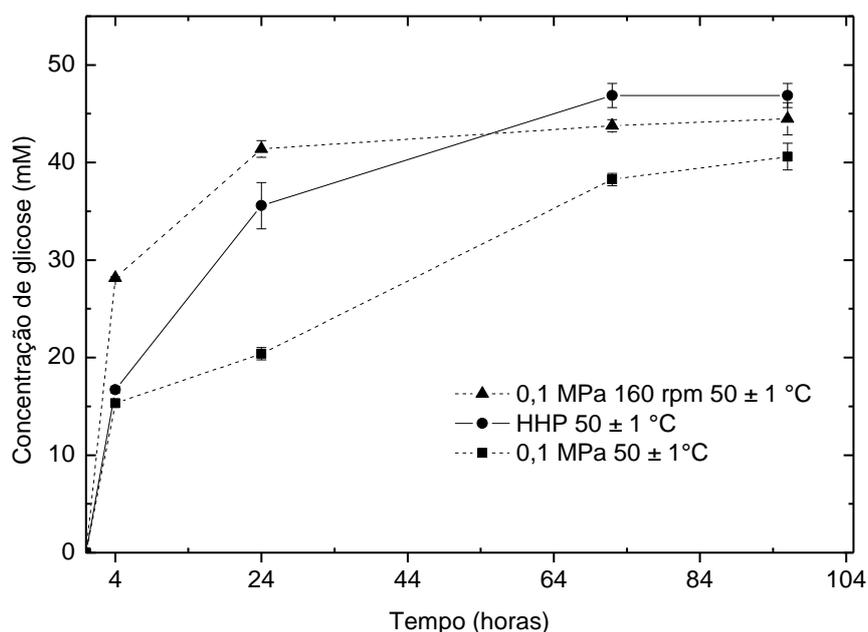


Figura 40 Sacarificação celulásica das fibras da casca de coco designificadas a 50 ± 1 °C, durante um período de 96 horas, usando a mistura de celulases de *T. reesei* e Novozymes 188 (carga enzimática 7,5 FPU.g<sup>-1</sup> de substrato). (p<0,05).

Embora a atividade β-glicosidásica da preparação comercial de *A. niger* não tenha sido aumentada em presença de glicose usando HHP, ela é importante para iniciar a liberação de glicose para o sistema. Assim, este monossacarídeo liberado

poderia estimular a atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. reesei* em condições de HHP nas primeiras horas e conseqüentemente a hidrólise celulásica seria aumentada durante a sacarificação celulásica com o aumento da concentração de glicose. Portanto, esta mistura de enzimas com uma alta atividade  $\beta$ -glicosidásica funcionaria como um mecanismo para aumentar a sacarificação da casca de coco, em condições de alta pressão hidrostática. Assim, nota-se que a liberação de glicose durante a sacarificação é necessária para estimular o processo de aumento da hidrólise. Isto explica o não aumento das atividades celulásicas totais das celulases precipitadas em condições de pressão. Aparentemente, os 30 minutos decorridos não foram suficientes para liberar a quantidade necessária de glicose para estimular o aumento da hidrólise, a qual é iniciada na presença de quantidades superiores a 14 - 15 mM de glicose após 4 horas (Figura 40).

A HHP apresentou-se como uma excelente ferramenta para aumentar a liberação de glicose durante a sacarificação da casca de coco. É notável que a alta pressão hidrostática e a agitação (150 - 160 rpm em pressão atmosférica) produzem equivalentes concentrações de glicose em 96 horas. A agitação aumenta o contato das enzimas com o substrato, aumentando assim a liberação dos açúcares. Este efeito é semelhante ao da pressão, onde a compressão pode aumentar o contato com as enzimas, aproximando a celulase do substrato, porém sem agitação. É reportado na literatura que o tratamento de alta pressão é energeticamente mais econômico, pois o trabalho realizado é principalmente para a compressão, sem ocorrer perda de energia. Os compressores são dispositivos bastante eficientes em termos energéticos, diferentemente dos dispositivos térmicos, em que uma larga perda de energia pode ocorrer. Os compressores realizam menos trabalho em  $\text{kJ.kg}^{-1}$  de material processado do que os dispositivos térmicos, diminuindo a quantidade de energia gasta em processos térmicos. Assim a sacarificação usando alta pressão hidrostática parece ser um processo economicamente viável (TORRES; VELAZQUEZ, 2005; PALHANO et al. 2004).

A observação em microscópio eletrônico de varredura das fibras da casca de coco deslignificadas, tratadas a 300 MPa na ausência de celulases por 72 horas (Figura 41), demonstrou que as fibras de celulose da casca de coco podem ser

desagregadas, o que pode ser explicado devido à gelatinização da parede celular e ao rompimento de ligações de hidrogênio e de interações fracas (OLIVEIRA et al. 2012).

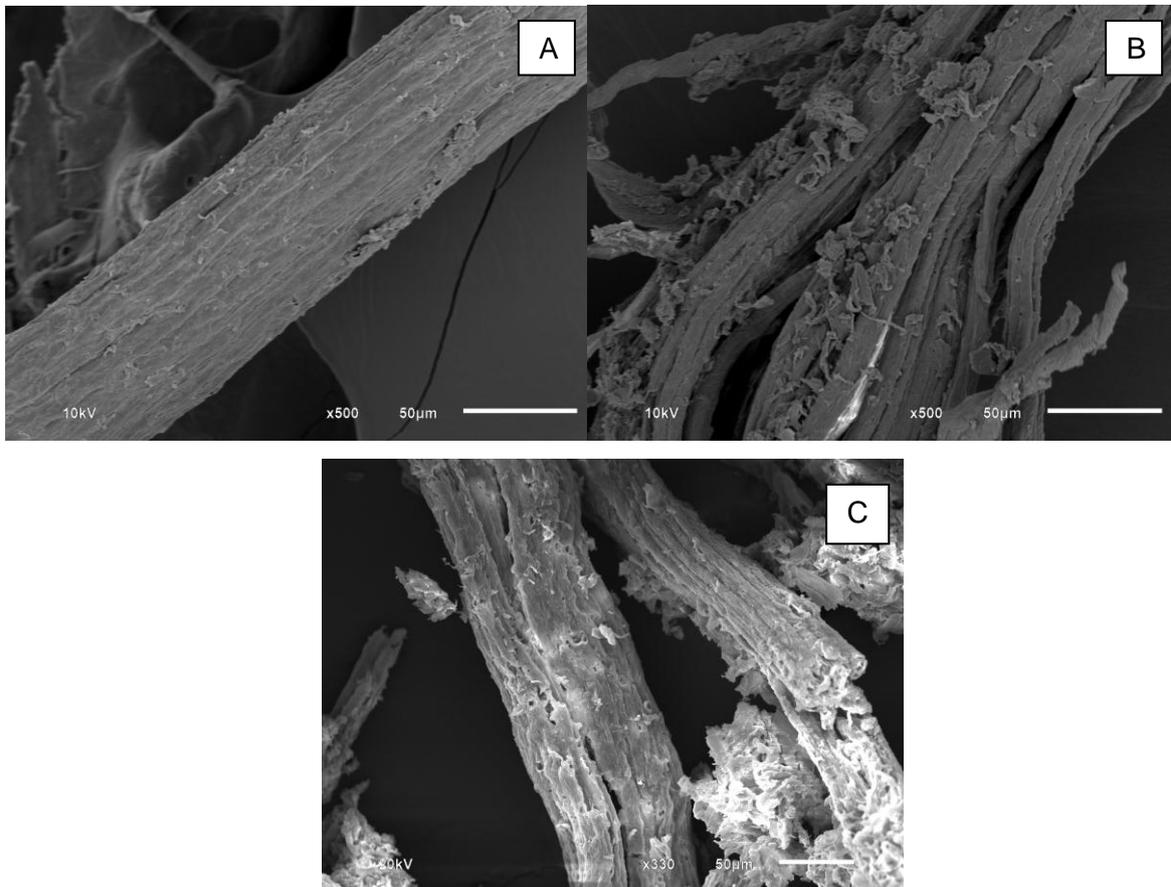


Figura 41 Imagem em microscópio eletrônico de varredura das fibras da casca de coco deslignificadas, na ausência de celulases, e após a aplicação de alta pressão hidrostática por um período de 72 horas. (A) Fibra da casca de coco deslignificada, à pressão atmosférica, após 72 horas em água. (B,C) Fibra da casca de coco deslignificada, após o tratamento de 300 MPa por um período de 72 horas.

