



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

ISABEL ZAPAROLI ROSA

**Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de
celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para
sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**

São José do Rio Preto

Junho de 2014

ISABEL ZAPAROLI ROSA

Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Ibilce, da Universidade Estadual Paulista-Unesp, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia Industrial e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

Junho de 2014

Rosa, Isabel Zaparoli.

Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar / Isabel Zaparoli Rosa. -- São José do Rio Preto, 2014

77 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Fungos termofílicos. 3. Celulase. 4. Bagaço de cana. I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
III. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Isabel Zaparoli Rosa

Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanasas e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia Ambiental e Aplicada, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

USP – São Paulo

Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

13 de Junho de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais José Antônio Rosa e Amélia Zaparoli Rosa por sempre acreditarem e me incentivarem na busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu esteio nos momentos de dificuldade, por colocar em meu coração a certeza de que Nele tudo posso e por me capacitar para tudo aquilo a que Ele me destina.

À professora Doutora Eleni Gomes, pela orientação.

Aos meus pais, pelo incansável apoio, por toda dedicação e amor e por tudo que me ensinaram e ensinam. Sem vocês nada seria possível. Amo vocês.

Ao meu irmão, que além de irmão é amigo. Obrigada pela torcida de sempre. “Tamo junto, irmão.”

Ao meu amigo, parceiro e namorado Diego, obrigada por toda paciência, por toda sinceridade, carinho e amor. Sem você tudo seria menos bonito na minha caminhada e o brigadeiro seria menos doce, rs. Amo-te.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, sou muito grata a todos os momentos compartilhados. Em especial aos irmãos de coração que ali ganhei, Gi, Josi, Jana, Bela, Rafa, Fernando, Pedro, Diego e Júnior, vocês são feras.

À Unesp e a todos os seus funcionários, em especial aos funcionários da sessão de pós de graduação.

À Capes pela bolsa de estudos concedida.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito menos sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Resumo

Devido à crescente demanda por combustíveis, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de se obterem novos tipos de biocombustíveis provenientes de fontes renováveis. O etanol celulósico tem sido cogitado como complemento da produção de etanol, entretanto, a viabilização desse processo requer o desenvolvimento de tecnologias de sacarificação dos materiais lignocelulósicos, por via bioquímica, como a enzimática, ou por métodos abióticos. Os fungos filamentosos são um grupo de microrganismos secretores de enzimas que atuam na degradação de biomassa. As enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico clivam as ligações que formam os polímeros de polissacarídeos liberando hexoses e pentoses fermentescíveis a etanol, porém, enzimas acessórias como a celobiose desidrogenase, são importantes na eficiência do processo. O presente projeto visou o isolamento de cepas fúngicas termofílicas com habilidade de secretar aquelas enzimas, assim como, a obtenção de preparados enzimáticos com estabilidade às variações de temperatura e pH que ocorrem durante as etapas da hidrólise. Foram isoladas 32 linhagens de fungos capazes de crescer em temperaturas entre 45 e 60°C, tendo sido selecionadas cinco para as etapas seguintes do trabalho (*Thermomyces lanuginosus* S1, *T. lanuginosus* S3, *Rasamsonia emersonii* S10, *T. lanuginosus* FZI e *R. emersonii* BC) em função de apresentarem crescimento a 60°C. Entre essas linhagens, as maiores atividades de β -glicosidase (52 U/g) e endoglucanase (579 U/g) foram obtidas em meio de cultivo da cepa *R. emersonii* S10 em 240h para ambas as enzimas. A melhor atividade de FPase foi apresentada pelo fungo *T. lanuginosus* S1 em 168h de cultivo, tendo produzido 262,8 U/g da enzima. O fungo *R. emersonii* S10 foi o único que apresentou a produção detectável das enzimas avicelase (9,2 U/g) e β -xilosidase (910,7 U/g). Esse isolado também produziu as maiores atividades de xilanase com 8684,8 U/g. A atividade da celobiose desidrogenase foi detectada em todas as linhagens, sendo o isolado *R. emersonii* BC o que apresentou a maior produção, com 7,2 U/mL em 288 h. Dentre esses cinco, três foram selecionados para a etapa de caracterização e apresentaram diferentes perfis de estabilidade em função da variação de temperatura e pH. Além disso, foi possível obter enzimas celulolíticas termofílicas com atividade e estabilidade a 80°C.

Palavras-chave: Fungos termofílicos. Celulases. Isolamento. Termoestabilidade.

Abstract

Owing the growing demand for fuels, research is being done with the aim of obtaining new types of biofuels from renewable resources. Cellulosic ethanol, obtained from residual biomass from agricultural and agro-industrial processes has been considered as a complement of ethanol production by decreasing the need for expansion of sugarcane areas. However, the viability of the process requires the development of technologies saccharification of lignocellulosic materials by biochemical route, such as enzymatic or abiotic methods. The filamentous fungi are a group of microorganisms that produce (secretory) of enzymes involved in the degradation of biomass. The enzymes cleave hemicellulolytic and cellulolytic complex connections that form polymers of polysaccharides present in the biomass releasing fermentable hexoses and pentoses to ethanol, however, accessory enzymes such as cellobiose dehydrogenase are important in the process efficiency. This design aimed at the isolation of thermophilic fungal strains with the ability to secrete those enzymes, as well as the enzyme preparations to obtain stability to pH and temperature variations that occur during the hydrolysis step. 32 fungal strains capable of growing at temperatures between 45 and 60 °C were isolated, five were selected to continue the following work steps (*Thermomyces lanuginosus* S1, *T. lanuginosus* S3, *Rasamsonia emersonii* S10, *R. emersonii* BC and *T. lanuginosus* FZI) as a function of experiencing growth at 60 °C. Among these strains, the highest activities of β -glucosidase (52 U/g) and endoglucanase (579 U/g) were obtained from the culture medium of strain *R. emersonii* S10 in 240h for both enzymes. The best activity FPase (cellulase that hydrolyzes filter paper) was presented by the fungus *T. lanuginosus* S1 in 168h of cultivation, having produced 262.8 U/g enzyme. The *R. emersonii* S10 was the only fungus that showed detectable avicelase production of enzymes (9.2 U/g) and β -xylosidase (910.7 U/g). This isolate also produced the highest xylanase activities to 8684.8 U/g. The cellobiose dehydrogenase activity was detected in all strains, and the isolate *R. emersonii* BC with the highest production, with 7.2 U/ml in 288 h. Of these five, three were selected for the characterization step and showed different stability profiles due to changes in temperature and pH. Furthermore, it was possible to obtain thermophilic cellulolytic enzymes with activity and stability at 80 °C.

Keywords: Thermophilic fungi. Cellulases. Isolation. Thermostability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Constituintes lignocelulósicos da biomassa vegetal. a) Material lignocelulósico em micrografia. b) Disposição do material lignocelulósico.....	16
Figura 2. Estrutura da celulose. Microfibrila que se arranjam formando as fibras celulósicas.....	18
Figura 3. Esquema da estrutura da lignina. a) Álcool cumárico; b) Álcool conoferílico; c) Álcool sinapílico.....	20
Figura 4. Visão esquemática da biodegradação da celulose.....	21
Figura 5. Representação esquemática da organização estrutural da celobiose desidrogenase (CDH) e suas funções naturais.....	24
Figura 6. Representação esquemática de uma molécula de xilana e da atuação das enzimas do sistema xilanolítico.....	25
Figura 7. Representação de alguns dos microprocessos que ocorrem durante a FES.....	29
Figura 8. Distribuição dos isolados a 45 e 55°C de acordo com a temperatura na qual apresentaram melhor crescimento: Melhor crescimento a 37°C, melhor crescimento a 45°C, melhor crescimento a 55°C e melhor crescimento a 60°C.....	43
Figura 9. Perfil de crescimento do fungo CH1, isolado a 45°C, em diferentes temperaturas.....	44
Figura 10. Figura 10: Perfis de crescimento, nas quatro diferentes temperaturas propostas, dos fungos <i>T. lanuginosus</i> S3 (a), <i>T. lanuginosus</i> S1 (b), <i>T. lanuginosus</i> FZI (c), <i>R. emersonii</i> S10 (d) e <i>R. emersonii</i> BC (e), isolados a 55°C.....	45
Figura 11. Produção de celulases pelos isolados pré-selecionados. a) β -glicosidase; b) Endoglucanase; c) FPase; d) Avicelase. Perfil de fermentação ao longo de um período de 14 dias, usando como substrato mistura de bagaço de cana, farelo de trigo e palha de milho, na proporção de 1:1:1 (p/p). Atividades enzimáticas a 60°C.....	46
Figura 12. Perfil de produção de β -glicosidase pelos fungos <i>T.lanuginosus</i> FZI e <i>R. emersonii</i> S10, por FES em meio de mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.....	47
Figura 13. Perfil de produção de endoglucanase pelos fungos <i>T.lanuginosus</i> S1 (a) e <i>R. emersonii</i> S10 (b), por FES em uma mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.....	48

Figura 14. Perfil de produção de FPase pelos fungos <i>T. lanuginosus</i> S1 (a) e <i>T. lanuginosus</i> S3 (b), por FES em mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.....	49
Figura 15. Perfil de produção de avicelase ao longo do tempo pelo fungo <i>R. emersonii</i> S10, por FES a partir de uma mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.....	49
Figura 16. Produção de xilanases. a) Xilanases e b) β -xilosidase pelos fungos termofílicos isolados selecionados, utilizando como substrato mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo, na proporção de 1:1:1 (p/p).....	50
Figura 17. Perfil de produção de xilanase ao longo do tempo de cultivo dos fungos <i>T. lanuginosus</i> S3 (a), <i>T. lanuginosus</i> FZI (b) e <i>T. lanuginosus</i> S1 (c), por FES em uma mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.....	51
Figura 18. Perfil de produção de β -xilosidase ao longo do tempo de cultivo do fungo <i>R. emersonii</i> S10, por FES em meio composto por mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.....	52
Figura 19. Produção de celobiose desidrogenase pelos isolados selecionados. Perfil de fermentação realizado pelo período de 14 dias, usando como substrato mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo, na proporção de 1:1:1 (p/p). Atividades enzimáticas a 60°C.....	52
Figura 20. Efeito da variação do pH na produção enzimática. a) FPase; b) CMCCase; c) xilanase e d) β -glicosidase.....	55
Figura 21. Efeito da variação da temperatura na produção enzimática. a) FPase; b) CMCCase; c) xilanase e d) β -glicosidase.....	57
Figura 22. Estabilidade das enzimas FPase (a), CMCCase (b); Xilanase (c) e β -glicosidase (d) em função do pH do meio, após 24 horas de incubação.....	58
Figura 23. Estabilidade de FPase (a), CMCCase (b), Xilanase (c) e β -glicosidase (d) em função da temperatura de incubação.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolamento e seleção dos fungos a partir de diferentes tipos de amostras providas do meio ambiente.....	37
Tabela 2. Produção de celulases e xilanases pelos isolados, em 336 horas de fermentação.....	40
Tabela 3. Produção de celobiose desidrogenase pelos isolados, na triagem inicial (336 horas de fermentação).....	42
Tabela 4. Produção de celobiose desidrogenase pelos isolados selecionados.....	53
Tabela 5. Cepas selecionadas para serem caracterizadas de acordo com o melhor desempenho fermentativo observado durante os 14 dias de fermentação. Enzimas a serem caracterizadas: FPase, xilanase, CMCCase e β -glicosidase.....	54
Tabela 6. Síntese das atividades máximas de cada enzima em função da temperatura e pH de reação.....	57

LISTA DE SIGLAS

CAPS	3-(Ciclo hexilamino)-1-ácido propanosulfônico
CBH	Celobiohidrolase
CDH	Celobiose desidrogenase
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FES	Fermentação em estado sólido
FPase	Atividade enzimática em papel de filtro
GP	Grau de polimerização
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico
IC	Índice de cristalinidade
LCM	Material lignocelulósico
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
G	Gás
L	Líquido
S	Sólido
T	Temperatura

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Revisão Bibliográfica	16
2.1. Lignocelulose	16
2.1.1. Celulose	16
2.1.2. Hemicelulose	18
2.1.2.1. Xilanas	19
2.1.3. Lignina.....	19
2.2. Enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico.....	20
2.2.1. Endoglucanases	22
2.2.2. Exoglucanases	22
2.2.3. β -Glicosidasas.....	22
2.2.4. Celobiose Desidrogenase.....	23
2.2.5. Endoxilânase.....	25
2.2.6. β -xilosidase.....	25
2.3. Fungos filamentosos	26
2.3.1. Microrganismos termofílicos.....	26
2.3.2. Enzimas de termofílicos	27
2.4. Fermentação em estado sólido (FES)	28
3. Objetivo	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivo específico.....	31
4. Materiais e métodos	31
4.1. Meios de cultivo	31
4.1.1. Meio nutriente líquido para as coletas de amostras.....	31
4.1.2. Meio nutriente sólido para isolamento	32
4.1.3. Meios de cultivo para fermentação em estado sólido (FES)	32
4.2. Isolamento dos fungos filamentosos	32
4.3. Avaliação do efeito da temperatura de incubação sobre o crescimento da colônia em meio sólido ..	33
4.4. Pré inóculo para as fermentações em estado sólido (FES).....	33
4.5. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido (FES)	33

4.6. Determinação das atividades enzimáticas	34
4.6.1. Xilanase	34
4.6.2. Atividade em papel de filtro (FPase).....	34
4.6.3. Endoglucanase	34
4.6.4. β -glicosidase	35
4.6.5. β -xilosidase.....	35
4.6.6. Avicelase	35
4.6.7. Celobiose desidrogenase (CDH)	36
4.7. Caracterização das enzimas.....	36
4.7.1. Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades das enzimas.....	36
4.7.2. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas.....	36
5. Resultados e discussão.....	37
5.1. Isolamento de fungos.....	37
5.2. Avaliação quantitativa inicial da produção das enzimas pelos fungos isolados.....	39
5.3. Avaliação do efeito da temperatura sobre o crescimento em meio sólido das cepas isoladas	43
5.4. Avaliação da influência do tempo de fermentação na produção das enzimas pelos isolados pré-selecionados	46
5.5. Caracterização das enzimas.....	53
5.5.1. Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades das enzimas.....	54
5.5.2. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas quando em ausência de substrato.....	57
6. Conclusões	60
Referências	62

1. Introdução

A crescente demanda energética mundial, a possibilidade de redução das reservas fósseis em um futuro próximo, bem como a preocupação com as questões ambientais, impulsionam pesquisas sobre combustíveis renováveis, obtidos a partir de fontes amplamente disponíveis, de baixo custo, e que representem tecnologias limpas. Nesse sentido, e além de se tratar de uma necessidade econômica, o interesse pelo etanol de segunda geração, ou seja, aquele obtido a partir da degradação de materiais lignocelulósicos, tem crescido na atualidade (MASAMI et al., 2008; SEDLMEYER, 2011).

Materiais lignocelulósicos residuais são reservas em potencial para a produção de etanol assim como outros produtos de alto valor agregado (KANG et al., 1999). A conversão eficiente de materiais lignocelulósicos (LCMs) em álcool etílico combustível transformou-se em uma prioridade mundial dentro do contexto de energia renovável (HILL et al., 2006). Entretanto, a hidrólise desses materiais a açúcares fermentescíveis requer métodos eficientes, específicos e de baixo custo de modo a viabilizar economicamente o processo.

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, apesar de atender aos critérios de eficiência e especificidade, ainda tem custo muito alto para a proposta de produção de etanol, requerendo um sistema de produção que permita um baixo custo do preparado enzimático final. A produção de enzimas utilizando o bagaço de cana e outros resíduos com características similares, como farelo de trigo, sabugo e palha de milho, palha e casca de arroz, farelo de soja, cevada e casca de café, que são abundantes no Brasil, como substrato para os microrganismos produtores de enzimas pode ser uma alternativa viável para esse processo (BALDRIAN e VALASKOVÀ, 2008; SÁNCHEZ, 2009). Entretanto, cepas de microrganismos e sistemas de fermentação que atendam a essa necessidade biotecnológica precisam ser buscadas.

Além da produção de biocombustíveis há um grande interesse na utilização de celulasas e xilanasas na bioconversão da biomassa lignocelulósica em açúcares que podem ser utilizados na produção de outros compostos biotecnológicos, tais como xilitol e xilo-oligossacarídeos (SINGHANIA et al., 2010).

As celulasas são enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose, o principal componente da parede celular vegetal. As três principais celulasas são endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase, que agem de forma sinérgica para a completa hidrólise do polímero (LYND et al., 2002; YEOMAN, 2010). As hemicelulasas são glicosídeo hidrolases

que catalisam a hidrólise dos polissacarídeos hemicelulósicos, são divididas em xilanas, mananas, galactanas e galacturonanas (AWAFO, 1997).

Os microrganismos são fontes preferenciais de celulasas, devido à ampla diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética (YEOMAN et al., 2010). Entre eles, os melhores produtores das citadas enzimas de degradação de material lignocelulósico, são os fungos filamentosos em virtude de sua estrutura filamentosa e do seu grande potencial secretor, permitindo eficiência na obtenção de preparados enzimáticos com elevado poder de hidrólise. O conhecimento de novas linhagens com boa produção enzimática é de grande interesse biotecnológico, não apenas para obtenção de biocatalisadores que apresentem características adequadas aos processos industriais aos quais se destinam, mas também para o conhecimento e exploração da biodiversidade microbiana.