Assim, provavelmente a pressão exerceria a função de expansinas, ou 'swollenin', que são proteínas secretadas por fungos ou presentes em plantas e capazes de romper as ligações de hidrogênio entre as fibras ou microfibrilas de celulose, aumentando a eficiência da hidrólise enzimática e a quantidade de açúcares liberados. 'Swollenin' é uma proteína com similaridade de sequência para

as proteínas expansinas de plantas, porém 'swollenin' tem uma estrutura bimodular composta por um domínio ligante de carboidrato na região N-terminal e conectada por uma região ligante ao domínio homólogo de expansinas de plantas. Swollenin pode quebrar as ligações de hidrogênio sem produzir açúcares detectáveis (BUCKERIDGE; GOLDMAN, 2011).

Como mostrado nos resultados anteriores, a HHP promove a hidrólise sem significativa liberação de açúcares redutores (Figura 35). Assim podemos dizer que a pressão desagrega as fibras, quebrando as ligações de hidrogênio, e expondo as regiões mais internas. Desta forma, a HHP acessa regiões internas de 'CEFs' por romper também a ligação entre hemicelulose e lignina, um efeito similar a 'swollenin'. Com a exposição das regiões internas da celulose ou de CEFs, as regiões hidrofóbicas ou de *N*-glicosilação das celulases podem se ligar às fibras acelerando o processo de hidrólise por concentração das enzimas sob a fibra via pressão hidrostática (DING et al. 2012)

As mudanças em compostos, que ocorrem durante a aplicação de HHP, estão relacionadas diretamente com o seu efeito nas ligações de hidrogênio e interações fracas, provocando quebra. Os efeitos existentes nas ligações covalentes não são reportados como de rompimento (MUJICA et al. 2011).

Assim para que ocorra sacarificação usando alta pressão, a junção do aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica estimulada por glicose, como reportado anteriormente, com a desagregação das microfibrilas da casca de coco no decorrer de 72 horas mostram-se essenciais para o aumento da liberação de açúcares mesmo em presença de fenóis.

As enzimas  $\beta$ -glicosidases de preparações comerciais de *T. reesei* são reportadas mais susceptíveis aos fenóis do que as comerciais de *A. niger*, provavelmente devido às atividades de outras celulases presentes nas preparações desta última, tais como a de ácido ferúlico esterase (XIMENES et al. 2010, ZANG; LYND, 2004).

Gottschalk et al. (2010) também reportou a presença de ácido ferúlico esterase no concentrado celulásico de *Aspergillus awamori* e que a mistura deste

concentrado com o de *T. reesei* hidrolisou eficientemente o bagaço de cana de açúcar.

Kim et al. (2011) reportou que fenóis presentes no hidrolisado de carvalho silvestre inibem fortemente a atividade  $\beta$ -glicosidásica de *T. reesei* (Spezyme CP) quando comparado com a de Novozymes 188 ( $\beta$ -glicosidase de *A. niger*). Esta inibição é iniciada a uma concentração de  $0,20 \text{ mg.mg}^{-1}$  (fenóis.proteína<sup>-1</sup>), reduzindo a atividade e a concentração de glicose liberada, com uma inibição fortemente observada à partir de  $0,50 \text{ mg.mg}^{-1}$  (fenóis.proteína<sup>-1</sup>).

Neste estudo observamos que após 72 horas de sacarificação em agitação, é liberada uma concentração de  $0,57 \text{ mg.mg}^{-1}$  (fenóis.proteína<sup>-1</sup>), o que provavelmente diminuiu a hidrólise enzimática à partir de 24 horas, já que a partir deste ponto a liberação de glicose torna-se constante.

Porém, em condições de alta pressão hidrostática e em pressão atmosférica, após 72 horas é liberada uma concentração de  $0,36 \text{ mg.mg}^{-1}$  (fenóis.proteína<sup>-1</sup>), uma concentração menor que em agitação. O que não afetou a crescente liberação de glicose até 72 horas, porém após 72 horas a liberação torna-se constante, demonstrando uma possível inibição.

A menor liberação de fenóis em condições de HHP do que em condições de agitação pode estar relacionada com a maior hidrólise de açúcares solúveis, tais como celobiose, pelo aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica pela pressão.

As celulases de *P. variable* foram também testadas para a sacarificação da casca de coco deslignificada em condições de alta pressão hidrostática. Após a produção das celulases em fermentação submersa, estas enzimas foram precipitadas com acetona, e concentradas até  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As celulases deste fungo foram escolhidas por apresentarem alta atividade  $\beta$ -glicosidásica estimuladas por glicose em condições de HHP e em pressão atmosférica, assim como também alta atividade celulásica total.

A precipitação é um processo para a retirada de açúcares redutores, porém enzimas sem um alto grau de pureza também podem ser utilizadas para hidrólise celulásica (GHOSE, 1987). Bon et al. (2008) reportou que o grau de pureza das enzimas comerciais varia de preparações brutas até altamente purificadas

dependendo da sua aplicação final. Geralmente, as preparações comerciais consistem do sobrenadante da fermentação concentrado e precipitado, assim são removidas apenas as substâncias que podem interferir no processo, como por exemplo, os açúcares redutores e polifenóis. Concomitantemente, etapas de purificação desnecessárias devem ser evitadas, pois além aumentarem os custos em termos de equipamentos, e de mão de obra, podem levar à perda da atividade enzimática.

Sabe-se que a precipitação pode levar à perda da atividade enzimática, apesar disso, os resultados obtidos demonstraram um aumento da sacarificação e da liberação de glicose usando alta pressão hidrostática, e ainda, a liberação de glicose obtida usando as celulases de *P. variabile* foi maior do que a alcançada usando a mistura de celulases comerciais (Figura 42). O que corrobora com os testes de atividade celulásica, em que *P. variabile* demonstrou maiores atividades.

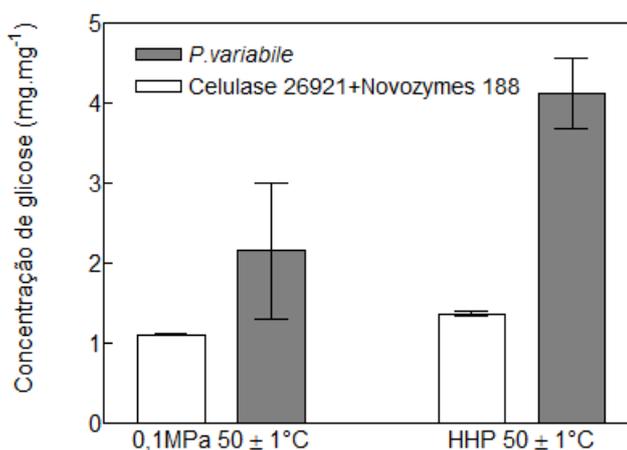


Figura 42 Concentração de glicose liberada por miligrama de proteína na sacarificação celulásica da casca de coco deslignificada a  $50 \pm 1$  °C por 72 horas. Pressão atmosférica (0,1 MPa) e pressão hidrostática (HHP). ( $p < 0,05$ ).

O efeito da alta pressão hidrostática nas fibras de casca de coco após 72 horas, em presença das celulases comerciais e de *P. variabile*, também foi observada em microscopia eletrônica de varredura (Figura 43). As imagens demonstraram que ocorre a descamação e em seguida a desagregação das fibras,

assim como a ruptura e o aumento dos poros sobre a superfície das fibras da casca de coco em condições de alta pressão. Estes efeitos supracitados já foram observados em MEV para polpas de madeira, usando enzimas como lacases e xilanases, demonstrando a degradação das fibras em pressão atmosférica, porém não foram descritos na presença de celulases em condições de pressão hidrostática (DWIVEDI et al. 2008).

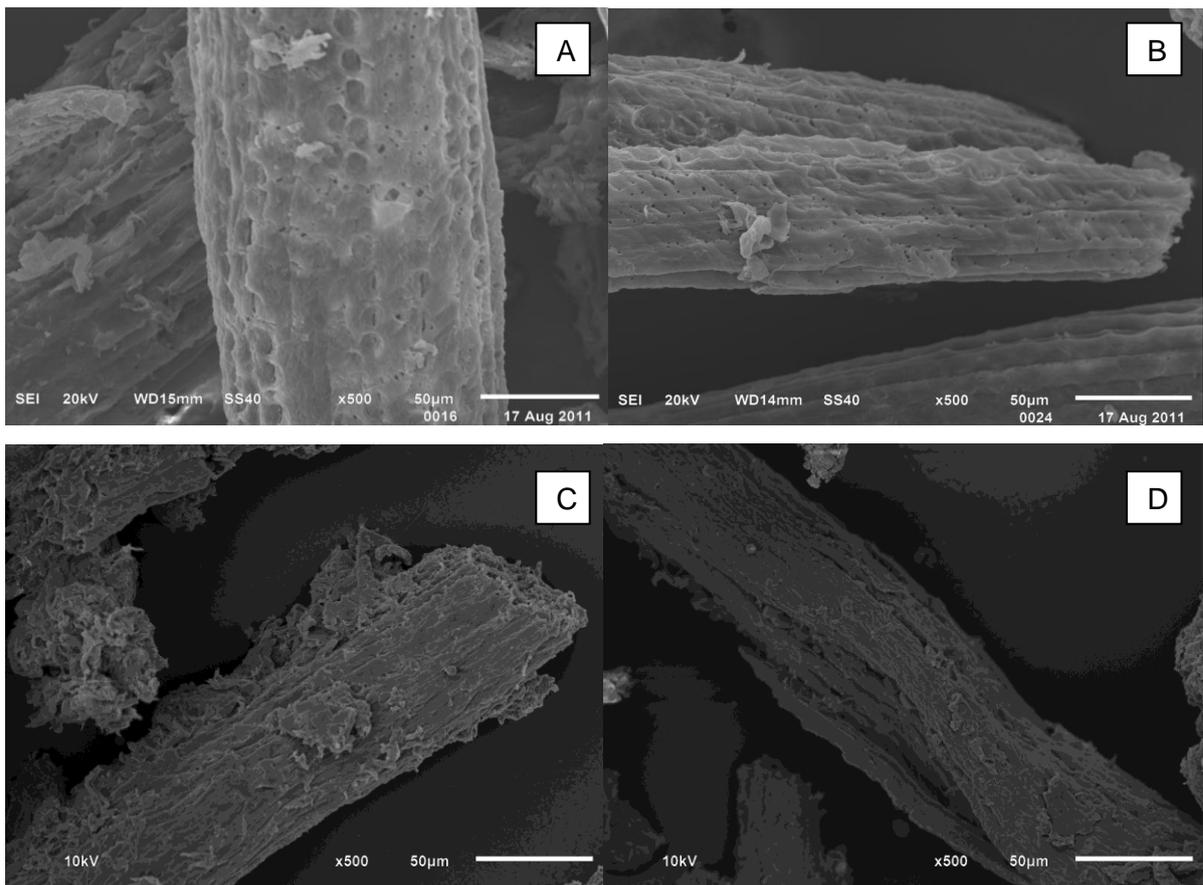


Figura 43 Imagem em microscópio eletrônico de varredura das fibras da casca de coco deslignificadas após a hidrólise celulásica por 72 horas a  $50 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$  . (A) Fibra da casca de coco deslignificada, a 0,1 MPa, em presença de celulases comerciais. (B) Fibra da casca de coco deslignificada, a 300 MPa, em presença de celulases comerciais. (C) Fibra da casca de coco deslignificada, a 0,1 MPa, em presença de celulases de *P.variable*. (D) Fibra da casca de coco deslignificada, a 300 MPa, em presença de celulases de *P. variable*.

Este efeito da alta pressão nas fibras, observados em MEV, podem ser também resultados da deslignificação, tais como os efeitos demonstrados por Dwivedi et al. (2008). Estes dados corroboram com os dados apresentados anteriormente, em que a HHP apresentou efeito na liberação de fenóis. Provavelmente a pressão pode agir como um fator facilitador da deslignificação por promover a liberação de fenóis e desagregar as fibras.

Por fim, o mecanismo de hidrólise celulásica em condições de HHP, funcionaria primeiramente com a HHP aproximando a enzima do substrato. Juntamente a este evento a HHP modifica a conformação da enzima por exposição de aminoácidos hidrofóbicos e de regiões de glicosilação, assim como provoca a desagregação das fibras da casca de coco (o substrato). A desagregação das fibras tornaria o substrato mais acessível à ação das celulasas, e a aproximação das celulasas ao substrato aconteceria pelas interações hidrofóbicas, semelhante ao funcionamento de CBMs. A glicose liberada estimularia a atividade das  $\beta$ -glicosidases em condições de HHP. A junção de todos estes efeitos levariam ao aumento da hidrólise celulásica das fibras da casca de coco em condições de pressão hidrostática (Figura 44).

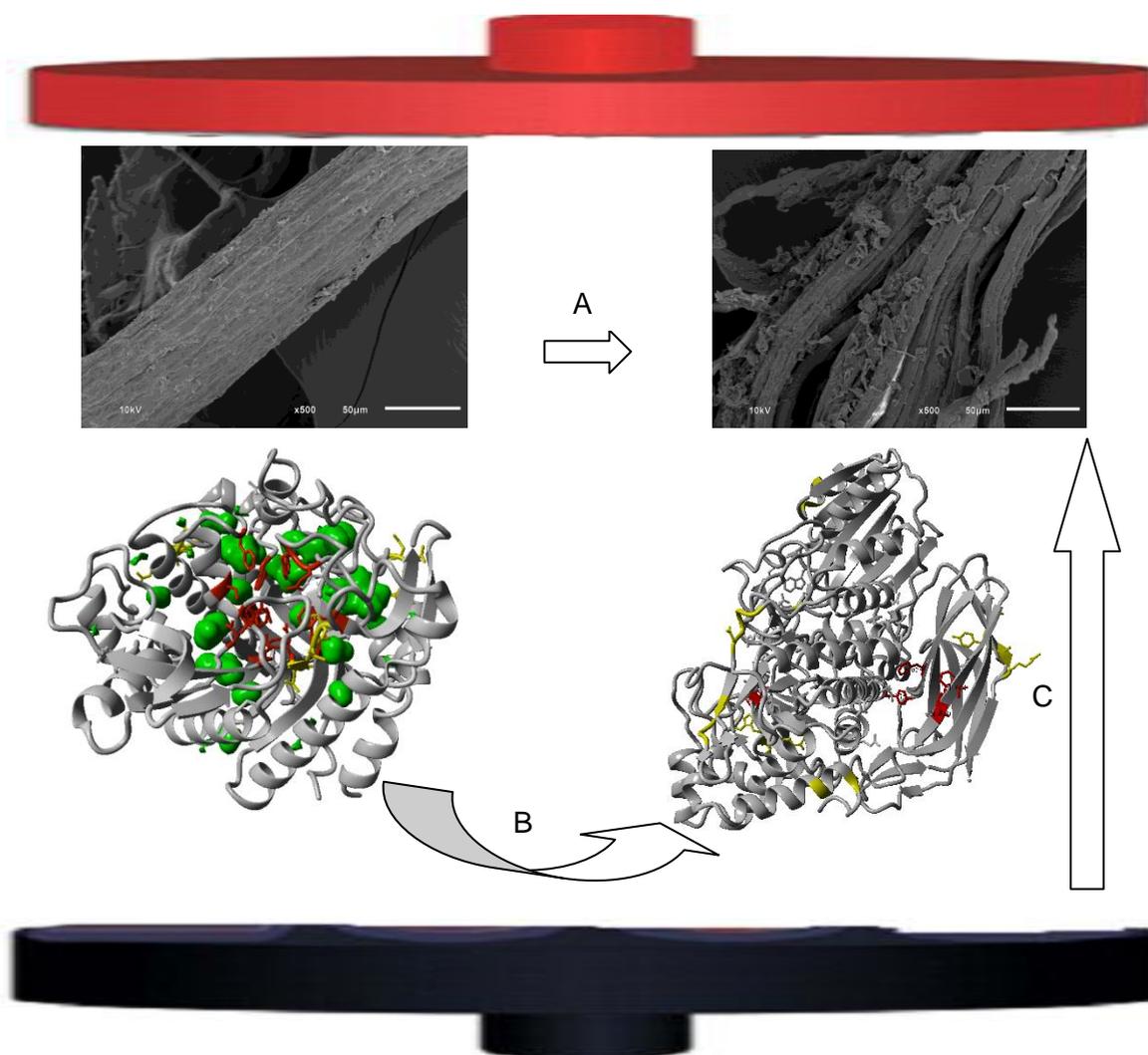


Figura 44 Mecanismo da hidrólise celulásica da casca de coco em condições de alta pressão hidrostática. (A) Desagregação das fibras de celulose da casca de coco. (B) Mudança conformacional das  $\beta$ -glicosidases. (C) Aproximação das celulases do substrato por interações hidrofóbicas e/ ou glicosilação e estimulação das  $\beta$ -glicosidases pela glicose liberada, provocando assim o aumento da atividade celulásica em condições de HHP.