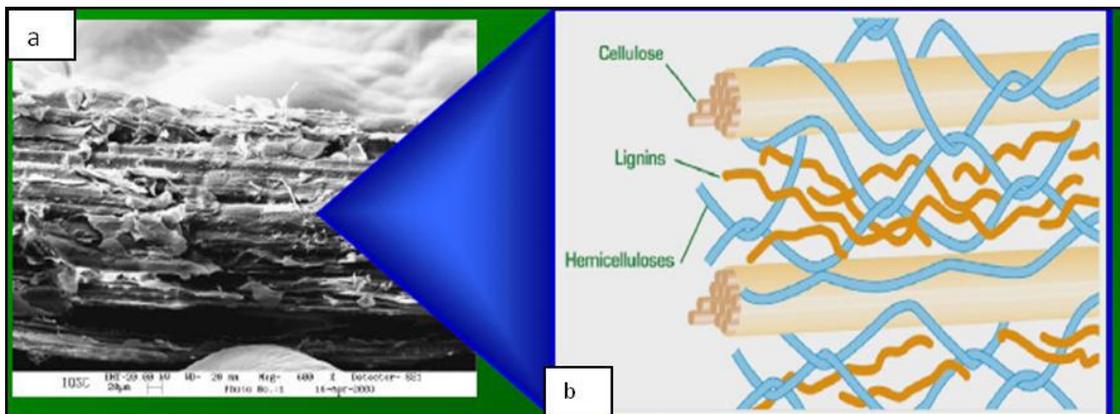
Com essa proposta em vista, no presente trabalho foram isoladas cepas fúngicas termofílicas a fim de se obterem preparados enzimáticos com atividade de celulasas e xilanases que apresentassem propriedades de termo resistência.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Lignocelulose

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, dessa forma, em sua maior parte são compreendidas por resíduos agroindustriais, urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. As três principais frações poliméricas que compõem a biomassa lignocelulósica são lignina, hemicelulose e celulose (Figura 1), as quais estão unidas entre si por ligações covalentes e não covalentes, fazendo com que seja formada uma complexa rede resistente à ação microbiana (JEFFRIES, 1990). Esses três constituintes juntos são responsáveis por mais de 90% de toda a massa seca dos materiais. Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas em espirais, conferindo força e flexibilidade ao material. A lignina tem a função de aumentar a resistência das estruturas as quais envolve contra ataques enzimáticos e químicos, fato observado no caso de sua interação com a celulose. A hemicelulose que é a última fração, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina (SZENGYEL, 2000).

Figura 1. Constituintes lignocelulósicos da biomassa vegetal. (a) Material lignocelulósico em micrografia. (b) Disposição do material lignocelulósico.



Fonte: Adaptado de BOUDET et al., (2003).

2.1.1. Celulose

A celulose representa um dos maiores complexos naturais de carbono orgânico presente na estrutura da parede celular de plantas (BADHAN et al., 2007). Dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (BAYER e LAMED, 1993).

Por fazer parte do tecido das plantas, é constantemente ressintetizada pela fotossíntese e é também responsável pela resistência à pressão osmótica observada tanto nas células de frutas e hortaliças, quanto nas de plantas de porte superior, portanto, está intimamente relacionado com suas sustentações; possui uma biossíntese anual estimada em 10^{11} toneladas (SUN et al., 2004, LEITE et al., 2008). É um homopolissacarídeo não ramificado que consiste em ligações β -1,4 glicosídicas de unidades de anidroglicose (D-glicopiranoose). A análise estrutural da cadeia polimérica informa que sua unidade de repetição é a celobiose (RAMOS, 2003). Fato que se deve às ligações do tipo β , que promovem a união dos monômeros de glicose, fazendo com que moléculas adjacentes encontrem-se arranjadas com uma rotação de 180° entre si e formem cadeias retas bem longas (STRYER, 1996).

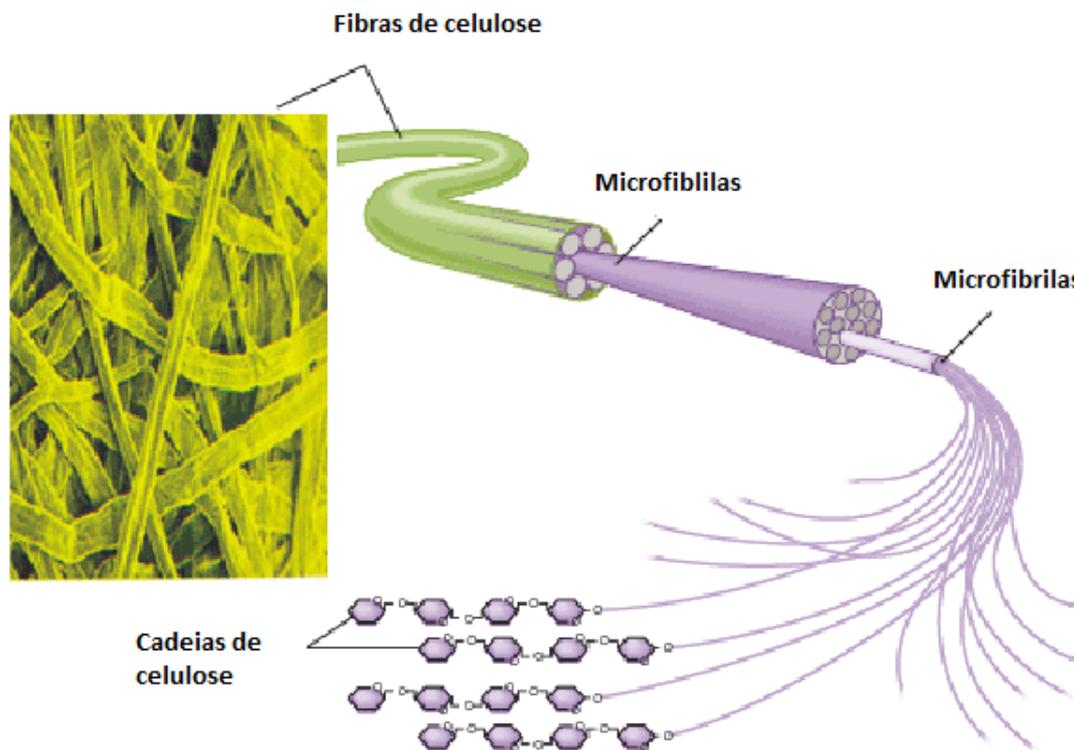
As ligações β possibilitam a ocorrência de interações não só intramoleculares (duas por unidade de glicose), mas também intermoleculares (de duas a três por molécula), do tipo ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, fazendo com que sejam formadas fitas planas de anéis de glicopiranoose simetricamente dispostas às quais compõem uma estrutura altamente cristalina, estável e com uma alta força de tensão (ZHANG e LYND, 2004).

Dois importantes propriedades que auxiliam na diferenciação e classificação dos polímeros celulósicos são o grau de polimerização (GP), e o índice de cristalinidade (IC). O GP (que se trata do número de unidades de glicose anidra presente em cada fibra) informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de endo e exoenzimas, respectivamente. Ele pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como pode também ser inferido a partir de sua viscosidade. Já o IC está associado à reatividade do substrato, e pode ser quantificado pela técnica de difração de raios-X, utilizando-se equações intrínsecas ao tipo de celulose avaliado.

Feixes de cerca de 40 moléculas de celulose se agregam e formam a fibrila elementar (3,5 nm) as quais (cerca de 10 a 20 fibrilas elementares) irão constituir as microfibrilas (10-30 nm), que são arranjadas em conjunto e, formam assim, as chamadas fibrilas de celulose que são independentes e fracamente unidas por pontes de hidrogênio (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009) (Figura 2). A agregação de cerca de 20 microfibrilas constituirão as macrofibrilas que formarão as lamelas da parede celular.

Quando as microfibrilas se encontram ordenadas, formam a região cristalina que se alterna com a região amorfa (menos ordenada).

Figura 2. Estrutura da celulose. Microfibrilas que se arranjam formando as fibras celulósicas.



Fonte: (<http://nutrition.jbpub.com/resources/chemistryreview9.cfm>)

2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídico ramificado, formado principalmente por pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais acetila (DEMIRBAS et al., 2011). Representa de 15 a 35% da biomassa vegetal e tem como função unir quimicamente a celulose e a lignina, além de interagir covalentemente com a pectina, resultando em um material flexível, porém altamente resistente a espécies químicas (GIRIO et al., 2010).

Essa fração da biomassa pode representar até 40% do peso seco de resíduos lignocelulósicos e sua degradação é realizada por hemicelulases como a xilanase, que hidrolisa este heteropolissacarídeo. As hemiceluloses são divididas em xilanas, mananas, galactanas e galacturonanas (AWAFO, 1997), que apresentam suas unidades monoméricas

unidas por ligações do tipo 1,3, 1,4 e 1,6 (SZENGYEL, 2000). As maiores proporções ficam a cargo das xilanas, que consistem em moléculas de xilose unidas por ligação β -1,4 (DAMASO et al., 2004).

2.1.2.1. *Xilanas*

A xilana é o principal componente da hemicelulose e o segundo mais abundante polissacarídeo natural existente (SARATALE et al., 2012). Encontra-se localizada entre a molécula de lignina e o conjunto de fibras de celulose e é um polímero linear com a cadeia principal composta por resíduos de β -xilopiranosose unidos através de ligação glicosídica do tipo β (1-4), podendo apresentar várias substituições. Na natureza, a cadeia principal desse polissacarídeo pode ter adição de unidades de ramificações como 4-O-metil- α -D-glicuronopiranosil, grupos acetil, α -L-arabinofuranosil, em diversas proporções dependendo do tipo de planta (POLIZELI et al., 2005).

A completa degradação requer a ação de um sistema de enzimas com diferentes especificidades e modos de ação - denominado sistema xilanolítico. Os fungos filamentosos são especialmente importantes na secreção dessas enzimas dentro do meio em que estão contidos e seus níveis de secreção são elevados quando comparados aos de outros microrganismos (BISWAS et al., 2010; POLIZELI et al., 2005).

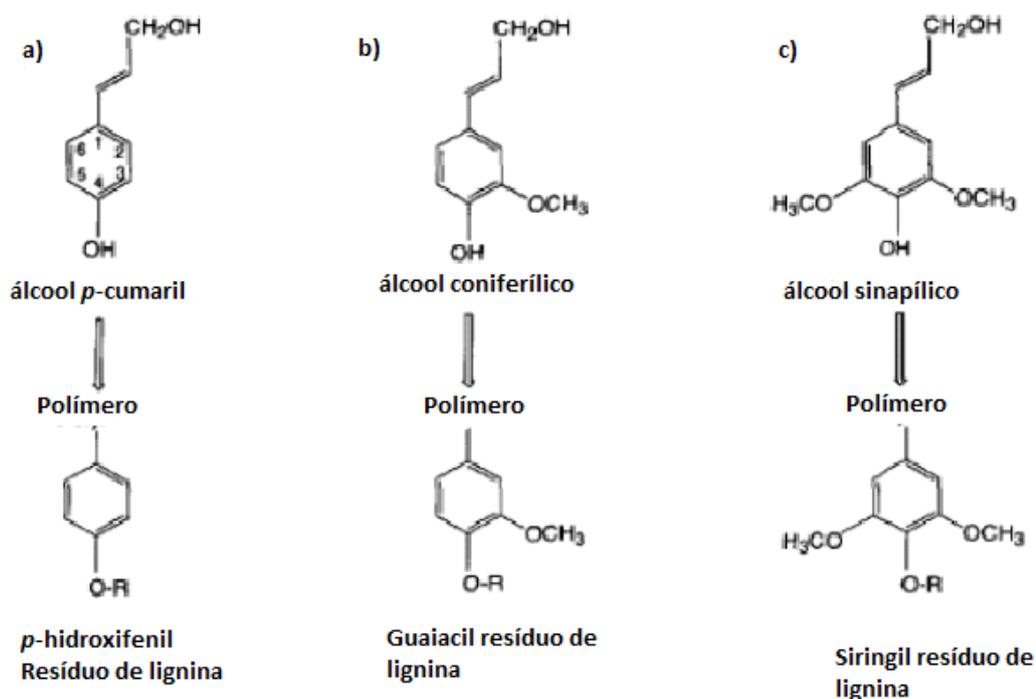
2.1.3. *Lignina*

A lignina, juntamente com a celulose e a hemicelulose, é um dos principais constituintes do material lignocelulósico. Está presente em cerca de 20 a 30% na composição na madeira e 16 a 33% presente na biomassa das plantas superiores. Trata-se de um polímero aromático, heterogêneo, amorfo de elevada massa molecular com estrutura muito complexa, formado por ligações éter biologicamente estáveis e por unidades fenólicas (HIGUCHI, 1982; SILVA e GOMES, 2004).

A molécula de lignina é convencionalmente definida como uma rede hidrofóbica complexa de unidades fenilpropanóidicas derivadas da polimerização oxidativa de três álcoois precursores (originados por metoxilação do ácido p-hidroxicinâmico - coniferílico, sinapílico e p-cumarílico), que dão origem às subunidades p-hidroxifenil, guaiacil e siringil (Figura 3). Esses álcoois podem formar um complexo polimérico com uma elevada variedade de interações intermoleculares – pelo menos 20 – por meio de ligações a sítios variados

(HIGUCHI, 1982; SEDEROFF et al., 1999). Sua função biológica é proteger o tecido vegetal contra a oxidação, degradação enzimática e ação de microrganismos.

Figura 3. Esquema da estrutura da lignina: precursores estruturais. (a) Álcool cumárico; (b) Álcool coniferílico; (c) Álcool sinapílico.



Fonte: Adaptado de WHETTEN e SEDEROFF, (1995).

2.2. Enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico

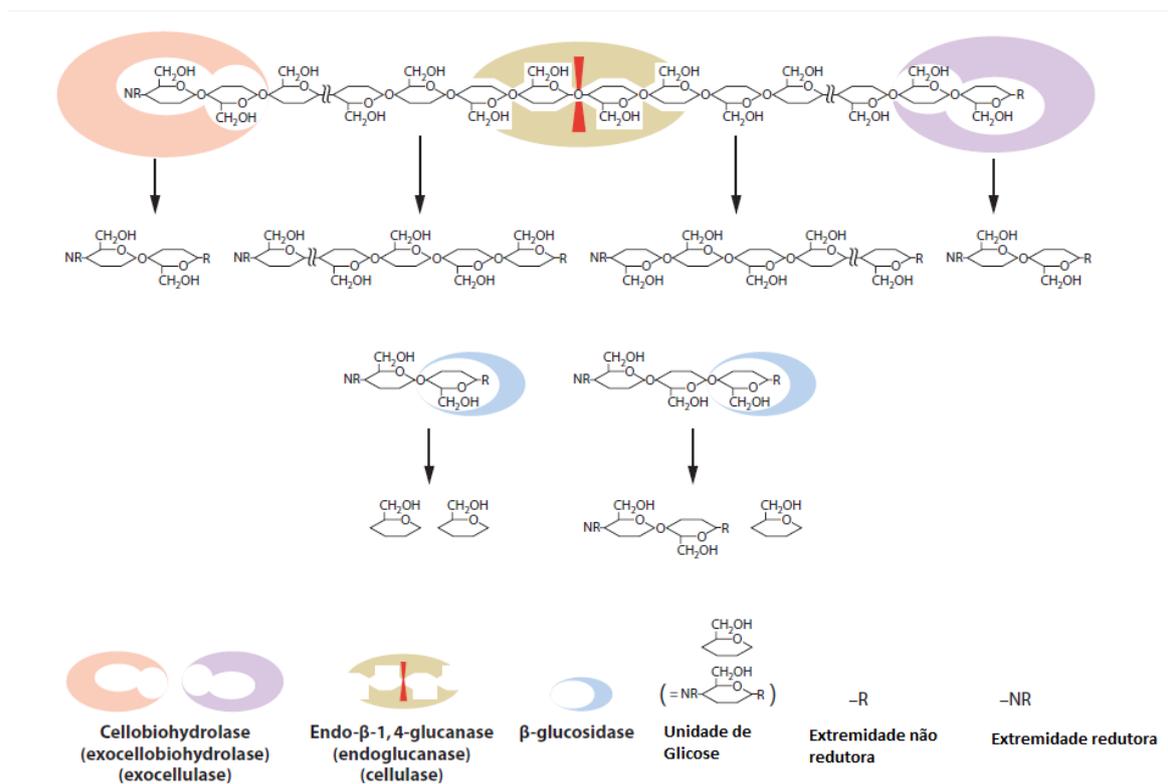
Compreender a ordem na qual as enzimas são secretadas durante a degradação lignocelulósica é relevante tanto para uma melhor compreensão dos mecanismos básicos da degradação por fungos, quanto em relação às tentativas industriais de controle das reações durante a produção dos combustíveis biológicos e as demais tecnologias do bioprocessamento (MAHESHWARI et al., 2000). Muito se sabe sobre as enzimas que são produzidas e seu efeito em substratos isolados, mas pouco é sabido sobre a variação temporal e a atividade relativa das enzimas em substratos lignocelulósicos diferentes (DUNCAN, 2010).

A biodegradação da celulose é feita por um complexo de enzimas oxidativas e hidrolíticas que agem sinergisticamente na transformação da molécula em monômeros e

dímeros de glicose (Figura 4). Esse complexo é formado por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase (GOYAL, 1991), classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico: a) Endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases, que atuam na região terminal da celulose; e c) β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (LYND et al., 2002). Entre as enzimas oxidativas, encontramos a celobiose desidrogenase. Essa enzima oxida a celobiose e celo oligossacarídeos de elevado peso molecular, utilizando uma ampla faixa de aceptores de elétrons, como quinonas, radicais fenólicos, oxigênio, Fe^{3+} , Cu^{2+} (FLITSCH et al., 2013).

Os sistemas xilanolíticos microbianos podem ser divididos em duas categorias: a das enzimas que degradam a cadeia principal do polissacarídeo, e a das enzimas que quebram e liberam as cadeias laterais - enzimas xilanolíticas acessórias (RYABOVA et al., 2009).