## 5 CONCLUSÕES

Fungos filamentosos, tanto endofítico como decompositor, *P. variabile* e *Trichoderma* sp, respectivamente, foram isolados possuindo atividades celulásicas (FPase, endoglicanásicas e  $\beta$ -glicosidásicas), fenoloxidasas e xilanásicas. As atividades celulásicas destes fungos isolados foram maiores do que as dos fungos padrões, tanto em pressão atmosférica quanto em condições de HHP.

Os aumentos de atividades celulásicas totais usando HHP foram relacionados com os aumentos das suas atividades  $\beta$ -glicosidásicas e das suas atividades endoglicásicas em condições de pressão.

As atividades celulásicas totais de todos os fungos celulolíticos aumentaram com a precipitação e a remoção dos açúcares redutores. Porém, a retirada do açúcar impede a ação positiva da HHP. A presença de glicose, em concentrações de até de 55 mM, nos ensaios celulásicos, usando HHP foi capaz de estimular a atividade  $\beta$ -glicosidásica das celulasas precipitadas dos fungos celulolíticos isolados da casca de coco e de celulasas comerciais de *T. reesei* 26921.

As atividades celulásicas totais (FPase), tanto da mistura de enzimas comerciais quanto das celulasas precipitadas dos fungos isolados da casca de coco, foram aumentadas na presença de 55 mM de glicose em condições de HHP.

A análise de bioinformática demonstrou que a presença de regiões de glicosilação e de regiões hidrofóbicas, durante a hidrólise celulásica usando HHP, é essencial para a estabilização das celulasas e parecem estar relacionadas com o aumento das suas atividades. Regiões de *N*-glicosilação foram identificadas próximas às cavidades protéicas, como próximas às regiões hidrofóbicas e aos sítios ativos das enzimas. Assim, os substratos e/ ou carboidratos se ligariam a essas regiões polipeptídicas e aproximariam-se do sítio ativo durante a hidrólise, exercendo funções de CBMs.

Ainda, resíduos de triptofano (W) e de glutamato (E) situados no sítio ativo da Bgl2 estariam ligados com o aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica em condições de HHP. Resíduos de treonina (T), situados no sítio ativo da endoglicanase de *A. niger*, também poderiam ser responsáveis pelo aumento da atividade desta enzima.

As fibras obtidas após o pré-tratamento demonstraram uma baixa degradação, esta característica foi observada devido à semelhança entre os comprimentos e larguras das fibras da casca de coco pré-tratadas com os das fibras de CMC comercial (sigma). A hidrólise da casca de coco foi aumentada em condições de HHP, utilizando-se de celulases padrões e de celulases dos fungos isolados da casca de coco.

O processo de hidrólise celulásica da casca de coco (sacarificação) usando alta pressão hidrostática aumentou a hidrólise da casca de coco, cerca de duas vezes, quando comparado à pressão atmosférica após 24 horas. O processo também foi capaz de acelerar a hidrólise em 72 horas. Uma menor quantidade de fenóis foi liberada na sacarificação usando HHP. O estímulo para que ocorra a sacarificação, em condições de alta pressão, está relacionado com a ação positiva da glicose no aumento da atividade  $\beta$ -glicosidásica em condições de HHP.

Ligações de hidrogênio das fibras da casca de coco foram rompidas durante a sacarificação usando HHP, este fenômeno provocou a desagregação (desfibrilação) das microfibrilas das fibras da casca de coco. Assim as regiões internas das fibras tornaram-se mais acessíveis às ligações com as enzimas, ou às interações com as regiões de glicosilação e/ ou hidrofóbicas das proteínas expostas devido à ação da HHP.

O processo de hidrólise (sacarificação), utilizando HHP, possui como mecanismo de estímulo altas atividades  $\beta$ -glicosidásicas estimuladas por glicose, esta característica supracitada das  $\beta$ -glicosidases alimenta o processo e provoca o aumento das atividades celulásicas em HHP. Assim, em condições de HHP, as altas atividades  $\beta$ -glicosidases estimuladas por glicose clivam uma maior quantidade de celobiose à glicose, desinibindo as enzimas envolvidas no complexo celulásico (tais como exoglicanases e endoglicanases) e provoca o aumento da hidrólise celulásica da casca de coco por sinergia enzimática.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Análise das atividades fenoloxidasas, xilanases e celobiohidrolases dos fungos isolados da casca de coco.

Utilização das cepas de *T. reesei* para mutação ou deleção das sequências de aminoácidos relatadas neste trabalho a fim de identificar se estes resíduos de aminoácidos estão realmente envolvidos com o aumento da atividade celulásica após a aplicação da HHP.

Inserção dos genes celulolíticos dos fungos isolados da casca de coco em *S. cerevisiae* visando alcançar o mesmo aumento de atividade celulásica total encontrado usando HHP. Assim como inserção de genes que codificam para regiões hidrofóbicas e de *N*-glicosilação próximas ao sítio ativo das celulasas e também a fusão de regiões tais como de 'swollenin' para o aumento da hidrólise da casca de coco.

Imobilização e encapsulamento das celulasas purificadas, não pressurizadas e pressurizadas, a fim de detectar possíveis aumentos das atividades celulásicas via ligações glicosídicas.

Sequenciamento das celulasas, principalmente das  $\beta$ -glicosidasas dos fungos isolados da casca de coco (*Trichoderma* sp e de *P. variable*), assim como resolução de suas estruturas. Uso de bioinformática e análise comparativa destas sequências e estruturas, a fim de esclarecer este mecanismo comum de aumento das atividades celulásicas em condições de pressão.

Realização de experimentos de sacarificação e fermentação, utilizando enzimas e cepas transformadas e as fibras de coco tratadas por pressão.

Utilização da HHP para deslignificação das fibras da casca de coco e análise de suas fibras usando força atômica. Como também a utilização das fenoloxidasas dos fungos isolados para testes de deslignificação das fibras de coco.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABAD, M.; NOGUERA, P.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; NOGUERA, V. Physico – Chemical and chemical properties of some coconut coir dusts for use as a peat substitute for containerized ornamental plants. **Bioresource technology**. v. 82, p. 241 – 245, 2002.
- ABED, Y. A., ULRICH, P., KAPURNIOTU, A., LOLIS, E., BUCALA, R.. Model Studies of the Maillard Reaction of Arg-Lys with D-Ribose. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, p. 2929-2930, 1995.
- AERTSEN, A., MEERSMAN, F., HENDRICKX, M.E.G., VOGEL, R.F.. Biotechnology under high pressure: applications and implications. **Trends in Biotechnology**. v.27, p.434 – 441, 2009.
- AGUIRRE, D. B. AND CÁNOVAS, G.V.B. . An update on high hydrostatic pressure, from the laboratory to industrial applications. **Food Eng. Rev.** v.3, p.44 – 61, 2011.
- AHAMED, A., VERMETTE, P.. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. v.49, p.379–387, 2010.
- ANDRIĆ, P., MEYER, A. S., JENSEN, P.A., DAM-JOHANSEN, K.. Effect and modeling of glucose inhibition and *in situ* glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Appl Biochem Biotechnol**. v.160, p.280 – 297, 2010.
- ARAI, T., ARAKI, R., TANAKA, A., KARITA, S., KIMURA, T., SAKKA, K. AND OHMYA, K.. Characterization of a cellulase containing a family 30 carbohydrate-binding module (CBM) derived from *Clostridium thermocellum* CelJ: importance of the CBM to cellulose hydrolysis. **J. Bacteriol**. v.185, p.504–512, 2003.
- AVELLANEDAA, Z. E., MOURE, M.P., CHOTYAKUL, N., TORRES, J.A., WELTI-CHANES, J., LAMELA, C.P. Benefits and limitations of food processing by high-pressure technologies: effects on functional compounds and nonbiotic contaminants. **CyTA – Journal of Food**. v. 9, p.352–365, 2011.
- BENOLIEL, B.; POÇAS-FONSECA, M.J.; TORRES, F.A.G.; AND MORAES, L.M.P.. Expression of a Glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Humicola grisea* var.

*thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 160, p.2036-2044, 2010.

BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L. **Biochemistry**. 5 ed., New York: W H Freeman, 2002.

BISMARCK, A.; MOHANTY, A. K.; ARANBERRI-ASKARGORTA, I.; CZAPLA, S.; MISRA, M.; HINRICHSENBAND, G.; SPRINGERA, J. Surface characterization of natural fibers; surface properties and the water up-take behavior of modified sisal and coir fibers. **Green Chemistry**. Cambridge, v.3, p.100–107, 2001.

BITENCOURT, D.V. and PEDROTTI, A.. Usos da casca de coco: Estudo da viabilidade de implantação de usina de beneficiamento de fibra de coco em Sergipe. **Revista Fapese**. v.4, p.113-114, 2008.

BON, E.P.S., FERRARA, M.A., CORVO, M.L.. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. 1° ed. Editora: Interciência Ltda, Rio de Janeiro, Brasil, p. 29 – 263, 2008.

BOONYARATANAKORNKIT, B. B., PARK, C. B., CLARK, D.S.. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1595, p.235-249, 2002.

BORASTON, A. B., BOLAM, D. N., GILBERT, H. J., AND DAVIES, G. J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochem J.** v.382, p.769–781, 2004.

BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72,p. 248-254, 1976.

BRAVIM, F.; LIPPMAN, S.I.; DA SILVA, L.F.; SOUZA, D.T.; FERNANDES, A.A.; MASUDA, C.A.; BROACH, J.R., FERNANDES, P.M.. High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.97, p.2093-107, 2013.

BUCKERIDGE, M.S. and GOLDMAN, G.H.. Routes to cellulosic ethanol. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. ISBN 978-0-387-92739-8. p. 3 – 146, 2011.

- BUCKERIDGE, M.S., SILVA, G.B. & CAVALARI, A. A.. Parede Celular. *In*: Kerbauy, G.B. 2ed. **Fisiologia Vegetal**, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 165-181. 2008.
- BURANOV, A. U. and MAZZA, G.. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. **Food Chemistry**. v.115, p. 1542–1548, 2009.
- CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAS, A.; CARVALHO, W.. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**. v.44, p.48-53, 2010.
- CAO, X., ZHANG, Y., ZHANG, F., WANG, Y., YI, J. Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. **J Sci Food Agric**. v.91, p. 877–885, 2011.
- CARERE, C. R., SPARLING, R., CICEK, N. LEVIN, D.B.. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. **Int. J. Mol. Sci**, v.9, p.1342-1360, 2008.
- CARRIJO, O. A., LIZ, R. S., MAKISHIMA, N.. Fibra de casca de coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**. v.20, p. 533-535, 2002.
- CHO, M.Y. Fermentation of *Trichoderma reesei* and apparatus therefor. U.S.Patent. Número da patente: 4.952.505, 28 de agosto, 1990.
- CHOUARD, T.. Breaking the protein rules: If dogma dictates that proteins need a structure to function, then why do so many of them live in state of disorder?. **Nature**. v.471, p.151-153, 2011.
- COGHE, S.; BENOOT, K., DELVAUX, F., VANDERHAEGEN, B., AND DELVAUX, F. R.. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Agric. Food Chem**. v.52, p.602–608, 2004.
- CORRADINI, E., ROSA, D. S., MATTOSO, L. H. C., MACEDO, B.P., PALADIN, P.D., MATTOSO, L. H. C.,. Chemical composition, thermal and mechanical properties for cultivars of immature coconut fibers. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.31, 837-846, 2009.

- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; Qin, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **Int. J. Biol. Sci.** v.5, p.578-595, 2009.
- DE HOOG, G. S., J. GUARRO, J. GENE, AND M. J. FIGUERAS. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed., v. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 2000.
- DING, SHI-YOU; LIU, YU-SAN; ZENG, Y; HIMMEL, M. E.; BAKER, J.O.; BAYER, E.A..How Does Plant Cell Wall Nanoscale Architecture Correlate with Enzymatic Digestibility?. **Science**. v. 338, p.1055-60, 2012.
- DOCTORFUNGUS. Description of Fungi. Disponível em: <[http://www.doctorfungus.com/thefungi/Description\\_index.php](http://www.doctorfungus.com/thefungi/Description_index.php) >. Acesso em: 25 de maio, 2012.
- DUFF, S.J.B., COOPER, D.G. FULLER, M.. Effect of colloidal materials on cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Applied and Environmental Microbiology**. v.49, p.934-938, 1985.
- DWIVEDI, P., VIVEKANAND, V, PAREEK, N., SHARMA, A., SINGH, R. P.. Bleach Enhancement of Mixed Wood pulp by xylanase–laccase concoction derived through vo-culture strategy. *Appl Biochem Biotechnol*. v.160, p. 255-68, 2010.
- EISENMENGER, M.J. and REYES-DE-CORCUERA, J.I.. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology**. v.45, p.331 – 347, 2009.
- EVELEIGH, D.E., MANDELS, M., ANDREOTTI, R. AND ROCHE, C.. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology for Biofuels**. v.2, p.1-8, 2009.
- FAN, J.X., YANG, X.X., SONG, J.Z., HUANG, X.M., CHENG, Z.X., YAO, L., JUBA, O. S., LIANG, Q., YANG, Q., ODEPH, M., SUN, Y., WANG, Y.. Heterologous Expression of Transaldolase Gene Tal from *Saccharomyces cerevisiae* in *Fusarium oxysporum* for Enhanced Bioethanol Production. **Appl Biochem Biotechnol**. v.164, p.1023–1036, 2011.
- FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; NETO, V. B.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólida. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 22 – EMBRAPA.. p.1-17, 2008.

FRAGOSO, A. V., MÚJICA-PAZ, H., WELTI-CHANES, J., TORRES, J.A.. Reaction Kinetics at High Pressure and Temperature: Effects on Milk Flavor Volatiles and on Chemical Compounds with Nutritional and Safety Importance in Several Foods. **Food Bioprocess Technol.** v.4, p.986–995, 2011.

FUJITA, Y., ITO, J., UEDA, M., FUKUDA, H., KONDO, A.. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. **Applied and Environmental Microbiology.** v.70, p.1207-1212, 2004.

GHOSE, T.K.. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** v.59, p.257 – 268, 1987.

GLOBO RURAL. Revista globo rural – Bioenergia/Etanol: Novozymes apresenta enzima que reduz custo de produção do etanol celulósico. Disponível em: <[revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,DMS018531,00BIOENERGIA.html](http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,DMS018531,00BIOENERGIA.html)>. Acessado em: 08 de jun., 2012.

GLOSTER TM, ROBERTS S, PERUGINO G, ROSSI M, MORACCI M, PANDAY N, TERINEK M, VASELLA A, DAVIES GJ. Structural, kinetic, and thermodynamic analysis of glucoimidazole-derived glycosidase inhibitors. **Biochemistry.** v.45; 11879-84, 2006

GOTTSCHALK, L. M. F., OLIVEIRA, R. A., BON, E. P. DA S.. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal.** v.51, p.72–78, 2010.

GUZZO, S.D., HARAKAVA, R., KIDA, K., MARTINS, E.M., ROVERATTI, D.S.. Proteção de cafeeiros contra *Hemileia vastatrix* por cloreto de benzalcônico. **Summa Phytopatologica.** v.25, p.339-345, 1999.

HALDRUP, A., PETERSEN, S. G.; OKKELS, F. T.. The xylose isomerase gene from thermoanaerobacterium thermosulfurogenes allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. **Plant Molecular Biology.** v. 37, p.287-96, 1998.

HAMON, V., DALLET, S., LEGOY, MARIE-DOMINIQUE. The pressure-dependence of two  $\beta$ -glucosidases with respect to their thermostability. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1294, p.195-203, 1996.

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L.. A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**. v. 67, p.61–69, 2009.

HEKKELMAN M.L., VRIEND G. MRS: A fast and compact retrieval system for biological data. *Nucleic Acids Research* 33 (Web Server issue):W766-W769; doi:10.1093/nar/gki422. 2005. Disponible em: <http://mrs.cmbi.ru.nl/m6/>

HENRISSAT, B.; A. BAIROCH. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. **Biochemical Journal**. v.293, p.781–788, 1993.