Figura 4. Visão esquemática da biodegradação da celulose.



Fonte: Adaptado de WATANABE e TOKUDA, (2010).

2.2.1. *Endoglucanases*

As endoglucanases são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula. *Endoglucanases ou carboximetilcelulases (CMCases)* (EG, endo-1,4- β -D-glucana 4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.4): atacam regiões de baixa cristalinidade (ou amorfas) das cadeias de celulose, diminuindo o grau de polimerização da mesma, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos e fornecendo mais extremidades para a ação das exoglucanases; liberam novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (CASTRO e PEREIRA JR, 2010; COUGHLAN e LJUNGDAHL, 1988).

2.2.2. *Exoglucanases*

Exoglucanases ou celobiohidrolases (Avicelase) (CBH, 1,4- β -D-glucana celobiohidrolase, EC 3.2.1.91): hidrolisam as ligações glicosídicas a partir das extremidades redutoras (CBH I) e não redutoras (CBH II) das cadeias de celulose, liberando unidades de celobiose; normalmente as 14 exoglucanases atuam tanto nas regiões cristalinas (o que não é comum para as endoglucanases) como também nas regiões amorfas da celulose, porém o GP ocorre de forma lenta (VOUTILAINEN, 2010; COUGHLAN e LJUNGDAHL, 1988).

2.2.3. *β -glicosidases*

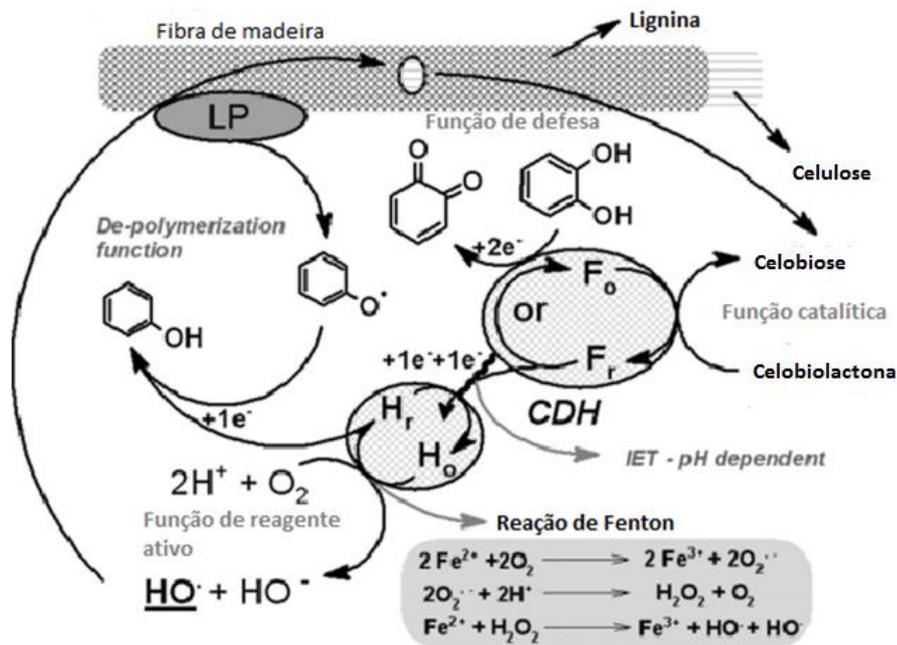
As β -glicosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose (LYND et al., 2002; LYND e ZHANG, 2002). Para a degradação eficiente da celulose cristalina, é necessária a ação das endo e exoglucanases (HENRISSAT e BAIROCH, 1996) e as β -glicosidases completam a hidrólise por meio de clivagem da celobiose, que resulta em unidades de glicose (VOUTILAINEN, 2010). Assim sendo, as β -glicosidases tornam-se o fator limitante e são responsáveis pela regulação de todo o processo celulolítico (YEOMAN et al., 2010).

2.2.4. Celobiose desidrogenase

A celobiose desidrogenase (CDH), é a única flavoenzima extracelular conhecida (STOICA et al., 2009). Essa enzima possui dois domínios distintos: um domínio flavina que contém FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e um domínio heme, com um heme tipo citocromo b (CAMERON e AUST, 2001). O domínio flavina oxida sozinho a celobiose a taxas idênticas à da enzima de comprimento completo, o que sugere que o domínio heme N-terminal é indispensável para o efeito estimulador necessário para o aumento da degradação de celulose (PHILLIPS et al., 2011). A CDH oxida vários açúcares como celobiose, lactose, oligômeros de glicose e, inclusive a celulose, a seus ácidos carboxílicos correspondentes (SAHA et al., 2008). Como aceptor de elétrons para fechar o seu ciclo catalítico, essa enzima pode utilizar quinonas, citocromos, radicais orgânicos, O₂ molecular, íons Fe³⁺ e Cu²⁺. Ao reduzir Fe³⁺ a Fe²⁺, a celobiose desidrogenase pode gerar radicais hidroxila via reação de Fenton, os quais podem atuar na despolimerização dos polissacarídeos (celulose) e na modificação estrutural da lignina (figura 5); esse seria o modo através do qual uma substancial redução do grau de polimerização da celulose pode ser conseguida sem uma liberação significativa de açúcar (SADDLER et al., 1997). O H₂O₂ envolvido na reação é possivelmente gerado por várias vias que incluem a redução de O₂ pela própria celobiose desidrogenase ou por outras enzimas oxidativas (AGUIAR e FERRAZ, 2011). Essa enzima é expressa sob condições celulolíticas na presença de celulose, concomitantemente com celulasas e hemicelulasas. Parece, portanto provável que CDH seja induzida por baixas concentrações de celobiose (que é o principal produto da degradação enzimática da celulose), mas que também está sujeita à repressão catabólica por concentrações excessivas de celobiose ou glicose (HENRIKSSON et al., 2000). Entre as funções a ela atribuídas estão: oxidação da celobiose, utilização de diversos aceptores de elétrons, prevenção da inibição das celulasas por celobiose (devido ao seu envolvimento na conversão de celobiose em celobiolactona), bem como reduzir radicais fenóis e quinonas gerados durante a degradação da lignina (FLITSCH et al., 2013). Enzimas oxidativas são os principais componentes dos coquetéis enzimáticos secretados por fungos para a degradação da parede celular vegetal (PHILLIPS et al., 2011).

Certo número de fungos celulolíticos, incluindo *Phanerochaete Chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Sporotrichum thermophile*, *Coniophora puteana*, *Schizophyllum commune*, *Humicola insolens*, e *Sclerotium rolfii* produzem celobiose desidrogenase.

Figura 5. Representação esquemática da organização estrutural da CDH e suas principais funções naturais.

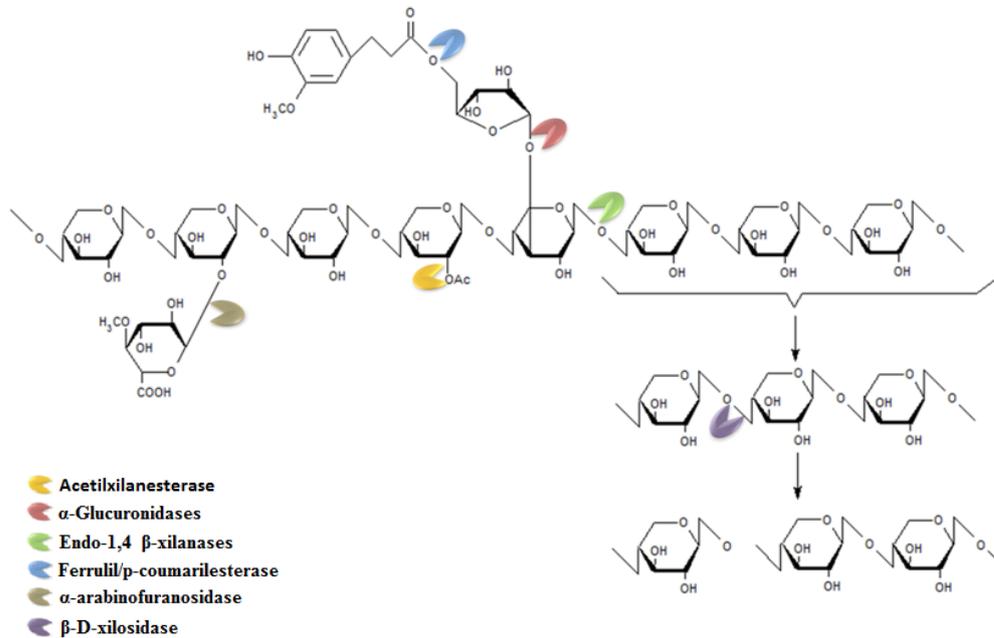


Fonte: Adaptado de STOICA et al., (2009).

Por apresentar estrutura heterogênea, a degradação das hemiceluloses necessita não apenas da ação de uma enzima, mas de um complexo enzimático, incluindo aquelas que atuam nas cadeias laterais dos polímeros. A completa degradação requer a ação de um sistema de enzimas com diferentes especificidades e modos de ação (RYABOVA et al., 2009).

Assim sendo o complexo é composto por (WONG et al., 1988): *Endo-1,4-β-D-xilanases* (EC 3.2.1.8): hidrolisam as ligações β-1,4 da cadeia principal de resíduos de xilose; *1,4-β-D-xilosidases* (EC 3.2.1.37): catalisam a hidrólise da xilobiose e de alguns 1,4-β-D-xilooligossacarídeos a partir da extremidade não redutora; *α-L-arabinofuranosidases* (EC 3.2.1.55): hidrolisam os grupos α-L-arabinofuranosil terminais; *α-glucoronidases* (EC 3.2.1.1): requeridas para a hidrólise das ligações α-1,2 glicosídicas entre xilose e ácido glucurônico ou sua ligação 4-O-metil-éster; *acetil xilana esterases* (EC 3.1.1.72): hidrolisam as ligações entre xilose, ácido acético e ácido ferúlico; *p-coumárico esterases* (EC 3.1.1.-): removem ácidos pirúvico e cumárico dos resíduos de arabinose das cadeias laterais (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática de uma molécula de xilana e da atuação das enzimas do sistema xilanolítico. Ac = Grupo acetil.



Fonte: Adaptado de POLIZELI, (2009).

2.2.5. Endoxilanases

As endoxilanases (β -1,4-xilanases ou endoxilanases) catalisam a hidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas de maneira aleatória, liberando xilobiose e outros xilo-oligossacarídeos, diminuindo o grau de polimerização do polissacarídeo (DODD e CANN, 2009; KOLENOVA et al., 2006; MASLEN et al., 2007).

2.2.6. β -xilosidases

As β -xilosidases podem ter afinidade por xilobiose e xilo-oligossacarídeos (BIELY, 1985). Essas enzimas catalisam a clivagem de xilobiose e atacam extremidades não redutoras em xilo-oligossacarídeos, liberando xilose (SORENSEN et al., 2003; RASMUSSEM et al., 2006). As β -xilosidases são importantes na degradação da xilana, pois removem produtos finais que poderiam inibir as endoxilanases e, com isso limitar a hidrólise do polissacarídeo (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

2.3. Fungos filamentosos

Por possuírem uma diversidade metabólica alta, os fungos filamentosos estão presentes em vários ecossistemas, apresentam crescimento rápido, os meios de cultura onde são cultivados são relativamente simples, são fáceis de manusear, as condições de cultivo são facilmente controladas, ocupam pouco espaço e crescem onde há fonte de carbono associada ao calor e umidade (TREVISAN et al., 2004).

Fisiologicamente os fungos requerem para seu crescimento, a presença de nutrientes essenciais, sejam eles macroelementos (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, potássio e magnésio) ou microelementos (ferro, zinco, cobre, manganês, molibdênio, cálcio e em alguns casos estrôncio, escândio, vanádio, cobalto e gálio). Esses elementos desempenham importante papel na manutenção da viabilidade celular e obtenção de produtos de interesse, sendo necessários para diversas funções fisiológicas, desde a síntese de materiais de parede até a ativação de enzimas-chave do metabolismo (AINSWORTH e SUSSMAN, 1965; MOORE-LANDECKER, 1982; COCHRANE, 1958).

De modo geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, tendo grande importância na reciclagem de nutrientes. Conhecer a microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar à descoberta de processos metabólicos utilizados por esses organismos, tornando-se importante para interações ambientais e aplicações biotecnológicas (LYNCH et al., 1981).

Alguns gêneros de fungos filamentosos podem ser destacados como sendo produtores de celulasas e xilanasas, ficando o *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* como os principais alvos de pesquisa biotecnológica.

2.3.1. Microrganismos termofílicos

A capacidade de se adequar às alterações ambientais é uma das características mais impressionantes da vida na terra. A adaptação de microrganismos em condições extremas está relacionada ao desenvolvimento de componentes celulares e estratégias bioquímicas. Estas estratégias implicam na estabilização de todos os componentes celulares de modo que sua estrutura funcional seja mantida nas novas condições (SANTOS et al., 2001).

Microrganismos capazes de crescer em temperaturas altas são chamados termofílicos ou termófilos e são classificados em termófilos moderados, quando a faixa de temperatura de crescimento está entre 20°C e 55°C; termófilos extremos, quando seu crescimento se dá em temperaturas de 65°C a 85°C; ou ainda hipertermófilos, quando cresce entre 85°C até 110°C. Os microrganismos termófilos moderados podem ser encontrados dentro dos domínios Bacteria, Archaea e Eukarya (fungos filamentosos) (MADIGAN e OREN, 1999). A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve o ajuste da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. Esse amoldamento à termofilia tem despertado grande interesse na biotecnologia, considerando que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses microrganismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia e os bioprocessos (GOMES et al., 2007).

Uma íntima relação é observada entre as características das enzimas (intra e extracelulares) e o nicho ocupado por um determinado microrganismo. Espera-se que microrganismos termófilos produzam enzimas capazes de tolerar uma temperatura correspondente a, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento. Estudos com enzimas de termófilos têm mostrado que essa relação é verdadeira, estimulando o isolamento de novas linhagens termófilas, assim como a caracterização das enzimas produzidas e o entendimento dos fatores que levam a sua termo estabilidade (GOMES et al., 2007; EGOROVA e ANTRANIKIAN, 2005).

2.3.2. Enzimas de termofílicos

A descoberta de microrganismos termofílicos abriu novas oportunidades para a descoberta de enzimas, que apresentem atividades em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos industriais onde esta condição é necessária (HOUGH e DANSON, 1999). As enzimas termofílicas têm se mostrado tolerantes a desnaturantes como detergentes e solventes orgânicos, sendo então de interesse na síntese orgânica (ATOMI, 2005). Essas enzimas possuem temperatura ótima de atividade próxima à temperatura ótima de seu crescimento (BROCK, 1985) e apresentam tantas aplicações biotecnológicas quanto maior for a termo estabilidade da biocatálise, além de proverem dados sobre as bases intrínsecas da estabilidade proteica.

O crescente interesse biotecnológico por essas enzimas é motivado pela capacidade que esses microrganismos apresentam de trabalhar em condições em que as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos são geralmente desnaturadas (HOUGH e DANSON, 1999).

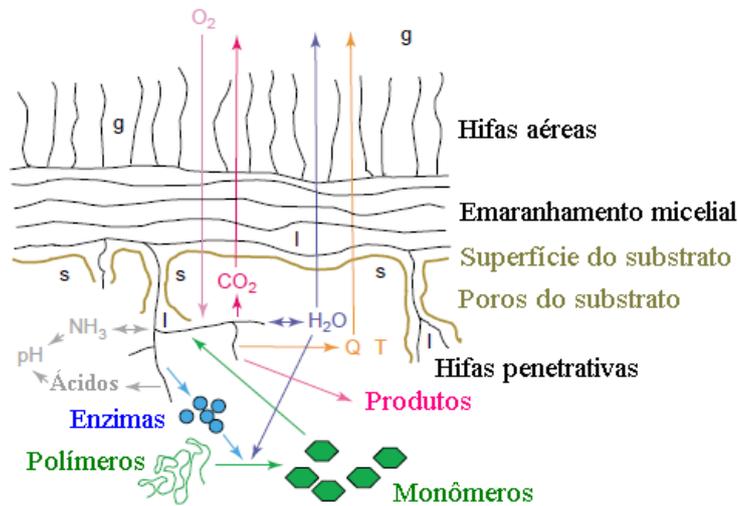
A adaptação da proteína às temperaturas extremas parece ser resultado de um equilíbrio entre o aumento da rigidez responsável pela estabilidade térmica e a flexibilidade requerida para exercer sua função fisiológica. Isso favorece a solubilidade de substratos e produtos e aumenta as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (SHIRAKI et al., 2001; EGOROVA e ANTRANIKIAN, 2005). Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise (GOMES et al., 2007). Junto a isso, a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima, pois um aumento de 10°C na temperatura promove um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade da reação.

Apesar dessas vantagens oferecidas pelas enzimas termofílicas, a aplicação biotecnológica de microrganismos que as produzem tem sido muito limitada até agora. A principal razão para esta contradição está relacionada com o escasso número de linhagens termofílicas para a pesquisa de enzimas termoestáveis específicas, assim, a busca por novas fontes microbianas é um exercício contínuo (KUMAR e TAKAGI, 1999).

2.4. Fermentação em estado sólido (FES)

Fermentação em estado sólido, também chamada de fermentação semissólida, ou fermentação em meio semissólido, é o nome dado ao processo de crescimento de microrganismos em substratos sólidos. A água existente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003; RAGHAVARAO et al., 2003). Nessa fermentação, o substrato sólido além de servir como suporte inerte para o crescimento dos microrganismos, é também uma fonte de nutrientes. Além do que, simula as condições ambientais em que muitos fungos filamentosos vivem. Assim sendo se trata de uma forma muito útil como método de cultivo, já que permite a penetração das hifas nos poros entre as partículas de substratos, auxiliando as trocas gasosas entre as células, para manutenção metabólica (Figura 7) (HOLKER e LENZ, 2005).

Figura 7. Representação de alguns dos microprocessos que ocorrem durante a FES.



Fonte: HOLKER e LENZ, (2005).

As hifas, após esporular, formam hifas aéreas ou então penetram no substrato. Os espaços que surgem entre elas são preenchidos por gás, quando aéreas ou por líquido, quando as mesmas estão inseridas no substrato. O metabolismo se concentra próximo à superfície e entre os poros, mas também ocorre na parte aérea (hifas aéreas). As enzimas hidrolíticas representadas na figura pela cor azul são produzidas pelo micélio, após difundirem-se para a matriz sólida, catalisam a degradação de macromoléculas (verde). Gás carbônico, água, calor e outros produtos são produzidos quando do consumo de oxigênio. Com isso, diferentes concentrações de gradiente são formadas, o que por sua vez forçará o O_2 a se difundir para a fase gasosa em regiões mais profundas (lilás). Um problema observado durante a FES é a liberação de calor metabólico que eleva a temperatura (T); a solução se dá por meio de condução e evaporação (azul escuro). O sistema de equilíbrio de H_2O inclui a que passa lentamente pelo micélio, a consumida durante as reações de hidrólise e a que é produzida durante a respiração. Outro importante fator é o pH local, que pode ser mudado devido a liberação de ácidos carbônicos e troca de amônia (cinza) (HÖLKER; LENZ, 2005).

A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida na superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30-85% (RAIMBAULT, 1998) e devem ser mantidos ao longo do processo de FES. Uma condição ótima deve ser estabelecida, pois baixos níveis de umidade reduzem a difusão de nutrientes, crescimento microbiano, estabilidade enzimática

e a absorção do substrato, o que prejudicaria o processo (KRISHNA, 2005). Tipicamente a atividade de água livre vai de 0,40-0,90, o que reproduz as condições encontradas na natureza e permite que os procedimentos sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação, pelo menos por bactérias, é pouco provável com valores tão baixos (ROBINSON e NIGAM, 2003).

Várias são as funções atribuídas à água num bioprocesso. No que se refere ao cultivo de fungos filamentosos, sua limitação pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, ocasionando um desequilíbrio nas vias, e afetando os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como também podem reduzir as taxas de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimação celular (RAIMBAULT, 1998; GERVAIS e MOLIN, 2003).

Cada microrganismo possui um valor ótimo de pH. Os fungos filamentosos geralmente crescem em uma faixa de pH que vai de 2,0 a 9,0, sendo o ótimo entre 3,8 e 6,0. A fonte de nitrogênio pode também causar alterações do pH, por isso é de extrema importância levar em consideração os efeitos que os diversos componentes utilizados na fermentação, podem causar no processo (KRISHNA, 2005).

Diferentes tipos de microrganismos podem crescer em substratos sólidos, incluindo bactérias, fungos e leveduras (AIDOO et al., 1982). Porém, os mais aptos são os fungos filamentosos pelo fato de serem capazes de crescer com pouca água e muitos sólidos presentes, além de apresentarem forma de crescimento em hifas, favorecendo a colonização (DURAND, 2003).

Os substratos tipicamente utilizados na FES são de origem agroindustrial. Grãos de arroz, raízes de mandioca, farelo de soja, farelo de arroz, farelo de trigo, fubá, casca/palha de arroz, casca de trigo, palha de milho entre outros, podem ser utilizados com substratos (MITCHELL et al., 2006). Destacam-se as aplicações que utilizam resíduos sólidos que apresentam um baixo custo e são potencialmente poluidores (PANDEY, 2003).

Alguns fatores confirmam o uso desses resíduos nas fermentações: a utilização dos mesmos pode reduzir o custo de produção e colaborar para solucionar os problemas ambientais relacionados, além da possibilidade de agregar valor a esses subprodutos do setor agroindustrial.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase, visando aplicação dessas enzimas na sacarificação de materiais lignocelulósicos para obtenção de açúcares fermentescíveis a etanol.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar e selecionar fungos filamentosos termofílicos a partir de diversos tipos de amostras do ambiente;
- Avaliar a melhor temperatura de crescimento das cepas isoladas;
- Avaliar a produção de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase pelos fungos através de fermentação em estado sólido (FES), utilizando uma mistura de matérias lignocelulósicos;
- Avaliar os efeitos das condições de reação como temperatura e pH, sobre a atividade e estabilidade das enzimas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Meio de cultivo

4.1.1. Meio nutriente líquido para as coletas de amostras

Para a coleta dos fungos filamentosos foi utilizado o meio nutriente composto por (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4); KH_2PO_4 (2,0); CaCl_2 (0,3); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); peptona (5,0); extrato de levedura (2,0); ureia (0,3); Tween 80 (1,0); solução de sais a 0,1%. Sendo a solução de sais composta por (mg/mL): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,6); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4); CoCl_2 (2,0).

4.1.2. Meio nutriente sólido para isolamento, repique e manutenção das colônias

Para isolamento, repiques periódicos e conservação das culturas puras, foi utilizado o meio nutriente Sabouraud. As culturas puras foram mantidas em criotubos, sob solução de glicerol a 20%, em freezer a -80°C.

4.1.3. Meio de cultivo para as fermentações em estado sólido (FES)

Os fungos foram cultivados em 5,0g de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e palha de milho (1:1:1 p/p). A esta mistura foram adicionados 20 mL de solução nutriente (proporcionando uma umidade inicial de cerca de 70%) composta por (g/L): (NH)₄SO₄ (3,5); KH₂PO₄ (3,0); MgSO₄ · 7H₂O (0,5); CaCl₂ (0,5), Tween 80 (10,0), sendo o pH ajustado para 5,0. Os substratos foram lavados e secos a 65 °C. O bagaço de cana *in natura* foi triturado e peneirado, sendo utilizadas partículas de 1 a 3 mm.

4.2. Isolamento dos fungos filamentosos

Como descrito por Da Silva (1992), os fungos filamentosos foram coletados retirando-se amostras de material vegetal, de insetos e de compostagens. Aproximadamente 0,5g de amostra foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 20 mL de meio nutriente (item 4.1.1), sendo vedados com rolha de algodão e levados ao laboratório onde foram mantidos em estufa a 45 e a 55°C, sob agitação de 100 rpm, por 24-48 horas. Após este período, 0,1 mL deste pré-cultivo foi assepticamente transferido para o centro de uma placa de Petri contendo o meio nutriente Agar Sabouraud. O material foi espalhado com o auxílio de alça de Drigalski e a placa foi incubada a 45 e 55°C, até o aparecimento das colônias. As colônias de fungos filamentosos isoladas foram diferenciadas com base no aspecto do anverso e reverso do micélio e cor dos esporos (quando presentes), e reinoculadas através de estrias de esgotamento, em meio de isolamento, até a obtenção de culturas puras, as quais foram estocadas.

4.3. Avaliação do efeito da temperatura de incubação sobre o crescimento da colônia em meio sólido

A fim de se avaliar a temperatura ótima de crescimento, os isolados foram pré-cultivados a 45 e 55°C em ágar Sabouraud, por 72h, e então inoculados no centro de uma placa de Petri contendo o mesmo meio. Como inóculo foi utilizado um disco de cultura miceliada de 8,0 mm de diâmetro, colocado no centro da placa. As placas foram incubadas em temperaturas de 37, 45, 55 e 60°C, e o diâmetro das colônias foi medido a cada 12 horas.

4.4. Pré-inóculos para as fermentações em estado sólido

Para cada cultivo por FES foi feito um pré-inóculo, em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio nutriente sólido inclinado (Sabouraud). O fungo foi inoculado na superfície deste meio, por estrias, e incubado a 45 e 55°C até completo crescimento (micelial ou esporulação). Após este período, o microrganismo foi suspenso, com auxílio de alça de inoculação, em 150 mL de solução nutriente estéril (item 3.1.3). No caso de fungos não esporulados, 20 mL desta suspensão foram utilizados como inóculo para cada recipiente de fermentação contendo 5,0 g de substrato. Os fungos esporulados tiveram o número de esporos por mL determinados por contagem em câmara de Neubauer e suspensões desses esporos foram usadas para inocular os substratos em proporções de 10^6 esporos/g. A hidratação do substrato foi feita complementando-se a suspensão de esporos para 20 mL com solução nutriente estéril.

4.5. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido

As FES foram conduzidas em embalagens de polipropileno (12 x 20 cm), utilizando-se 5g de substrato (item 3.1.3). Nos ensaios preliminares, os cultivos foram conduzidos por 96h, tempo necessário para um completo crescimento micelial e esporulação sobre o substrato (avaliação visual). Nos cultivos para a avaliação da influência do tempo sobre a produção das enzimas, amostras foram tomadas a cada 24h retirando-se uma embalagem de fermentação por amostragem, por até 336h. A cada amostra foram adicionados 100 mL de água destilada, sendo a mistura homogeneizada manualmente e mantida sob agitação em shaker (100 rpm), por 30 minutos. Após este período, o material foi filtrado em disco de tecido nylon,

centrifugado a 10000 xg por 15 min, a 5°C, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

4.6. Determinação das atividades enzimáticas

4.6.1. Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada em mistura de reação contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução de substrato xilana Birchwood (Sigma X0502) (10,0 g/L), em tampão acetato 0,10 M, pH 5,0. A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos e então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir de uma curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.6.2. Atividade em papel de filtro (FPase)

A atividade de FPase foi avaliada em mistura de reação composta por 0,9 mL de tampão acetato 0,1M, pH 5,0, uma fita de papel de filtro Whatman nº1 de 1,0cmx6,0cm e 0,1 mL de solução enzimática. Após uma hora de reação, a 60°C, sob agitação de 150 rpm, a mesma foi paralisada em banho de gelo e a quantidade de açúcares redutores liberados foi dosada pelo método de MILLER (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto de reação, com base em curva padrão de glicose.

4.6.3. Endoglucanase

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de xilanase (item 3.6.1), porém utilizando-se carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (40,0 g/L) como substrato e curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação.

4.6.4. *β-glicosidase*

Para a determinação da atividade de β -glicosidase, 0,05 mL do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 0,25 mL de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 0,25 mL de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (4 mM) – PNPG, Sigma. A reação foi mantida a 60°C, por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (2M). O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de nitrofenol por minuto de reação utilizando reta padrão obtida com solução de nitrofenol em variadas concentrações.

4.6.5. *β-xilosidase*

A atividade de β -xilosidase foi avaliada por procedimento idêntico ao descrito para β -glicosidase, exceto pela substituição do substrato pelo 4-nitrofenol- β -D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma).

4.6.6. *Avicelase*

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consistiu na adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto em 0,9 mL de solução 1% de celulose microcristalina – avicel (tendo sido diluído 1,0 mL em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos). Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Miller (1959). Antes de ser realizada a leitura no espectrofotômetro, a reação foi mantida em repouso pelo tempo de 20 minutos para que pudesse ocorrer a precipitação do substrato, impedindo que a turbidez do mesmo interferisse na leitura.

4.6.7. *Celobiose desidrogenase*

A atividade da celobiose desidrogenase (CDH), foi determinada pelo método descrito por FLITSCH et al., (2013). A reação foi conduzida em cubeta de 1,0 mL contendo 750 µL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0, 50 µL de solução enzimática, 100 µL de lactose 300 mM e 100 µL de 2, 6-diclorofenolindofenol (DCPIP) 3 mM. A redução de DCPIP foi monitorada durante 10 minutos em 520 nm ($\epsilon^{520\text{nm}} = 6.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1,0 µmol do substrato consumido por minuto.

4.7. Caracterização das enzimas

4.7.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas

Para a determinação do pH ótimo, as atividades enzimáticas de FPase, xilanase e CMCase, foram avaliadas incubando-se 0,1 mL das soluções enzimáticas brutas em 0,9 mL de suspensão de xilana 1% ou CMC 4% em diferentes valores de pH, a 60°C por 10 minutos. Os seguintes tampões (0,1 M) foram utilizados: citrato de sódio (pH 3,0), acetato de sódio (3,5-5,5), MES (pH 6,0-6,5), HEPES (pH 7,0-7,5), glicina-NaOH (pH 8,0-9,5) e CAPS (pH 10,0-10,5). O efeito do pH sobre a atividade de β -glicosidase foi determinado da mesma forma, entretanto, foram incubados 0,05 mL da solução enzimática bruta em 0,25 mL do substrato p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (4mM) – PNPG, Sigma. Cabe aqui observar que o pH dos tampões foi ajustado para corrigir o efeito de deslocamento do pKa em função da temperatura, seguindo valores tabelados (APPLICHEM, 2008).

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizado nas mesmas condições usadas para a determinação da atividade em diferentes pHs, variando-se a temperatura entre 35-95°C. Os ensaios de atividade foram realizados no pH ótimo verificado para cada enzima.

4.7.2. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas

Para determinar a estabilidade das enzimas, um volume final de um mL (extrato bruto devidamente diluído em tampão com pH e substrato específico), foi incubado a 25°C durante 24 horas. Após o período de incubação, a atividade enzimática foi mensurada na temperatura e pH ótimos de cada enzima.

A termoestabilidade foi avaliada incubando-se as enzimas, por uma hora, às temperaturas de 35 a 95°C, seguida da determinação da atividade residual (item 4.6), de acordo com as condições ótimas de pH e temperatura.

5. Resultados e discussão

5.1. Isolamento dos fungos

De um total de nove coletas de resíduos orgânicos e materiais depositados no ambiente, foram isolados 32 fungos filamentosos (Tabela 1). As coletas consistiram de materiais como compostagem, amostras de solo, favo de mel, fezes de animais, bagaço de cana, casca de árvore, restos de ração animal, gordura animal e animais errantes como formigas e o procedimento para o isolamento dos fungos foi realizado como descrito no item 3.2.

Tabela 1: Isolamento dos fungos a partir de diferentes tipos de amostras.

Isolado	Data e local de coleta	Material Coletado
FM	20/05/2012 Chácara Jataí, Adolfo-SP	Fragmento de favo de mel abandonado
FZII	04/06/2012 Sítio Sta. Isabel, Adolfo-SP	Dejetos de animal
SER	Idem anterior	Látex de seringueira
SAC	Idem anterior	Casca de árvore
BUFO	Idem anterior	Pedaço de micélio
CH1	04/06/2012 Chácara Jataí, Adolfo-SP	Dejetos de lixo
CH2	Idem anterior	Idem anterior
SAB	Idem anterior	Casca de árvore
CHFI	17/06/2012 Haras Sandoval, Adolfo-SP	Restos de ração animal
CHFII	Idem anterior	Dejetos orgânicos
S2	01/07/2012 Chácara Jataí, Adolfo-SP	Amostra de solo
S5	Idem anterior	Idem anterior
S6	Idem anterior	Idem anterior
GA	Idem anterior	Gordura animal em resto de alimento
ASII	Idem anterior	Idem anterior
FMGI	15/07/2012 Chácara São Francisco, Adolfo-SP	Animais errantes (formigas)

Isolado	Data e local de coleta	Material Coletado
FMGII	Idem anterior	Idem anterior
FMGIII	Idem anterior	Idem anterior
BC	Idem anterior	Bagaço de cana como resto de ração animal
COQ	Idem anterior	Casca de árvore
S1	Idem anterior	Amostra de solo
AI1	15/07/2012	Casca de árvore
	UNESP-Ibilce, S.J.Rio Preto-SP	
FMG IV	29/07/2012	Animais errantes (formigas)
	Sítio Sta. Isabel, Adolfo-SP	
FMG V	Idem anterior	Idem anterior
FMG VI	Idem anterior	Idem anterior
FZI	Idem anterior	Dejetos de animais
S7	27/08/2012	Amostra de solo
	Chácara Jataí, Adolfo-SP	
S8	Idem anterior	Idem anterior
S10	Idem anterior	Idem anterior
CO	20/09/2012	Compostagem
	Constroeste, S.J.Rio Preto-SP	

O número de isolados foi pequeno considerando a fase de biodegradação das amostras coletadas, indicando que a frequência desses espécimes foi relativamente baixa nos materiais. Muito se tem discutido acerca da eficiência das metodologias de isolamento no conhecimento de microbiota de um determinado nicho, sendo indicados, por técnicas independentes de cultivo, números consideravelmente maiores de espécimes do que aqueles detectados pelos métodos usuais de cultivos. Entretanto, poucos trabalhos aparecem na literatura sobre estudos de biodiversidade envolvendo fungos termofílicos talvez pela escassez de identificação de novas espécies e catalogação de genes específicos nos bancos genômicos disponíveis e nesse contexto, o isolamento de novas espécies é fundamental para a ampliação do conhecimento desse grupo.

Os fungos termofílicos são microrganismos capazes de crescer em temperaturas entre 20 e 50°C (MAHESHWARI et al., 2000). De acordo com Gomes et al., (2007), entre os representantes de Eucariotos poucas espécies descritas crescem entre 45 e 55°C, sendo classificadas como termofílicas moderadas. Dentre as 50.000 espécies de fungos descritas, somente cerca de 30 apresentam crescimento em temperaturas entre 40 e 45°C, embora existam algumas espécies com capacidade de crescer entre 60 e 62°C, apresentando seu ótimo em torno de 50°C (SALAR e ANEJA, 2007; SONCINI JÚNIOR et al., 2007; MORGENSTERN, 2012). Os fungos filamentosos são representantes da microbiota com grande habilidade de se desenvolver em material vegetal, como resíduos agrícolas e silvícolas,

grãos armazenados, madeira exercendo na natureza o papel de principais cicladores de carbono (MAHESHWARI et al., 2000).