HERPOËL-GIMBERT, I., MARGEOT, A., DOLLA, A., JAN, G., MOLLÉ, D., LIGNON, S., MATHIS, H., SIGOILLOT, J.C., MONOT, F. ASTHER, M.. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnology for Biofuels**. v.1, p.1-18, 2008.

HONG, J., TAMAKI, H., KUMAGAI, H.. Unusual hydrophobic linker region of  $\beta$  -glucosidase (BGLII) from *Thermoascus aurantiacus* is required for hyper-activation by organic solvents. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.73, p.80 – 88, 2006.

HOUBRAKEN, J.; PEZ-QUINTERO, C.A.L.; FRISVAD, J.C.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; FRANCO-MOLANO, A.E.; SAMSON, R.A. *Penicillium araracuarensis* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarojense* sp. nov., *Penicillium vanderhammenii* sp. nov. and *Penicillium wotroi* sp. nov., isolated from leaf litter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.61, p.1462–1475, 2011.

HOWARD, R.L., ABOTSI, E., JANSEN VAN RENSBURG, E.L., HOWARD S.. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**. v.2, p. 602-619, 2003.

JAEGER H, JANOSITZ A, KNORR D. The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. **Pathol Biol (Paris)**. v.58, p.207-13. 2010.

JANG, Y., HUH, N., LEE, J., LEE, J.S., KIM, G.H., KIM, J.J. Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods and their discoloration characteristics. Part 2. Genus *Penicillium*. **Holzforschung**, v.65, p.265–270, 2011.

JENG, W.Y., WANG, N.C., LIN, M.H., LIN, C.T., LIAW, Y.C., CHANG, W.J., LIU C.I., LIANG, P.H., WANG, A.H.J.. Structural and functional analysis of three  $\beta$  glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. **Journal of Structural Biology**. v.173, p.46-56, 2011.

JEYA, M.; ZHANG, Y.M.; KIM, I.W.; LEE, J.K. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource Technology**. v.100, p.5155–5161, 2009.

JUHÁSZ, T., NÓRA, Z. S., SZIJÁRTÓ, RÉCZEY, K.. Effect of pH on Cellulase Production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Applied Biochemistry and Biotechnology** .v. 113–116, p. 201 – 211. 2004.

JUN, H., BING, Y., KEYING, Z., XUEMEI, D AND DAIWEN, C.. Strain improvement of *Trichoderma reesei* RUTC30 for increased cellulase production. **Indian Journal of Microbiology**. v.49, p.88-195, 2009.

KADAM, K.L., KEUTZER, W.J.. Enhancement in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 due to citric acid. **Biotechnology Letters**. v.17, p.1111-1114, 1995.

KANOKRATANA, P.; CHANTASINGH, D.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L.. Identification and expression of cellobiohydrolase (CBHI) gene from an endophytic fungus, *Fusicoccum* sp. (BCC4124) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v.58, p.148–153, 2008.

KIISKINEN L-L, RÄTTÖ M, KRUUS K.. Screening for novel laccase producing microbes. **Journal of Applied Microbiology**. v.97, p.640–646, 2004.

- KIM, Y., XIMENES E., MOSIERA N.S., LADISCHA, M.R.. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**. v.48, p.408 – 415, 2011.
- KOKOREVICS, A. AND GRAVITIS, J.. Cellulose depolymerization to glucose and other water soluble polysaccharides by shear deformation and high pressure treatment. **Glycoconjugate Journal**. v.14, p.669- 676, 1997.
- KUBICEK, C. P., PANDA, T., SCHREFERL-KUNAR, G., GRUBER, F., et MESSNER, R. O-linked but not N-linked glycosylation is necessary for the secretion of endoglucanases I and I1 by *Trichoderma reesei*. *Can. J. Microbiol.* v.33, p.698-703, 1987.
- KUYPER, M., HARHANGI, H.R., STAVE, A.K., WINKLER, A.A., JETTEN, M.S.M., DE LAAT, W.T.A.M., DEN RIDDER, J.J.J., OP DEN CAMP, H.J.M., VAN DIJKEN, J.P. AND PRONK, J.T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.** v.4, p.69–78, 2003.
- LEHMANN, C.; SIBILLA, F.; MAUGERI, Z.; WOLFGANG, R. S., DE MARÍA, D., P., LI,H., MURTOMAKI, L., LEISOLA, M. 1 AND TURUNEN, O. The effect of thermostabilising mutations on the pressure stability of *Trichoderma reesei* GH11 xylanase Protein Engineering, Design & Selection. p.1-6, 2012. doi:10.1093/protein/gzs052.
- LIMA, A. O. S., LACAVA, P. T., AZEVEDO, J. L. AND ARAUJO, W. L.. Isolamento de microrganismos endofíticos - Manual Prático, v.1, p. 46, 2001.
- LIU, D., ZHANG, R., YANG, X., WU, H., XU, D., ZHU, T., SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.65, p. 717-725, 2011.
- MAGUIRE, R.J. Kinetics of the hydrolysis of cellobiose and p-nitrophenyl-P-D-glucoside by cellobiase of *Trichoderma viride*. **Can. J. Biochem.** v.55, p.19-26. 1977.
- MARTÍN, C., GALBE, M., WAHLBOM, C. F., HÄGERDAL, B.H., JÖNSSON, L.J.. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using

- recombinant xylose- *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technol.** v.31, p.274-282, 2002.
- MERIVUORI, H., SANDS, J.A., MONTENECOURT, B.S.. Effects of tunicamycin on secretion and enzymatic activities of cellulase from *Trichoderma reesei*. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 23: p. 60-66, 1985.
- MARTIN, M. A. First generation biofuels compete. **New Biotechnology**, v.27, p.597-607, 2010.
- MARTINS, A., BRAÚNA, L.M., MARTINS, I., MELLO, S.C.M.. Técnica modificada de microcultura de fungos para visualização microscópica. **Cenargen: Technical communication 176**. ISSN 9192 – 0009. 2008.
- MARTINS, C. R. and JESUS JÚNIOR, L. A. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p.32, 2011 (Documentos 164, ISSN 1678-1953).
- MATTHEWS, J.F.; SKOPEC, C.E.; MASON, P.E.; ZUCCATO, P.; TORGET, R.W.; sugiyama, j. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose. **Carbohydrate research.** v.341, p.138–152, 2006.
- MEERSMAN, F., DOBSON, C.M. AND HEREMANS, K.. Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions. **Chem. Soc. Rev.**, v.35, p.908–17, 2006.
- MENEZES, M. and OLIVEIRA, S.M.A. Fungos Fitopatogênicos. 1° ed. Recife: UFRPE, **Imprensa Universitária.** p.267, 1993.
- MICHIELS, C., BARTLETT, D.H., AERTSEN, A.. High-pressure microbiology. 1° ed. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC. p.1-194, 2008.
- MILLER, G.L.. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v.31, 426 - 428. 1959.
- MOLL, S., KEIBLINGER, K.M., ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S., BANDIAN, D., RICHTER, A., STRAUSS, J., GORFER, M.. Fungal succession at early stages of beech litter decay. **15th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium**, Sept 19-24, Vienna, Austria . 2011.
- MORILD, E. Advances in protein chemistry. v. 34, p. 93 -113. 1981.
- MTUI, G.Y.S.. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and

production of value added products. **African Journal of Biotechnology**. v.8, p. 1398-1415, 2009.

MÚJICA-PAZ, H.; VALDEZ-FRAGOSO; A., SAMSON, C.T.; WELTI-CHANES, JORGE; TORRES, J.A.. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. **Food Bioprocess Technology**. DOI 10.1007/s11947-011-0543-5. 2011.

MURAO, S., NOMURA, Y., .YOSHIKAWA, M., SHIN, T., OYAMA, H., ARAI, M. Enhancement of activities of cellulases under high hydrostatic pressure. **Biosci, Biotechnol Biochem**. v.56, p.1366-1367, 1992.

MYCOBANK. Fungal Databases Nomenclature and Species. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMod=Basic>>. Acesso em: 28 mai. 2012.

NASCIMENTO, C. V., SOUZA, F.H.M., MASUI, D.C., LEONE, F.A., PERALTA, R.M., JORGE, J.A., FURRIEL, R.P.M... Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated  $\beta$ -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. thermoidea grown on sugarcane bagasse. **The Journal of Microbiology**, v.48, p.53-62, 2010.