5.2. Avaliação quantitativa inicial da produção das enzimas pelos fungos isolados

Os 32 isolados foram cultivados, por fermentação em estado sólido (FES), tendo como substratos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e palha de milho (1:1:1 p/p) por 96 horas, a fim de se realizar uma triagem inicial com o intuito de se observar os melhores produtores das enzimas e verificar se os selecionados pelos testes de temperatura previamente realizados, apresentavam potencial para uma boa produção enzimática.

De acordo com Bakri e colaboradores (2003) e Babu e Satyanarayana (1995), o farelo de trigo é composto aproximadamente por 7,5 % de celulose, 31,2 % de hemicelulose e 4,0 % de lignina. O baixo teor de lignina torna este resíduo menos recalcitrante do que o bagaço de cana-de-açúcar e, provavelmente, é o substrato preferencialmente utilizado pelos fungos nos tempos iniciais de crescimento. Além disso, seu grau de porosidade possibilita a transferência de oxigênio e proporciona uma grande área de superfície. O farelo de trigo constitui uma boa fonte de carbono e nitrogênio e tem sido usado para produção de celulasas e hemicelulasas (BRIJWANI et al., 2010; LEITE et al., 2008).

O uso do bagaço de cana-de-açúcar favorece a aeração e troca de calor do meio, por formar rede fibrosa que reduz a compactação do substrato contendo farelo de trigo. Além disso, o bagaço por conter celulose (50%), hemicelulose (25%), lignina (25%) e de cinzas (2,4%) atuam como fonte de compostos indutores da expressão das enzimas (PANDEY et al., 2000).

A palha e o sabugo de milho, considerados resíduos agrícolas são um material abundante, porém pouco aproveitado de forma a gerar renda (PAES et al., 2010). O destino principal destes resíduos é a ração animal (ZIGLIO et al., 2007). Considerando ser a palha uma fibra natural do tipo lignocelulósica, temos em sua composição química: lignina total (14%), celulose (41%), cinzas (1,5%), hemicelulose (57,5%) (SALAZAR et al., 2005; PAES et al., 2010).

Os dados de atividades enzimática obtidos do meio de cultivos dos fungos isolados são apresentados na Tabela 2.

As maiores produções de endoglucanases (CMCase) foram obtidas pelo cultivo dos fungos S10 (97,7 U/g) e COQ (92,0 U/g). Para os demais selecionados, a produção de

endoglucanase não foi significativa, entretanto, por não se conhecer a identidade dos fungos e as condições de cultivo mais adequadas para essa produção de enzimas pode-se ter subestimado o potencial de secreção das mesmas. Na literatura é relatada produção de 99,3 U/g pelo fungo *Aspergillus niger* em FES usando com substrato farelo de trigo e palha de trigo (JECU, 2000).

A maior produção de avicelase foi obtida pelo cultivo do isolado S10 (2,4 U/g ou 0,14 U/mL). Macris e Galiotou-Panayotou (1985) obtiveram uma produção de 0,1 U/mL e 0,27 U/mL com as cepas *Aspergillus ustus* W7 e *A. ustus* M22, respectivamente.

Entre os cinco pré-selecionados, a atividade de β -glicosidase foi mais significativa nos meios de cultivo das cepas S10 (17,3 U/g ou 0,9 U/mL) e BC (16 U/g ou 1,0 U/mL). Esses resultados se mostram satisfatórios quando comparados com os dados da literatura, quando a produção de 21,7 e 13,6 U/g, pelo cultivo de *A. niger* e *T. reesei* respectivamente considerada muito boa por Dhillon et al., (2011). Macris e Galiotou-Panayotou (1985), também obtiveram produção de β -glicosidase similar com 0,8 U/mL em cultivo de *T. harzianum* M5 e *T. harzianum* M19.

Tabela 2. Produção de celulases e xilanases pelos isolados, em 336 horas de fermentação.

Atividade enzimática (U/g de substrato seco)*

Isolados	Endoglucanase	Avicelase	β -glicosidase	FPase	Xilanase	β -xilosidase
A1I	2,94	2,4	6,4	9,4	581,7	0,05
S3	2,7	1,5	6,8	9,5	519,3	0,3
S10	97,7	2,4	17,3	6,3	101,8	4,8
COQ	92,0	2,1	11,6	8,1	78,5	3,8
FMG III	3,2	2,0	46,8	10,1	483,2	0,3
FMG V	3,2	1,2	5,9	9,6	374,0	0,1
S1	3,0	2,1	6,5	8,9	462,1	0,4
CO	3,2	1,7	7,2	9,8	567,1	0,4
FMG IV	2,9	2,0	4,7	8,3	334,8	0,3
BC	13,6	2,5	16,1	7,3	166,0	1,9
S5	3,1	1,6	12,0	12,3	528,0	ND
S7	2,7	0,9	7,4	12,2	488,0	ND
S8	2,6	1,4	6,3	9,9	179,7	ND
FMG I	2,9	1,1	9,5	11,5	367,3	ND
FMG II	2,4	1,3	13,6	12,4	613,5	0,1
FMG VI	47,5	2,2	9,2	11,1	119,8	3,5
FZI	2,8	1,7	7,3	12,1	472,4	ND
CH1	4,0	1,7	1,5	4,2	16,4	ND

Isolados	Endoglucanase	Avicelase	β -glicosidase	FPase	Xilanase	β -xilosidase
FM	1,2	1,7	3,2	1,7	0,7	ND
CHFI	1,1	1,8	2,5	1,4	0,9	ND
CH2	4,2	1,7	6,2	3,4	14,9	ND
SAB	1,3	1,3	ND	1,5	0,9	ND
SER	1,3	2,4	ND	2,1	0,9	ND
FZII	7,4	2,4	6,8	4,4	13,7	ND
FMG VII	3,5	1,0	6,0	7,3	536,2	ND
CHF II	10,3	2,7	10,8	6,2	19,1	1,5
BUFO	1,5	1,0	1,8	2,8	7,8	1,4
S2	2,6	1,6	5,1	3,4	6,3	1,0
S4	2,4	2,3	7,4	6,3	361,4	1,1
S6	5,3	1,7	12,4	2,9	6,7	2,3

* Em todo o texto, U/g refere-se à unidade de atividade enzimática por grama de substrato seco.

Conforme dados da Tabela 2, os melhores resultados de produção de FPase entre os fungos selecionados, estão para o S3 (9,5 U/g) e FZI (12 U/g). De acordo com Badhan e colaboradores (2007), o fungo *Myceliophthora sp.* cultivado em palha de arroz resultou em 2,4 U/g da enzima, quando cultivado em bagaço de cana o resultado produziu 0,7 U/g e em palha de milho, 0,31 U/g.

A produção de xilanase foi maior para o fungo S3 (519,3 U/g) e FZI (472,4 U/g). Ang e colaboradores (2013) mostraram em seu trabalho com o fungo *Aspergillus fumigatus*, uma produção de 418,7 U/g de enzima. Tuohy e colaboradores (1989) conseguiram uma produção de 1.435 U/g cultivando o fungo *Thermoascus auranticus* por FES em farelo de trigo, após 120h.

A atividade da celobiose desidrogenase tem sido relatada como tendo interferência na degradação de xilana e celulose (SADDLER et al., 1997). A maior parte dos antigos trabalhos sobre a CDH reportou um provável papel dela sobre a lignina, no entanto o fato de essa enzima conter um domínio ligado à celulose, produzido durante o metabolismo primário tendo a própria celulose como substrato, demonstra a capacidade da enzima em degradar tanto celulose nativa quanto a celulose e derivados da xilana, sugerindo que a mesma estaria mais relacionada com as celulasas que com as ligninases enquanto na função de desidrogenase (RENGANATHAN et al., 1990; MORPETH, 1987).

É conhecido que a celobionolactona, que é gerada pela oxidação da celobiose pela CDH, pode atuar como um indutor de enzimas celulolíticas (CMC e avicelase), enquanto inibe as β -glicosidases, visto que compete pelo substrato com essa enzima, limitando a quantidade real de degradação que ocorreria naturalmente (SADDLER et al., 1997).

Considerando que a atividade da CDH reduz a atividade das β -glicosidases pela competição por celobiose no meio, os dados da Tabela 3 corroboram essa afirmação, visto que as maiores atividades de CDH coincidem com as menores de β -glicosidase. O fungo SAB (11,2 U/mL) e o FM (11,3 U/mL), por exemplo, tiveram baixíssimas produções da β -glicosidase (0,02 U/g e 3,2 U/g ou 0 e 0,15 U/mL, respectivamente). É provável que a glicose oxidase ou outras oxidases mostrem atividade nesse ensaio, justamente por também serem oxidases, pois desse modo reduziriam quinonas e o DCIP (substrato), fazendo com que resultasse em uma falsa atividade de CDH, especialmente quando na presença da β -glicosidase (HENRIKSSON et al., 2000).

De acordo com Nagalla e colaboradores (1999), Shou et al., (1998) e Temp e Eggert (1999), a temperatura ótima de atuação da CDH é de aproximadamente 60°C. Assim, fica confirmada essa característica de boa adequação à termofilia da enzima, já que o que se espera dos fungos selecionados para as demais fases do trabalho, é um melhor crescimento acima de 50°C.

Tabela 3. Produção de celobiose desidrogenase pelos isolados, na triagem inicial (336 horas de fermentação).

Celobiose Desidrogenase*					
Fungo	U/mL	Fungo	U/mL	Fungo	U/mL
ASI	13,1	S6	6,7	FMGV	2,1
ASII	13,4	SAB	11,2	FMGVI	2,2
CHFI	11,5	SER	10,6	FMGVII	2,1
CHFII	5,5	AI1	2,5	FZI	2,4
CHI	2,3	BC	7,9	S1	2,6
CHII	2,2	CO	2,5	S3	2,7
FM	11,3	COQ	1,9	S5	2,6
FZII	1,6	FMGI	2,5	S7	2,3
GA	4,8	FMGII	2,5	S8	1,8
S2	10,7	FMGIII	2,5	S10	2,1
S4	13,4	FMGIV	2,3	BUFO	1,8

*Unidade por mL de extrato bruto.

5.3. Avaliação do efeito da temperatura sobre o crescimento em meio sólido das cepas isoladas.

A temperatura é um dos principais fatores ambientais que influenciam o crescimento dos micro-organismos (AKINYELE e ADETUTY, 2005). Maheshwari et al., (2000) classificam os fungos termofílicos como aqueles capazes de crescer em temperaturas entre 20 e 50°C. Gomes et al., (2007) cita 60-62°C como temperaturas máximas de crescimento para alguns desses fungos.

Uma vez que na natureza os fungos comumente desenvolvem-se em substratos sólidos, um método adequado para a avaliação do crescimento de fungos em placas contendo meio sólido de cultivo é a medida do diâmetro das colônias (SALES-CAMPOS e ANDRADE, 2010). Portanto, a fim de se verificar a influência da temperatura no crescimento dos isolados pré-selecionados, estes foram cultivados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud incubadas a 37, 45, 55 e 60°C (item 3.3) e os diâmetros das colônias foram medidos a cada 12 horas. Esse teste foi feito, visando confirmar a termofilia/termotolerância das cepas.

Entre os fungos isolados a 45°C, nenhum mostrou crescimento a 60°C e poucos apresentaram crescimento micelial expressivo a 55°C sendo os crescimentos máximos entre 37 e 45°C (Figura 8). Esse perfil é compatível com cepas termotolerantes. Na figura 9, é possível observar o comportamento de uma das cepas isoladas na temperatura de 45°C, que no caso, mostrou crescimento razoável a 55°C.

Figura 8. Distribuição dos isolados a 45 e a 55°C de acordo com a temperatura na qual apresentaram melhor crescimento: melhor crescimento a 37°C, melhor crescimento a 45°C, melhor crescimento a 55°C e melhor crescimento a 60°C.

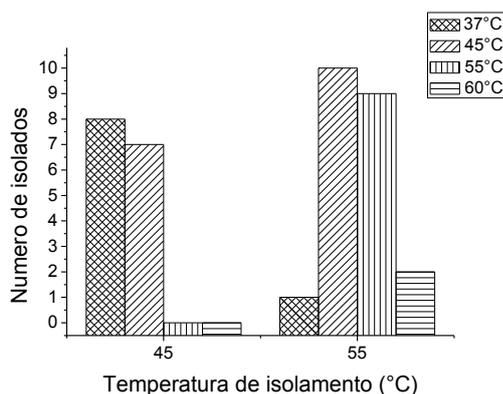
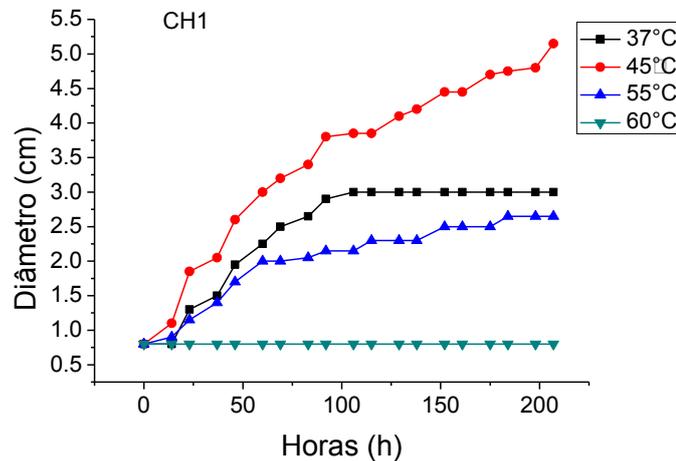


Figura 9: Perfil de crescimento do fungo CH1, isolado a 45°C, em diferentes temperaturas.

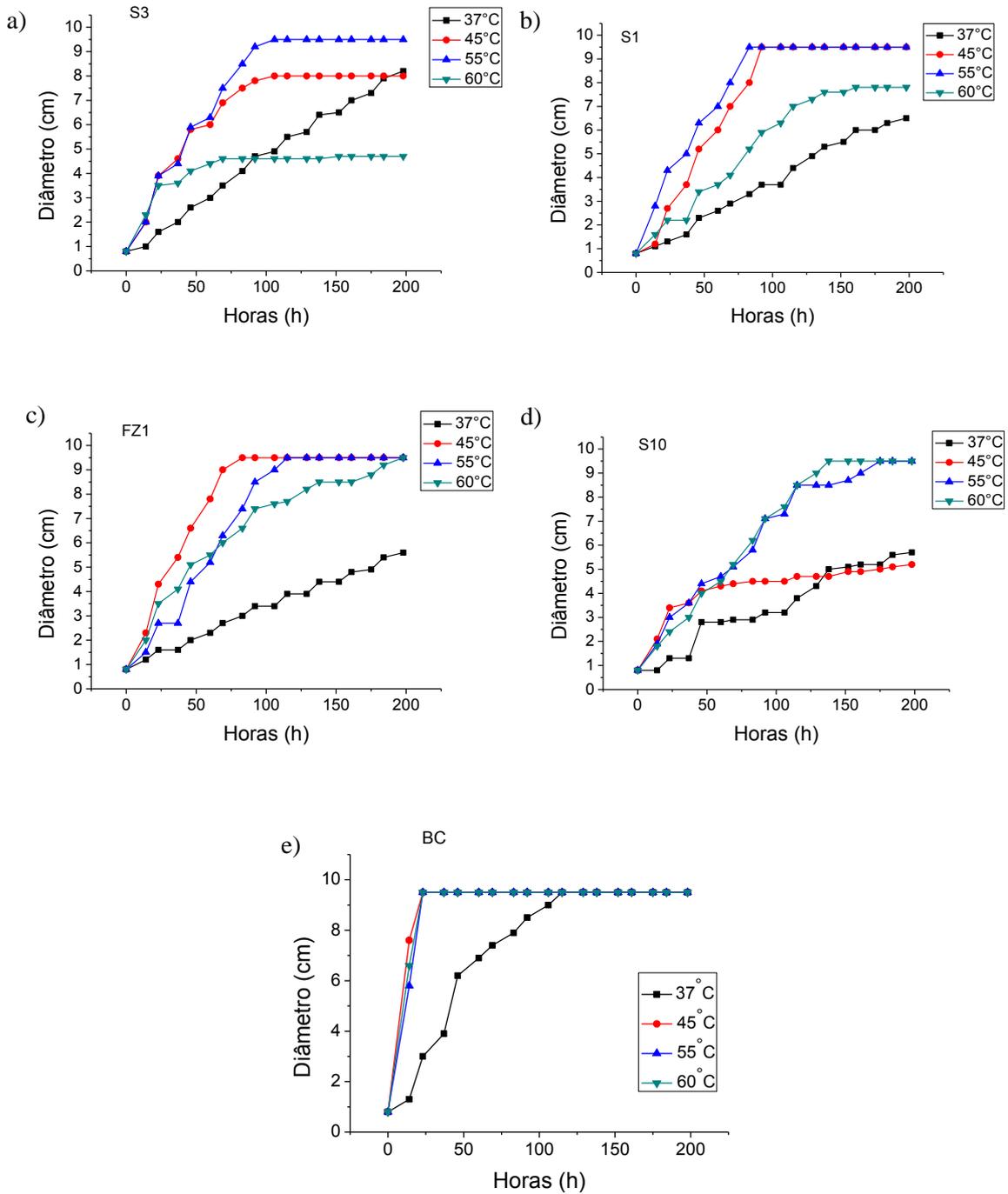


Todos os isolados a 55°C apresentaram crescimento entre 37 e 60°C (Figura 8). Uma vez que os menores índices de crescimento foram observados a 37°C, pode-se concluir que a temperatura de isolamento de 55°C foi mais eficiente e seletiva para fungos termofílicos (Figura 10).

Os fungos S1, S3 e FZI (isolados a 55°C), apresentaram crescimento mais rápido nas temperaturas de 55 e 45°C e a 60°C no caso do FZI. O crescimento mais lento a 37°C foi observado para as cepas S10 e BC. Esses fungos podem ser considerados termofílicos verdadeiros sendo por isso, escolhidos para a continuidade dos ensaios, uma vez que os termofílicos verdadeiros eram o foco do presente trabalho.

Foi realizada a identificação desses espécimes sendo determinado que as cepas S1, S3 e FZI tratam-se de *Thermomyces lanuginosus*, e as cepas BC e S10, são da espécie *Rasamsonia emersonii*.

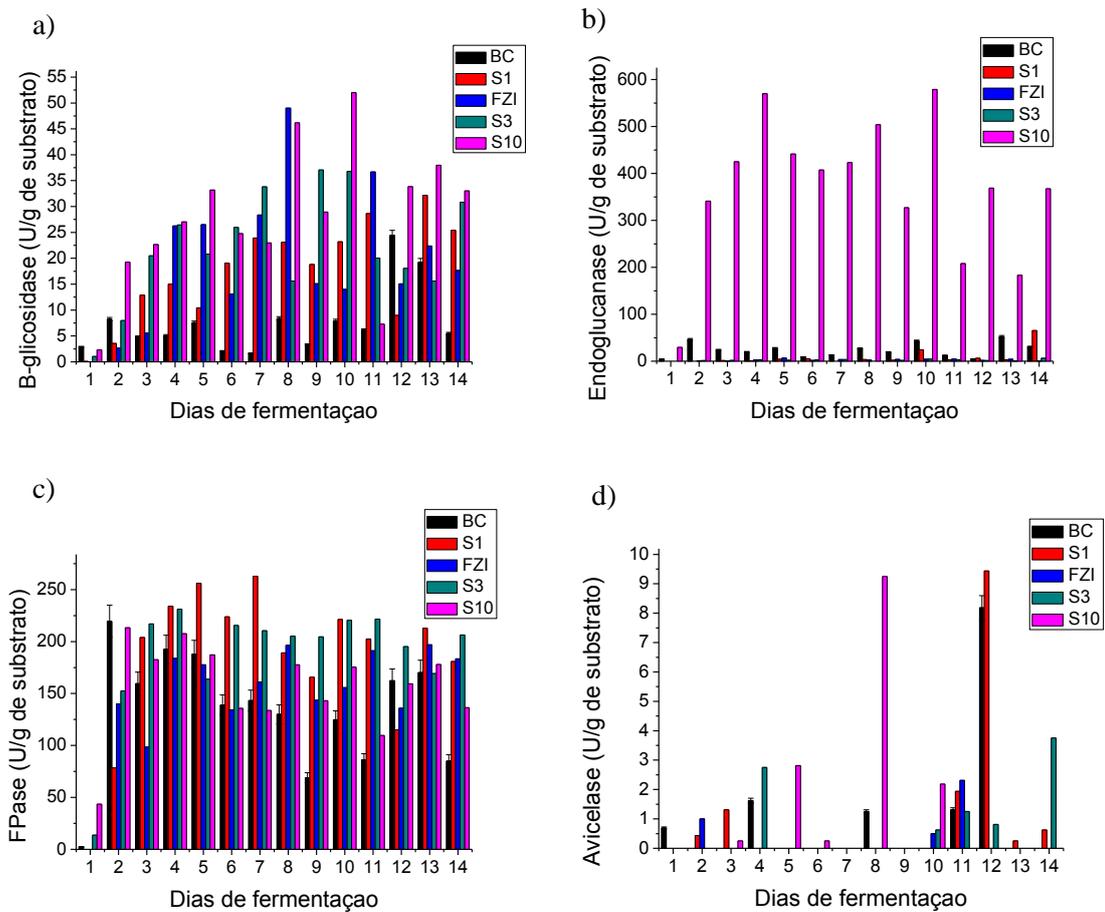
Figura 10: Perfis de crescimento, nas quatro diferentes temperaturas propostas, dos fungos *T. lanuginosus* S3 (a), *T. lanuginosus* S1 (b), *T. lanuginosus* FZI (c), *R. emersonii* S10 (d) e *R. emersonii* BC (e), isolados a 55°C.



5.4. Avaliação da influência do tempo de fermentação na produção das enzimas pelos isolados pré-selecionados.

Com base na temperatura de crescimento e no interesse em estudar linhagens tipicamente termofílicas, cinco fungos foram selecionados para esta etapa do trabalho e cultivados por FES, durante um período de 14 dias (336 horas). A cada 24 horas foi feita a retirada de um recipiente de fermentação, conforme descrito no item 3.5. Os resultados das atividades enzimáticas obtidos nessas fermentações são apresentados na Figura 11.

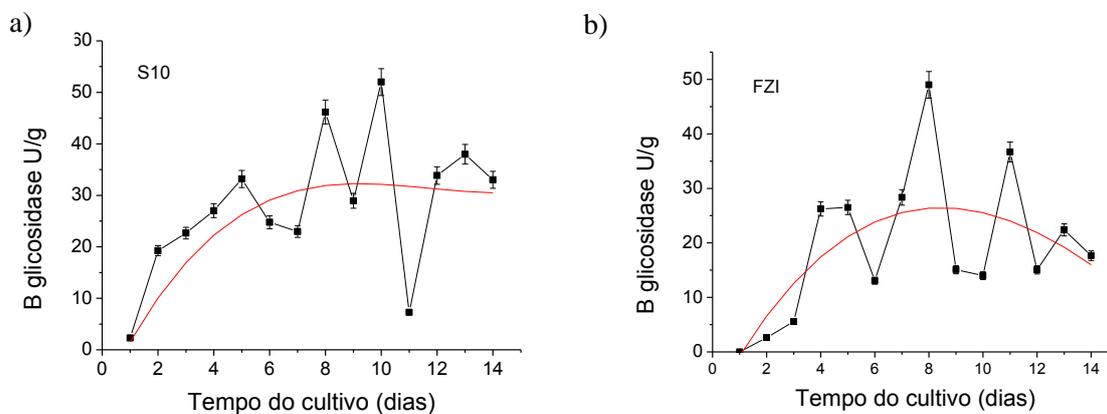
Figura 11. Produção de celulases pelos isolados pré-selecionados: a) β -glicosidase; b) Endoglucanase; c) FPase; d) Avicelase. Perfil de fermentação ao longo de período de 14 dias, usando como substrato mistura de bagaço de cana, farelo de trigo e palha de milho, na proporção de 1:1:1 (p/p). Atividades enzimáticas a 60°C.



A partir desses experimentos, foram selecionados os dois fungos melhores produtores de cada enzima e novos ensaios foram conduzidos.

Os isolados *T.lanuginosus* FZI e *R. emersonii* S10, selecionados por apresentarem as maiores produções de β -glicosidase, nesses novos cultivos apresentaram pico de produção em 192h (49,1 U/g) e 240h (52 U/g) respectivamente (Figura 12).

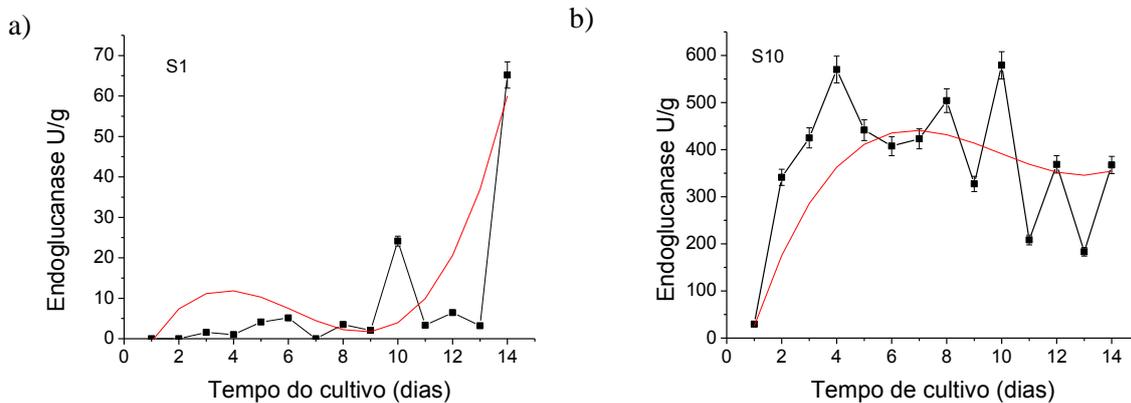
Figura 12. Perfil de produção de β -glicosidase pelos fungos *T.lanuginosus* FZI e *R. emersonii* S10, por FES em meio de mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.



Leite et al., (2008), obtiveram com *Thermoascus aurantiacus* produções semelhantes a essa apresentada (58 U/g), após 96h de cultivo em farelo de trigo. Essa mesma espécie, estudada por Monte e colaboradores (2010) produziu 29,9 U/g em bagaço de cana. Bamsal e colaboradores (2012), em fermentação em meio de farelo de trigo com o fungo *A. niger* NS-2, obtiveram 32 U/g enquanto ANG et al., 2013 obtiveram 4,5 U/g com *A. fumigatus* SK1.

A produção de endoglucanases foi estudada para as linhagens *T. lanuginosus* S1 e *R. emersonii* S10, que mostraram, nesses ensaios, picos de atividade da enzima em 336h (65,2 U/g) e 240h (579 U/g), respectivamente.

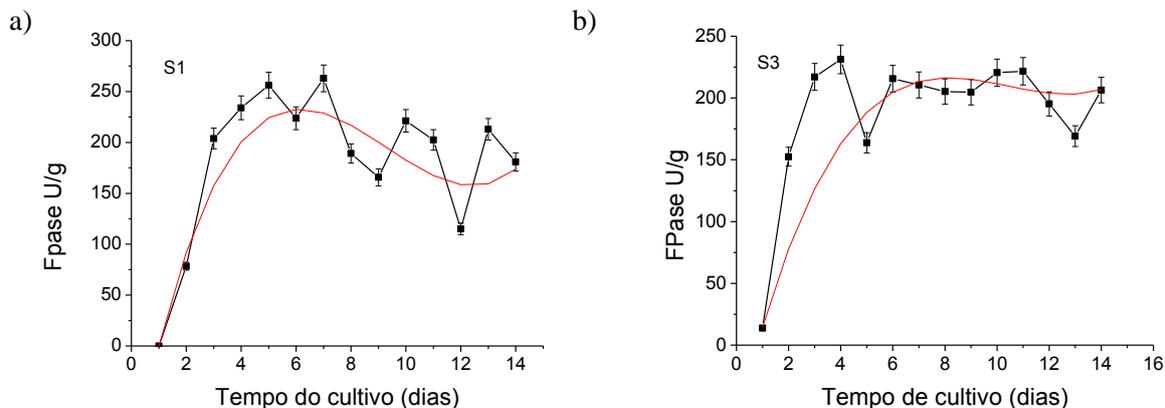
Figura 13. Perfil de produção de endoglucanase pelos fungos *T.lanuginosus* S1 (a) e *R. emersonii* S10 (b), por FES em uma mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.



As atividades de endoglucanase encontrada no cultivo pelo fungo *R. emersonii* S10 (579 U/g) foram maiores do que as relatadas na literatura, enquanto para o fungo *T. lanuginosus* S1, os valores são similares aos reportados por Ang et al., (2013) para *A. fumigatus* (54,3 U/g) e por Monte e colaboradores (2010) para o fungo *T. auranticus* (108,9 U/g). Nishio (2001), após 20 dias de fermentação (480h), obteve atividade de endoglucanase de 214 U/g com o fungo *Neocallimastix frontalis*, Bamsal e colaboradores (2012), realizando uma fermentação em farelo de trigo com o fungo *A. niger* NS-2 a 50°C, obtiveram 310 U/g e SHEN et al., (2011) 526 U/g com *A. fumigatus*.

A FPase foi estudada com os fungos *T. lanuginosus* S1 e *T. lanuginosus* S3 cujos picos de atividade foram em 168h (262,8 U/g) e 96h (231,2 U/g), respectivamente (Figura 14).

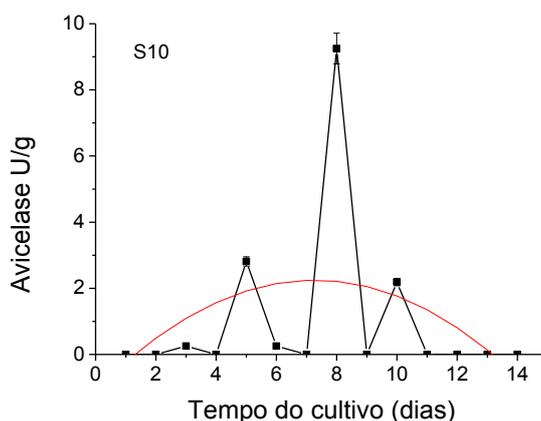
Figura 14. Perfil de produção de FPase pelos fungos *T. lanuginosus* S1 (a) e *T. lanuginosus* S3 (b), por FES em mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.



Em relação à atividade de FPase, os dados encontrados na literatura são muito menores que os valores apresentados nesse trabalho. Badhan (2007), cultivou seu isolado *Myceliophthora sp.* IMI 387099 em palha de arroz e obteve 4,4 U/g. Após período de 264h de cultivo, o isolado *A. fumigatus* apresentou uma atividade enzimática de 3,4 U/g (Ang e colaboradores, 2013). Dhillon e colaboradores (2011), com os microrganismos *A.niger* e *T. reesei*, e usando resíduos de fruta como substrato, reportaram 24,2 U/g de enzima e SHEN et al.(2011) produziram 144,6 U/g de FPases cultivando *A.fumigatus* .

O isolado *R. emersonii* S10, apresentou pico de produção de avicelase em 192h (9,2 U/g) a 60°C. Os demais não apresentaram resultados significativos (Figura 15).

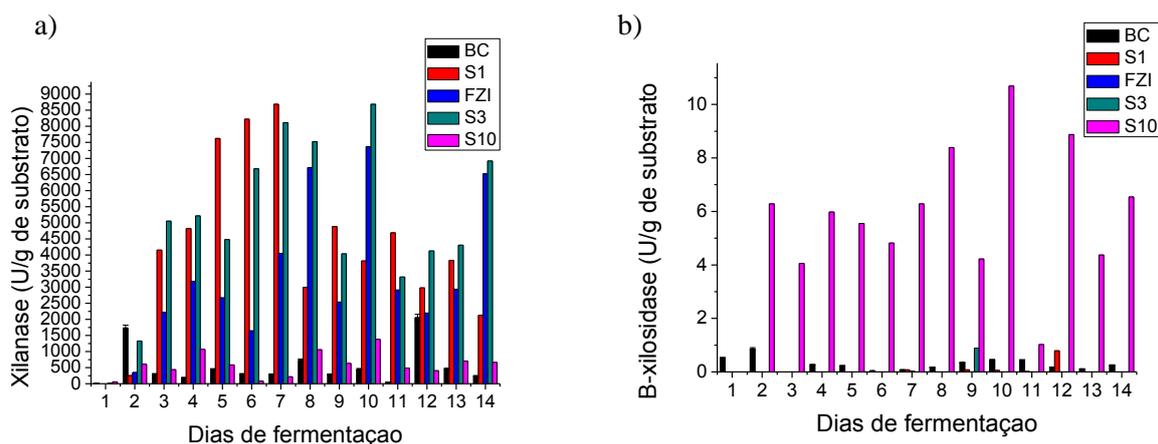
Figura 15. Perfil de produção de avicelase ao longo do tempo pelo fungo *R. emersonii* S10, por FES a partir de uma mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.



Resultados equivalentes ao mostrado acima para a enzima avicelase foram encontrados na literatura. Nishio e colaboradores (2001), em 480h de cultivo e a 50°C com o fungo *N. frontalis* conseguiram uma produção de 8,3 U/g de enzima. Com resultado parecido Chandra e Soundar (2001), com o fungo *Humicola grisea*, alcançaram o valor de 7,4 U/g, também a 50°C.

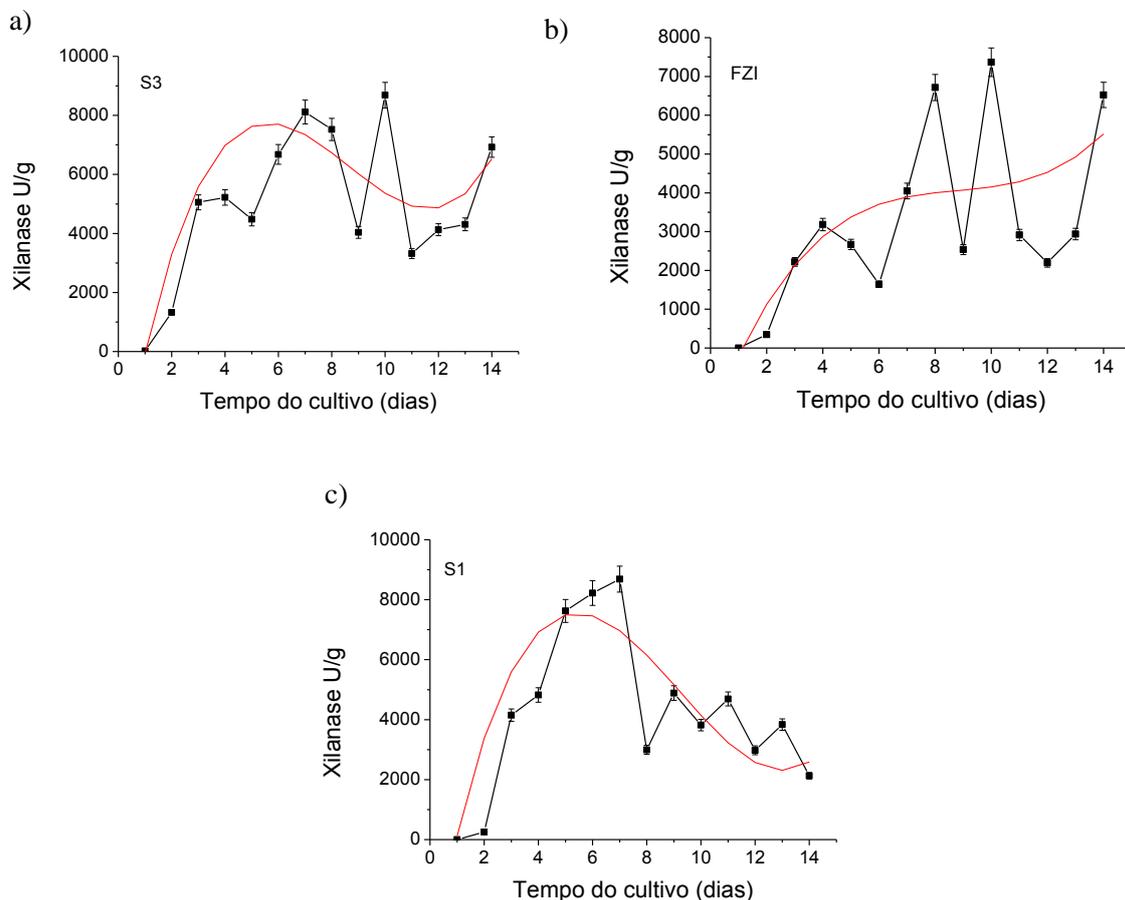
A produção de xilanase e B-xilosidase, em ensaios preliminares com os cinco fungos termofílicos selecionados, é mostrada na figura 16.