NIMLOS, M.R., MATTHEWS, J.F., CROWLEY, M.F., WALKER, R.C., CHUKKAPALLI, G., BRADY J.W., ADNEY W.S., CLEARY J.M., ZHONG, L., HIMMEL ME.. Molecular modeling suggests induced fit of Family I carbohydrate-binding modules with a broken-chain cellulose surface. **Protein Eng Des Sel**. v.20, p.179-187, 2007.

NOGUERA, P, ABAD, M, NOGUERA, V., PURCHADES, R., MAQUIERA, A.. Coconut coir waste, a new and viable ecologically-friendly peat substitute. **Acta Horticulturae**. v.517, p. 279-286, 2000.

OLIVEIRA, S. C.T., FIGUEIREDO, A. B., EVTUGUIN, D. V., SARAIVA, J.A.. High pressure treatment as a tool for engineering of enzymatic reactions in cellulosic fibres. Short Communication, **Bioresource Technology**. v. 107, p. 530–534, 2012.

PALHANO F.L., ORLANDO M.T.D, FERNANDES P.M.B.. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS. Microbiol Lett**. v.233, p.139-145, 2004.

- PANAGIOTOU, G. And OLSSON, L.. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**. v.96, p.250-258, 2007.
- PARODI, A.J. and SOUSA, M.. The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. **The EMBO Journal**. v.14, p.4196-4203, 1995.
- PEDERSEN, M. AND MEYER, A. S.. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**. v.27, p.739-750, 2010.
- PICARD, A. et al. In situ monitoring by quantitative Raman spectroscopy of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* under high pressure. **Extremophiles**. v.11, p.445–452, 2007.
- PUTZKE, J. and PUTZKE, M. T. L.. Os Reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul – RS: Edunisc. v.1, p. 400, 1998.
- BRUINS, M. E., MEERSMAN, F., JANSSEN, A. E. M., HEREMANS, K., BOOM, R. M.. Increased susceptibility of  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* to thermal inactivation at higher pressures. **FEBS Journal**. v. 276, n.1, p. 109-117. 2009.
- RAEDER, V. and BRODA P.. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letter. Appl. Microbiol**. v.1, n.1, p 17-20. 1985.
- RATH, J.; HERNDL, GJ. Characteristics and diversity of  $\beta$ -D-glucosidase (E.C. 3.2.1.21) Activity in marine snow. **Appl Environ Microbiol**. v.60, n.3, p.807-13. 1994.
- RODRIGUES, G. A. Embalagens de Alimentos com Fibra de Coco Verde. Seminário de Tecnologia e Pesquisas Ambientais. 2009. Disponível em: <[http://www.sp.senai.br/portal/meioambiente/conteudo/embalagem\\_fibra\\_coco.pdf](http://www.sp.senai.br/portal/meioambiente/conteudo/embalagem_fibra_coco.pdf)> Acesso em: 30 mai. 2012.
- ROSA, M. DE F., BEZERRA, F. C., CORREIA, D., SANTOS, F. J. DE S., ABREU, F. A. P. DE, FURTADO, A. A. L., BRÍGIDO, A. K. L., NORÕES, E. R. DE V.. Utilização da casca de coco como substrato agrícola. Embrapa Agroindústria Tropical. Documents, 52. 2002.
- ROSA, M.F, SANTOS, F.J.S., MONTENEGRO, A.A.T., ABREU, F.A.P., CORREIA,

- D., ARAUJO, F.B.S.; NORÔES, E.R.V.. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. Embrapa Agroindústria Tropical. Technical communication, 54. p. 1-6, 2001.
- RUBIN, E. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**. v.454, p.841–845, 2008.
- RUEGGER, M. J.S.; TAUKE-TORNISIELO S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v. 27, p.205-211. 2004.
- SALVADOR, A.C., SANTOS, M. C. SARAIVA, J.A. Effect of the ionic liquid [bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulase. **Green Chem**. v.12, p.632-635, 2010.
- SÁNCHEZ, C.. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**. v.27, p.185–194, 2009.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, ANNE-KATRIN; KROHN, K.. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycol. Res.** v.106, p. 996-1004. 2002.
- SCHUSTER, A and SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v. 87, p. 787-799, 2010.
- SCHWARZENBOLZ, U., TH. KLOSTERMEYER. Maillard reaction under high hydrostatic pressure: studies on the formation of protein-bound amino acid derivatives. **Henle International Congress Series 1245**. p.222– 223, 2002
- SEIDL, M., GAMAUF, C., DRUZHININA, I.S, SEIBOTH, B., HARTL, L., CHRISTIAN, P., KUBICEK, C.P.. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. **BMC Genomics**. v.9, p.1-15, 2008.
- SILVA, A.S., INOUE, H., ENDO, T., YANO, S., BON, E.P.S.. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**. v.101, p.7402-7409, 2010.
- SILVA, R. V., SPINELLI, D., BOSE FILHO, W. W., CLARO NETO, S., CHIERICE, G. O., TARPANI, J.R.. Fracture toughness of natural fibers/castor oil polyurethane composites. **Composites Science Technology**. v.66, p.1328-1335, 2006.

- SILVEIRA, M. S. Aproveitamento das cascas de coco verde para produção de briquete em salvador – BA. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, Salvador, BA, 2008.
- SUKUMARAN, R.K., SINGHANIA, R.R., MATHEW, G.M., PANDEY, A.. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**. v.34, p. 421-424, 2009.
- SULAIMAN, O., MOHAMAD, N. H., HASHIM, R., IBRAHIM, M., MONDAL, Md I. H.. Effect of pretreatment using microorganism on production of pulp from oil palm trunk. **International Wood Products Journal**. v.2, n.2. p.89 – 94, 2011.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Editora Artmed, p.719, 2004.
- TAYLOR, C. B.; TALIB, M. F.; MCCABE, C.; BU, L.; ADNEY, W.S.; HIMMEL, M.E.; CROWLEY, M.F.; BECKHAM, G.T..Computational investigation of glycosylation effects on a Family 1 carbohydrate-binding module. **J Biol Chem**. v.287, p.3147-55, 2012.
- TEJIRIAN, A. and XU, F.. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 48, p. 239–247, 2011.
- TORRES, J.A. AND VELAZQUEZ, G.. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods **Journal of Food Engineering**. v.67, p.95–112, 2005.
- TORREZAN, R. Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de microrganismos em produtos cárneos. **B.CEPPA**. Curitiba, v. 21, n. 2, p. 249-266, 2003.
- UCHIMA, C. A.; TOKUDA, G.; WATANABE, H.; KITAMOTO, K.; ARIOKA, M.A.. Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the termite *Neotermes khoshunensis* in *Aspergillus oryzae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.89, n.6, p.1761-71, 2011.
- URS, R. R.; MAYHEW, D. E.; AND ROBERT, P. D.. Hypovirulence of *Didymella bryoniae* Associated with dsRNA. **J. Phytopathology**. v.152, p.55–59, 2004.
- VAITHANOMSAT, P., APIWATANAPIWAT, W., CHUMCHUENT, N., KONGTUD, W. SUNDHRARAJUN, S. The potential of coconut husk utilization for bioethanol

- production. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. v.45, p.159 – 164, 2011.
- van MARIS, A., WINKLER, A., KUYPER, M., DE LAAT, W., VAN DIJKEN, J. AND PRONK., J.T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerases as a key component. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** v.108, p.179–204, 2007.
- VEELDERS M, BRÜCKNER S, OTT D, UNVERZAGT C, MÖSCH HU, ESSEN LO. Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.107, p.22511-6. 2010.
- VENKATESAGOWDA, B.; PONUGUPATY, E.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R.F.H. . Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. **World journal of microbiology & biotechnology**. v.28, p. 71-80, 2012.
- VRIEND, G. *WHAT IF: A molecular modeling and drug design program.*, **J. Mol. Graph.** v.8, 52-56. 1990. Disponível em: [http://swift.cmbi.ru.nl/what if](http://swift.cmbi.ru.nl/what%20if).
- WANG, J.W.; WU, J.H.; HUANG, W.Y.; TAN, R.X. Laccase production by *Monotospora* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Bioresource Technology**.v. 97, p.786–789, 2006.
- WILSON, D.B.. Cellulases and biofuels. **Current opinion in Biotechnology**. v.20, p.295–299, 2009.
- XIMENES E.A., BRANDON S.K., DORAN-PETERSON J.. Evaluation of a *Hypocrea jecorina* enzyme preparation for hydrolysis of Tifton 85 bermudagrass. **Appl Biochem. Biotechnol.** v.146, p.89-100, 2008.
- XIMENES, E., KIMA, Y., MOSIERA, N., DIEND, B., LADISCHA, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**. v.46, p.170 – 176, 2010.
- YANG, B., JIANG, Y., WANG, R., ZHAO, M., SUN, J..Ultra-high pressure treatment effects on polysaccharides and lignins of longan. **Food Chemistry**, v.112, p.428 – 431, 2009.
- KRIEGER, E. YASARA - Products. [homepage on the Internet] Vienna: YASARA Biosciences GmbH; 1993-2011. Disponível de : <http://www.yasara.org>.