Figura 16. Produção de xilanases: Xilanases (a) e β -xilosidase (b) pelos fungos termofílicos isolados selecionados, utilizando como substrato mistura de bagaço de cana, farelo de trigo e palha de milho, na proporção de 1:1:1 (p/p).



As maiores atividades de xilanase foram observadas com os isolados *T. lanuginosus* S1, *T. lanuginosus* FZI e *T. lanuginosus* S3, que apresentaram picos de produção em 168h (8686,7 U/g), 240h (7365,8 U/g) e 240h (8684,8 U/g), respectivamente. Esses fungos foram selecionados para novos ensaios, cujos resultados são apresentados na Figura 17.

Figura 17. Perfil de produção de xilanase ao longo do tempo de cultivo dos fungos *T. lanuginosus* S3 (a), *T. lanuginosus* FZI (b) e *T. lanuginosus* S1 (c), por FES em uma mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.

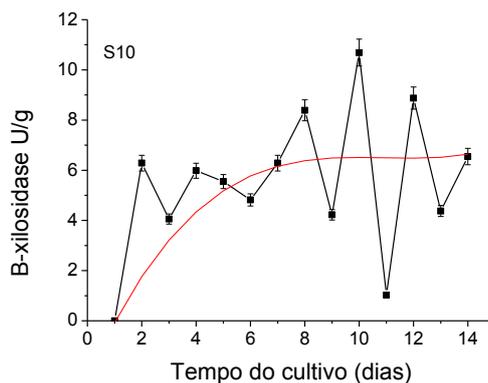


Os valores observados foram ainda maiores, confirmando o alto potencial de produção de xilanases por essas cepas. Na literatura valores de atividade aproximados ao visto pelos fungos acima citados, foram resultantes do trabalho de Fengxia e colaboradores (2008), com o fungo *Aspergillus ficuum* (3182 U/g). Outro caso de produção semelhante foi com o fungo *Thermoascus aurantiacus*, que após 168h e a 50°C, com um máximo de 6193 U/g de enzima (KALOGERIS, et al., 1998). Com uma cultura mista de *A.niger* e *T. reesei*, Dhillon e colaboradores (2011), relatam produção de 3106 U/g de xilanase.

Em relação à atividade da β -xilosidase, o único isolado selecionado que apresentou produção significativa, foi o *R. emersonii* S10 em 240h (10,7 U/g). Os demais apresentaram produção muito baixa ou indetectável (Figura 18). Esse fato era esperado visto que essa

enzima é relatada como sendo associada à parede fúngica, sendo raramente liberada ao meio sem rompimento de hifas (IEMBO et al., 2006).

Figura 18. Perfil de produção de β -xilosidase ao longo do tempo de cultivo do fungo *R. emersonii* S10, por FES em meio composto por mistura de palha de milho, bagaço de cana e farelo de trigo.



Os dados sobre produção de β -xilosidase a partir de FES são muito raros na literatura, sendo mais comum a produção dessa enzima a partir de fermentação submersa. Monte e colaboradores (2010) ao cultivarem o fungo termofílico *T.auranticus* por FES em bagaço de cana, farelo de trigo, palha de cana, e sabugo de milho, obtiveram em 216h e a 50°C: 0,8; 0,4; 2,2 e 25,2 U/g, respectivamente.

A atividade de celobiose desidrogenase foi detectada no meio de cultivo de todas as linhagens, sendo *R. emersonii* BC a que apresentou a maior atividade (Figura 19, tabela 4).

Figura 19. Produção de CDH pelos isolados selecionados. Perfil de fermentação realizado por período de 14 dias, usando como substrato mistura de bagaço de cana, farelo de trigo e palha de milho, na proporção de 1:1:1 (p/p). As atividades enzimáticas foram conduzidas a 60°C.

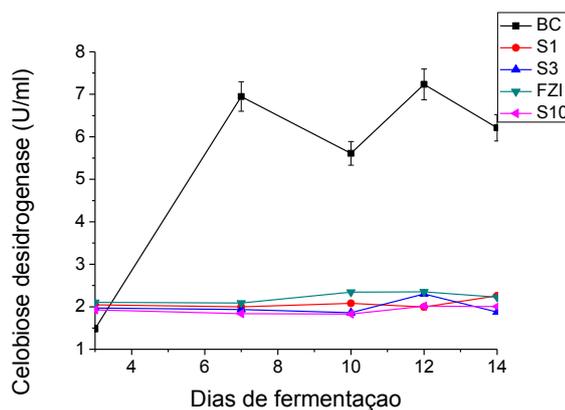


Tabela 4. Produção de celobiose desidrogenase pelos isolados selecionados. (*U/mL de extrato bruto)

Dias	<i>R. emersonii</i> BC	<i>T. lanuginosus</i> S1	<i>T.lanuginosus</i> S3	<i>T.lanuginosus</i> FZI	<i>R. emersonii</i> S10
3	1,5*	2,0	2,0	2,1	1,9
7	6,9	2,0	1,9	2,1	1,8
10	5,6	2,1	1,9	2,3	1,8
12	7,2	2,0	2,3	2,3	2,0
14	6,2	2,3	1,8	2,2	2,0

Segundo Langston et al., (2012), a enzima CDH foi confirmada no secretoma do fungo termofílico *Thielavia terrestris* cultivado em meio com a celulose juntamente com uma mistura de celulases e hemicelulases. Langston, et al., (2012), também reportaram atividade de CDH (0,012U/mg), usando celobiose como doadora de elétrons e não a lactose, como utilizado no presente trabalho, fato que poderia explicar as diferenças nas atividades observadas, a exemplo do isolado *R. emersonii* BC (1,5 U/mL ou 0,029 U/mg).

Os ensaios de atividade de celobiose desidrogenase, são bastante utilizados no *screening* de extrato bruto nas atividades de CDH uma vez que permite a fácil e rápida detecção de até mesmo, baixos níveis dessa enzima, na presença de altos níveis de lacase (BAMINGER et al., 1999).

5.5. Caracterização das enzimas

Dentre os cinco microrganismos utilizados na etapa anterior do trabalho, foram selecionados três para os testes de caracterização enzimática. As cepas foram selecionadas levando em consideração os melhores produtores das enzimas FPase, xilanase, CMCase e β -glicosidase e tempo de fermentação necessários para a obtenção dos picos de atividade (Tabela 5).

Tabela 5. Cepas selecionadas para serem caracterizadas de acordo com o melhor desempenho fermentativo observado durante os 14 dias de fermentação. Enzimas a serem caracterizadas: FPase, xilanase, CMCase e β -glicosidase.

	Tempo de fermentação (h)			
	FPase	Xilanase	CMCase	B-glicosidase
<i>R. emersonii</i> BC	48	288	312	288
<i>T.lanuginosus</i> S1	168	168	336	312
<i>R. emersonii</i> S10	48	240	240	240

Condições físicas, tais como temperatura e pH, interferem nas respostas de atividade das enzimas tanto em sua velocidade de catálise, como em sua estabilidade estrutural. Outros fatores importantes que também são determinantes da atividade enzimática são a concentração da enzima e o tempo de reação, bem como, a concentração, composição e qualidade do substrato. Cabe ressaltar, que os resultados apresentados mostram a atuação das enzimas contidas em soluções enzimáticas brutas, sem que tenha ocorrido qualquer procedimento de purificação ou de concentração sendo, deste modo, aparentes as condições ótimas de desempenho verificadas. Nessas condições, há possivelmente a influência de componentes do meio de cultivo sobre a atividade e estabilidade das enzimas.

5.5.1. Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades das enzimas

A maioria das enzimas são proteínas, e as mudanças no pH da reação irão afetar o caráter iônico dos grupos carboxila e amino presentes na superfície da molécula e no sítios envolvidos na ligação do substrato e na catálise, o que influenciará a estrutura e velocidade catalítica (HARPER et al., 1982). De acordo com a literatura, enzimas hidrolíticas produzidas por fungos apresentam valores de pH variando entre 3,0 e 7,0 (SETHURMAN et al., 1998). As curvas de variação da atividade das enzimas em diferentes valores de pH, refletem o pH no qual importantes grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico estão em seus estados de ionização adequados (LEHNINGER, 1997). A atividade catalítica das enzimas pode, assim, ser regulada ao menos em parte por variações do pH do meio em que está inserida (HARPER et al., 1982).

Os ensaios para avaliação dos efeitos do pH do meio reacional sobre a atividade das enzimas foram conduzidos à temperatura de 60°C. Analisando a figura 20 e a tabela 6, pode-se observar que a maior atividade de FPase para a enzima produzida pela cepa *R. emersonii*

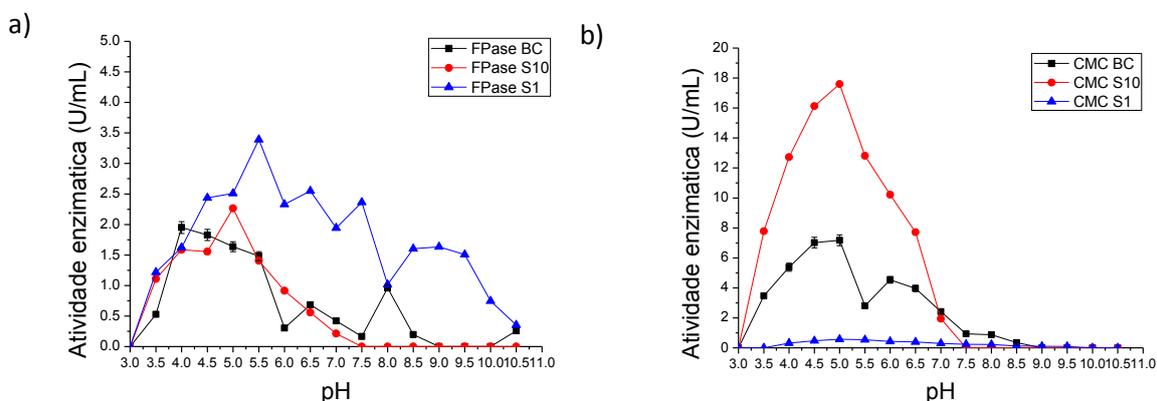
BC foi 4,0, 5,0 para a enzima de *T. lanuginosus* S1 e 5,5 para a de *R. emersonii* S10. Dados de literatura mostram valores de pH entre 3,0 e 5,0 para atividade de FPase fúngicas (ANG et al., 2013).

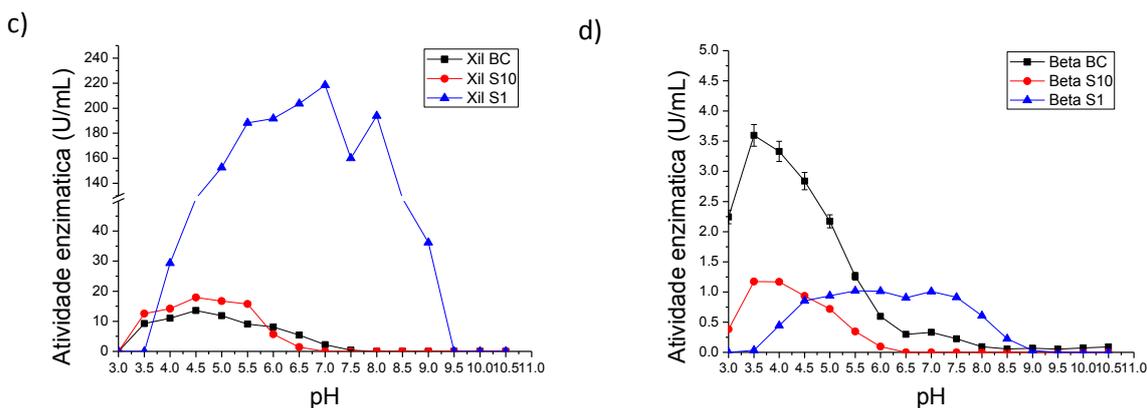
A maior atividade de CMCase ocorreu a pH 5,0 para as enzimas produzidas pelas três cepas, similares aos descritos para CMCase de *T. aurantiacus* e *A. fumigatus* (DA SILVA et al., 2005; MORETTI et al., 2012).

Atividades máximas de xilanase para as enzimas de *R. emersonii* BC, *R. emersonii* S10 e *T. lanuginosus* S1 foram 5,0, 4,5 e 7,0, respectivamente. Esses dados são interessantes, pois mostram uma xilanase atuando em pH neutro similar ao descrito para xilanase *T. lanuginosus* (LI et al., 2005). As xilanases fúngicas tem sido descritas como acídicas, neutras a alcalinas (ISHIHARA et al., 1997; CHRISTOV et al., 1999; POLIZELI et al., 2005) o que tem atribuído a essas enzimas inúmeras aplicações como tratamento de mostos acídicos de vinhos, atuações em panificação e branqueamento de polpa kraft alcalina.

Diferentes valores de pH de atividade máxima foram obtidos para a enzima β -glicosidase, com valores 3,5, 4,0 e 7,0, para os isolados *R. emersonii* BC, *R. emersonii* S10 e *T. lanuginosus* S1, respectivamente Na literatura são mostrados pHs ótimos de atividade entre 4,0 e 5,0 para a maioria das β -glicosidase fúngicas (GAO et al., 2014; LEITE et al., 2007).

Figura 20. Efeito da variação do pH na produção enzimática. a) FPase; b) CMCase; c) xilanase e d) β -glicosidase.





Os ensaios para avaliação dos efeitos da temperatura de reação sobre as atividades das enzimas dos fungos selecionados foram realizados em pH indicado como melhor para a atividade de cada enzima, conforme dados da Figura 20.

Dados da Figura 21 e indicam que as enzimas produzidas pelos fungos foram bastante diferentes com relação aos seus comportamentos em função da temperatura de reação com valores máximos de atividade em 65, 60 e 40°C para as enzimas de *R. emersonii* BC, *R. emersonii* S10 e *T. lanuginosus* S1, respectivamente, indicando um perfil mesofílico para a enzima de *T. lanuginosus* S1. Maior termolabilidade também foi observada para a CMCases e Xilanasases desse fungo.

As enzimas produzidas pelos fungos *R. emersonii* BC e *R. emersonii* S10 mostraram um perfil tipicamente termofílico com atividades máximas entre 75 e 80°C (Tabela 6), bastante acima de enzimas do fungo termotolerante *Aspergillus fumigatus* (ANG et al., 2013) e do termofílico *T. lanuginosus* CBS (LI et al., 2005) *T. aurantiacus* (KALOGERIS et al., 2003). Esse perfil mostra-se muito interessante quando se busca enzimas para aplicação em sacarificação de material lignocelulósico em condições não assépticas e sujeitas a variações de temperatura e pH.

Figura 21. Efeito da variação da temperatura de incubação na atividade das enzimas. a) FPase; b) CMCCase; c) xilanase e d) β -glicosidase.