ZANOELO, F. F., POLIZELI, M. DE L. T. DE M., TEREZI H. F., JORGE, J.A..  $\beta$  glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**. v.240, p.137 – 143, 2004.

ZHANG, Y. H. P., HIMMEL, M. E., MIELENZ, J. R.. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**. v.24, p.452-481, 2006.

ZHANG, Y.I.P. and LYND, L.R.. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng**. v.88, p.797 – 824, 2004.

## 8 APÊNDICE

### 8.1 Sequências do rDNA geradas

BTF0919 – 1: 97% de similaridade com *P. variabile*

```
CCAACCCACAAAATGACACCATTACGCCAGCGTCCGAGCCGAAGTCGGTTCATCAGGAGATACACGGGAGGTCCAATCG
CCCCGGGAAAAAAAAGCACCCGAAGGGTGTACATTCAGGGCCTTTGACCGTTCCCCCCAAACCGACGCTGGCCTG
CCGGGGAGGAGTGCACCGGCACACGTGCCGGCTGAGCCTCCCCAGCAAGTCTGGTTGCCAATGCTTCCCTTTCAACAAT
TTCACGTGCTGTTAACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGGCCAATA
TTTAGCTTTAGATGAAATTTACCACCCTTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTGACTCTTGAAGGAGCTTCGCACGGGCG
GGACCACCCATCCCAGACGGGATTCTCACCCTCTATGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGATAGGGGCCACGCCCGAAGC
ATCCTCTCCAAATTACAACCTCGGGCCCCGAAGGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGA
GGCAATCCCTGTTGGTTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCAACATTCCCCCGTCGAGCAAGCGTTCTCGTCGGGGGGG
TCATGCCCGGGTAAAAGCCAGGGCCTCTCCAGCTTTACCCACGAGCGCGCGGGCAGGAAGTCCCAGCCGCCCTCCC
AACTTTTATCTGTTTTTTTTGGTTT
```

BTF0919 – 2 : 98% de similaridade com *P. variabile* KUC1476 (acc. n°. HM469398)

```
GGGGGAAAGAACCAACAGGGTTTGCCTCAGTAACGGCGCGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCCTTCG
GGGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGATGCTTCGGGCGTGGCCCTATCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGTCATAGAGGGT
GAGAATCCCGTCTGGGATGGGTGGTCCCGCCCGTGTGAAGCTCCTTGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAA
GAGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGC
ACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCATTGGCAACCAGACTTGTGGGGGAGGCTCAGC
CGGCACGTGTCCGGTGCACCTCCCCGGCAGGCCAGCGTCCGTTTTGGGCGGTCGGTCAAAGGCCCTGGGAATGTAGC
ACCTTCGGGGTGCCTTATAGCCCGGGGCGCCATGCGACCTGCCCGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGG
CGTAATGGTTGCAATGGCCCGTCTTGAACACAGAACAACATTAGCCGCGTCGAGGAACCTTCTGCTCGGCGGTCATGCG
```

CGGGCTATAAGGAGAAGGGTCTATTCAGGCTTGGACACGACCTGCTGCGGGGAGGAGTCGCAAGCTCACCACGGTCAGC  
 TTCATCTGCTTTATCTCAAGGTTCTTACTATTGCTGCACTCATGACTTTGAATAAC

**BTF0948 – 1 : 99% de similaridade com *Trichoderma* sp KL 2W E11 (acc. n°. JF449619**

AAGAAGCGCTGGTGACTTACGCCAGCATCCTTGCAGATGCGCGGTCTCAGTCCACCGCAGGGTATTATGCAACGGGCTA  
 TAACACTCCCGGAGGAGCCACGTTCCCGAAGCCTTTTTCCCCGCGACGAACTGATGCTGGCCTAGACGCGGCGAAGTGC  
 ACCGGAGAGAACCCCGGATGATCCGCCGCGCCCAAGTCTGGTCACAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTA  
 ACCCTCTTTTCAAGGTGCTTTTCATCTTTGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCAATATTTAGCTTTAGAAGA  
 CATATACCTCCCATTTTGTAGCAGCATTCCCAAACACTCGACTCGTCGAAGGAGCTTTACAGAGGCTCGGCGGCCAGCCAG  
 ACGGGGCTCTCACCCTCTGTGGCGTCCCGTCCAGGAACTCGGGCGGCACCTCACCAAAGCATCCTCTACAAATTACA  
 ACTCGGACCCTAGGGGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGCAATCCCTGTTGGTTTT  
 TTTTCTCCGCTTTATTGATATGCAAA

**BTF0948 – 2: 99% de similaridade com *Trichoderma* sp KL 2W E11 (acc. n°. JF449619**

GAACCAAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGATTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCTAGGGTCCGAG  
 TTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCGCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCG  
 TCTGGCTGGCCGCCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTATAT  
 GTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAAAGAG  
 GGTTAAATAGTACGTGAAATGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGGCGGATCATCCGGGGTTCTCTC  
 CGGTGCACTTCGCCGCTCTAGGCCAGCATCAGTTCGTCGCGGGGAAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAG  
 TGTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCACCAGC  
 GACCCGTCTTGAACACGGACCAAATACCCAGCATCTGCGATGCGCGGTCTCATCCAGGTATTAGCACGGCTATACCTC  
 GCAGAACACCCTTCCGACATTAGCGTAAGCGAACGCGGAAAGCAATGCCACTGCCACTTTTCATTTTATATTCTTTTT  
 AGGGTTTTCTTTTCTGGGGG

## 8.2 Conquistas

### 8.2.1 Projetos iniciados pela tese

2010 – Projeto MCT (Ministério da Ciência e Tecnologia – Suporte Financeiro)

Projeto: Seleção e isolamento de celulasas e de genes de fungos isolados da casca de coco e inserção em *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol.

Coordenadores: Antonio Alberto Ribeiro Fernandes e Patrícia Machado Bueno Fernandes

2011 – Projeto Vale

Projeto: Pesquisa e Desenvolvimento de um aglomerante vegetal a partir de resíduos agroindustriais

Coordenador: Antonio Alberto Ribeiro Fernandes

#### 8.2.2 Patentes alcançadas com a tese

ALBUQUERQUE, É. D. ; FERNANDES, A.A.R. ; FERNANDES, P. M. B.. **PATENT - Processo de Hidrólise Enzimática sob Alta Pressão Hidrostática a Partir de Resíduos Agroindustriais. 2011-2012.** Patente: Privilégio de Inovação. Número de registro : PI1104157-9. Data de Depósito: 03/08/2011. Premio Medalha de Ouro na Feira Internacional de Patentes (FINEX) como o melhor trabalho na área de meio ambiente. <http://descubracastelo.com.br/resultados-da-finex-ira-2013/>

ALBUQUERQUE, É. D., CORREA, J. S., FERNANDES, P. M. B, FERNANDES, A.A.R. et al. **PROCESS FOR OBTAINING CARBOXYMETHYL CELLULOSE FROM AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES AND CARBOXYMETHYL CELLULOSE AND USE THEREOF.** 2013. Categoria: Produto e Processo. Depositado no USPTO: United States (USA). Patente de Invenção. US13890996. Data de depósito: 09/05/2013.

#### 8.2.3 Artigo a ser submetido:

Albuquerque, E. D.; Torres, F.A.; Fernandes, A. A. R. ; Fernandes, P. M. B. **Increase of the cellulases activities for Hydrolysis of coconut husk by making use of High Hydrostatic Pressure.** (Em preparação; será submetido ao jornal “Applied Microbiology and Biotechnology”).