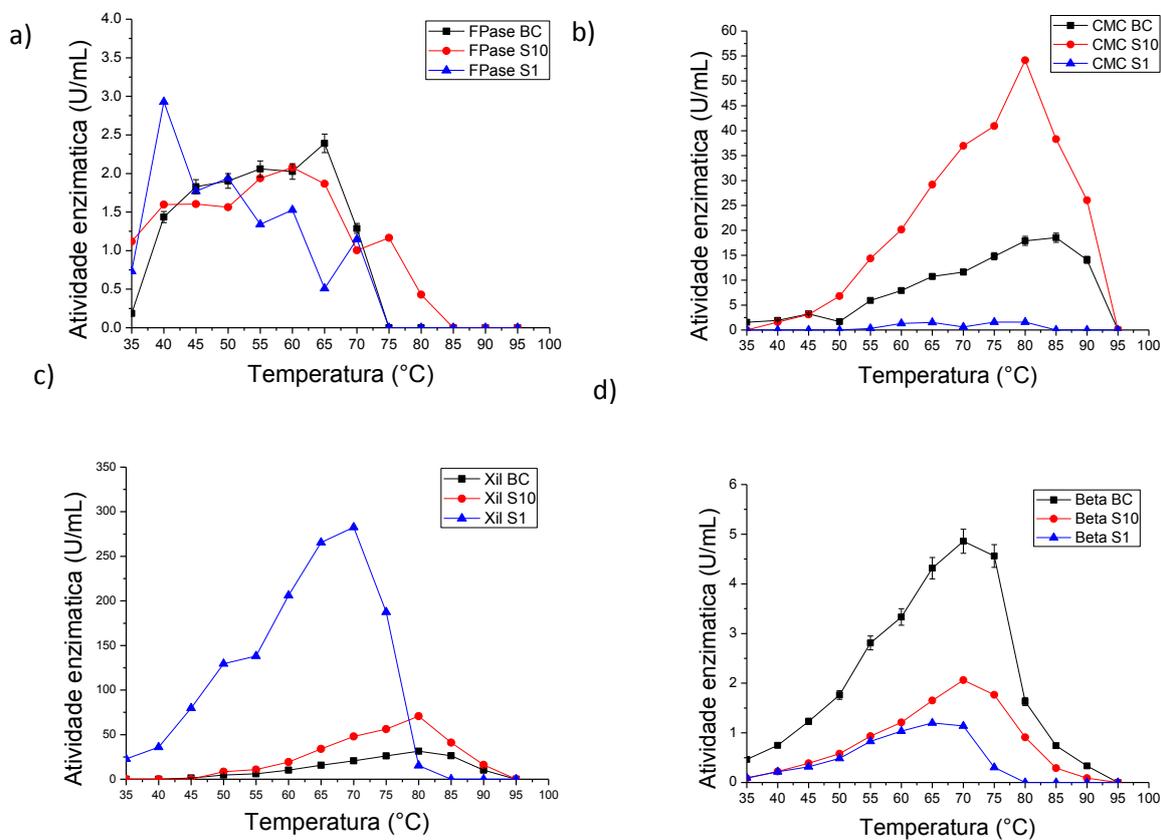


Tabela 6. Síntese das atividades máximas de cada enzima em função da temperatura e pH de reação

	pH de atividade máxima			
	FPase	Xilanase	CMCase	B-glicosidase
<i>R. emersonii</i> BC	4,0	5,0	5,0	3,5
<i>T.lanuginosus</i> S1	5,5	7,0	5,0	7,0
<i>R. emersonii</i> S10	5,0	4,5	5,0	4,0
	Temperatura (°C)			
<i>R. emersonii</i> BC	65	80	85	70
<i>T.lanuginosus</i> S1	40	70	80	65
<i>R. emersonii</i> S10	60	80	80	70

5.5.2. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas quando em ausência de substrato

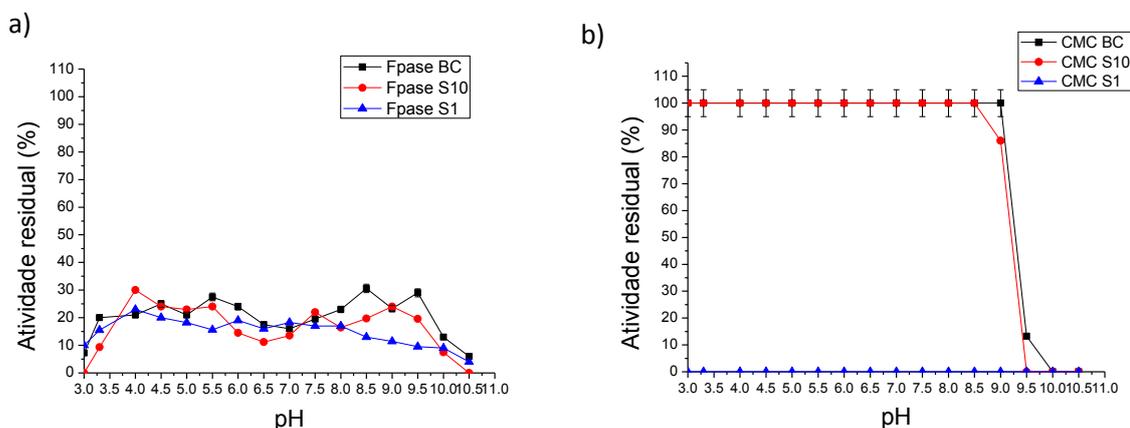
Ensaio para avaliação da estabilidade das enzimas quando são mantidas em variadas condições de pH e temperatura, em ausência do substrato, foram desenvolvidos visando demonstrar a estabilidade dessas proteínas em condições de estocagem. A porcentagem de atividade residual foi calculada tomando-se como 100% o valor da atividade enzimática dos isolados no tempo zero de incubação.

A figura 22 mostra a preservação das atividades enzimáticas após 24 horas de incubação em diferentes valores de pH e em temperatura de $\pm 20^{\circ}\text{C}$. As enzimas FPase de todos os fungos, foi muito pouco estável em ausência do substrato mantendo apenas 30 % de suas atividade inicial em pH entre 4,0 e 5,0. Por outro lado, a enzima CMCase dos fungos *R. emersonii* BC e *R. emersonii* S10 manteve 100% de sua atividade na faixa de pH entre 3 e 9. Não foi possível avaliar a atividade da CMCase de *T.lanuginosus* S1. Na literatura valores iguais aos acima citados, foram conseguidos com o fungo *T. aurantiacus* que se apresentou estável na mesma faixa de pH (3 a 9) (DA SILVA et al., 2005).

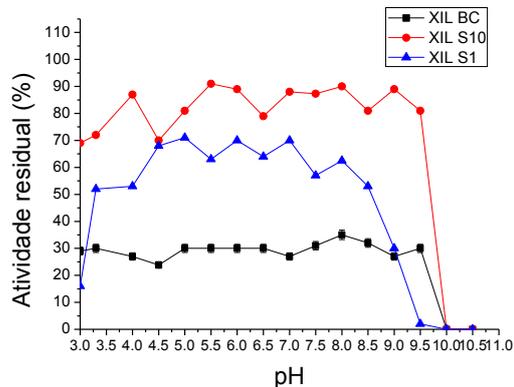
A enzima xilanase do fungo *R. emersonii* S10 manteve 80% de sua atividade entre pH 7,0 e 9,5 enquanto a enzima de *T.lanuginosus* S1 manteve entre 60 e 70% de sua atividade na faixa de pH de 4,5 a 7,0. A xilanase produzida por *R. emersonii* BC foi muito sensível a incubação em ausência de substrato preservando apenas 30% da atividade original em pH de 3 a 9,5.

A enzima β -glicosidase do isolado *R. emersonii* BC manteve 100% de sua atividade na faixa de pH 3 a 5,5, e enzima de *R. emersonii* S10 apresentou apenas 25% da atividade entre os pHs 4,5 e 5,5 e a de *T.lanuginosus* S1, entre 7,5 e 8,0 com 45%.

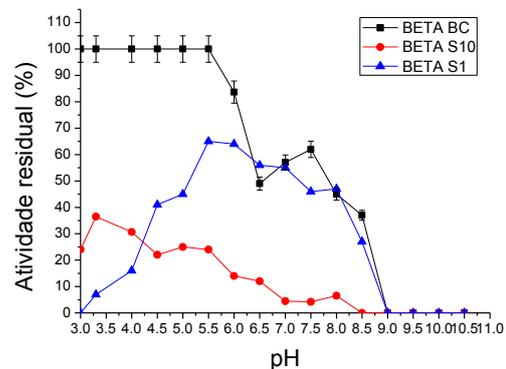
Figura 22. Estabilidade das enzimas FPase (a), CMCase (b); Xilanase (c) e β -glicosidase (d) em função do pH do meio, após 24 horas de incubação.



c)



d)



Os perfis de estabilidade das enzimas em função da temperatura de incubação, em ausência do substrato, foram determinados diluindo as alíquotas em tampões cujos pHs foram aqueles em que as enzimas foram mais estáveis, conforme dados da figura 22.

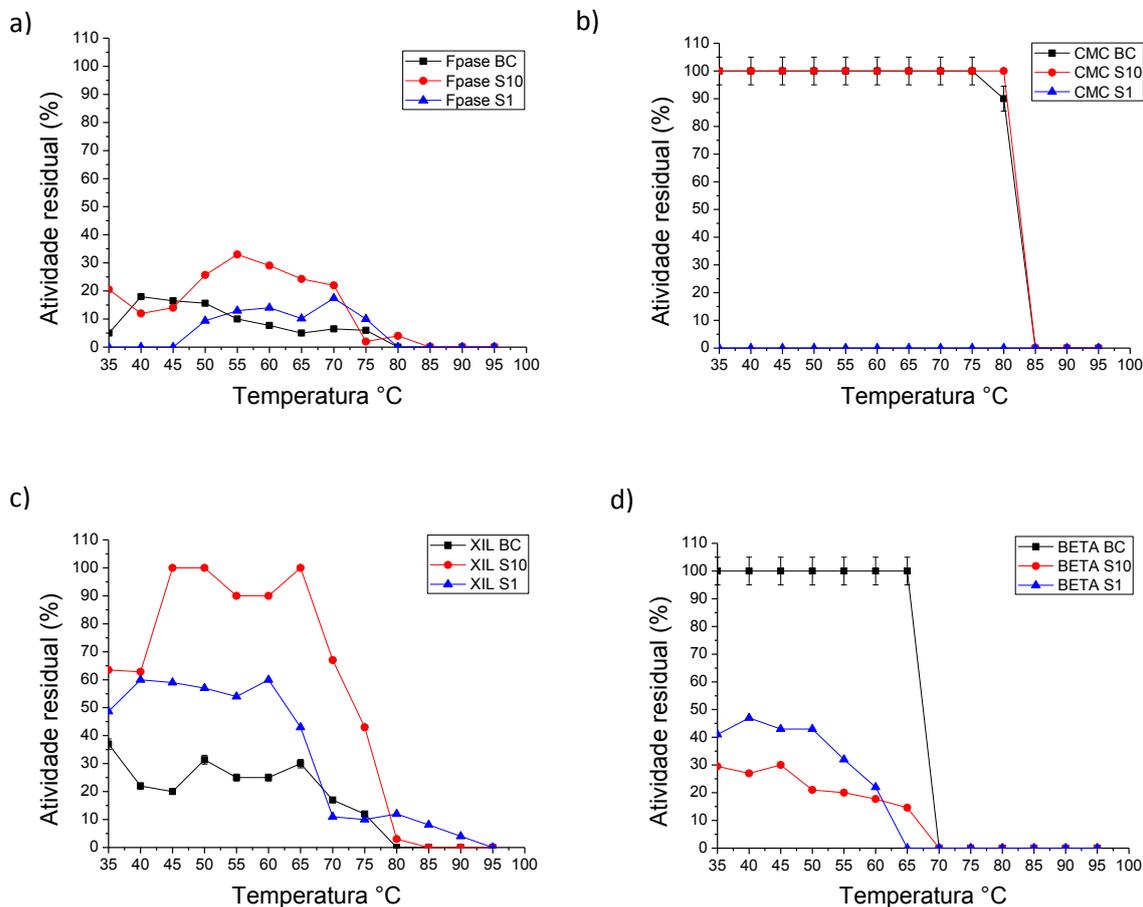
Observando a figura 23, vemos que a enzima FPase apresentou pouca estabilidade térmica comparada a CMCase que foram estáveis a até 1 hora a 80°C.

Resultado inferior foi mostrado por Moretti e colaboradores (2012), que com os fungos *M. thermophila* e *A. fumigatus* conseguiram 90% de atividade a 65°C. Ang e colaboradores (2013) encontraram valores superiores com *A. fumigatus*, que abaixo de 50°C manteve 70% de atividade. Dados revelaram que *T. aurutiancus* se mostrou estável a 80°C, no entanto não foi mencionada a porcentagem de atividade (KALOGERIS et al., 2003). Resultados inferiores podem ser encontrados na literatura, Jiang e colaboradores (2010) com *Chaetomium sp.* mantiveram 80% de atividade entre 50 e 55°C. Em outros casos da literatura, *T. aurantiacus* foi estável a 60°C durante uma hora (SILVA et al., 2009) e *T. lanuginosus* a 65°C, permaneceu com 50% de atividade residual (LI et al., 2005).

A enzima xilanase manteve-se estável a 70°C e apenas a β -glicosidase do fungo *R. emersonii* BC foi estável a 65°C.

A termoestabilidade de enzimas tem sido bastante estudada, visto o interesse em enzimas estáveis em sistemas aquecidos em processos industriais. Enzimas de fungos mesofílicos como xilanase de *Penicillium piceum* manteve 80% de sua atividade a 50°C (GAO et al., 2014) e de *P. citrinium* 60°C (NG et al., 2010). Por outro lado, celulasas de *T. aurantiacus* se mostrou estável na faixa de temperatura de 50 a 70°C (GOMES et al., 1994).

Figura 23. Estabilidade de FPase (a), CMCCase (b), Xilanase (c) e β -glicosidase (d) em função da temperatura de incubação.



6. Conclusões

Com os resultados obtidos durante o desenvolvimento do projeto, observou-se claramente que isolar fungos em temperaturas acima de 50°C é um fator importante quando o objetivo se trata de selecionar cepas termofílicas verdadeiras. Os fungos termofílicos isolados mostraram-se capazes de produzir celulasas e xilanases em quantidades consideráveis, por meios de fermentação em estado sólido e além dessas enzimas que são mais comuns, também foram dosadas produções de enzimas raramente encontradas livres no meio, como β -xilosidase e celobiose desidrogenase. Cabe ressaltar que o rendimento enzimático do extrato bruto de algumas enzimas estudadas no trabalho, caso da endoglucanase por exemplo, foi

superior a resultados encontrado na literatura em que a enzima purificada foi utilizada, o que estimula estudos futuros e mais específicos com a cepa produtora da enzima em questão.

As enzimas FPase, endoglucanase, β -glicosidase e xilanase produzidas por três cepas de fungos termofílicos selecionados nesse trabalho, apresentam diferentes perfis de atividade e estabilidade em função de variações no pH e temperatura de reação e de incubação. Dessa forma, foi possível a obtenção de enzimas celulolíticas termofílicas com atividade e estabilidade a 80°C.

De forma geral, os resultados são promissores, principalmente quando relacionados à questão da termofilia e termoestabilidade, uma vez que são características importantes e necessárias em processos industriais que utilizam microrganismos e suas enzimas, e especialmente por serem escassos trabalhos com fungos e enzimas com essas características.

Referências

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mechanisms involved in the biodegradation of lignocelulosic materials and related technological applications. Química Nova, v. 34, n 10, 2011.

AIDOO, K.E.; HENRY, R.; *et al.* Solid state fermentations. Advances in Applied Microbiology, v. 28, p. 201-237, 1982.

AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. The Fungi: An Advanced Treatise. Volume I: The Fungal Cell. New York: Academic Press, 1965.

AKINYELE, B.J.; ADETUYI, F.C. Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volvariella volvacea*. African Journal of Biotechnology, v. 4, p. 1390-1395, 2005.

ANG, S. K., SHAZA, E. M., *et al.* Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. Process Biochemistry, p. 1-10, 2013.

APPLICHEM. Biological Buffers, 2008. Disponível em:
<<http://www.applichem.com/en/products/biochemica/biological-buffer/>>. Acesso em: 19 de abr. de 2014.

ATOMI, H. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. Current Opinion in Microbiology, v. 9, p. 166-173, 2005.

AWAFO, V.A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. Tese de Doutorado, Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1997.

BABU, K.R.; SATYANARAYANA, T. α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid-state fermentation. Process Biochemistry, v. 30, p. 305–309, 1995.

BAKRI, Y.; JACQUES, P.; *et al.* Xylanase production by *Penicillium canescens* in solid-state fermentation. Applied Biochemistry Biotechnology, p. 105-108, p. 737-747, 2003.

BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; *et al.* Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099. Bioresource Technology, v. 98, p. 504–510, 2007.

BALDRIAN, P.; VALASKOVÀ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiology Review, v. 32, p. 501–521, 2008.

BAMINGER, U.; NIDETZKY, B.; *et al.* A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. Journal of Microbiological Methods, v. 35, p. 253-259, 1999.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; *et al.* Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. Waste Management, v. 32, p. 1341–1346, 2012.

BAYER, E.A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. Biodegradation, v. 3, p.171-188, 1993.

BIELY, P. Microbial xylanolytic system. Trend in Biotechnology, v. 3, p. 286-290, 1985.

BISWAS, R.; SAHAI, V.; *et al.* Bioprocess strategies for enhanced production of xylanase by *Melanocarpus albomyces* IITD3A on agro-residual extract. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 110, No. 6, p. 702–708, 2010.

BOUDET, A.; KAJITA, M.; *et al.* Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. Trends in Plant Science, v. 8, n. 12, 2003.

BROCK, T. D. Life at high temperatures. Science, v. 230, p. 132-138, 1985.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; *et al.* Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. Process Biochemistry, v. 45, p. 120-128, 2010.

CAMERON, M.D.; AUST, S.D. Cellobiose dehydrogenase—an extracellular fungal flavocytochrome. Enzyme and Microbial Technology, v. 28, p. 129–138, 2001.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHANDRA, T.S.; SOUNDAR, S. Production of cellulase and detection of Avicel-adsorbing carboxymethylcellulase from a mesophilic fungus *Humicola grisea* Fb. Biochemistry Division, Department of Chemistry, Indian Institute of Technology, jouspu ofb iosxjincaen d bioeninebring, v. 91, No. 2, p.153-158, 2001.

CHRISTOV, L.P., SZAKACS, G., *et al.* Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. Process Biochemistry, v. 34, p. 511-517, 1999.

COCHRANE, V.W. Physiology of Fungi. New York: John Wiley & Sons Inc, 1958.

COUGHLANM, P.; LJUNGDAHLL, G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, FEMS Symposium, n. 43, p. 11-30, 1988.

DAMASO, M.C.T. *et al.* Application of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 for enzymatic hydrolysis of corncob and sugarcane bagasse. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 113-116, p. 1003-1012, 2004.

DA SILVA, R. Produção, Purificação e Caracterização de Enzimas Celulolíticas termoestáveis de *Humicola sp.*, 179-5 e Aplicação dessas Enzimas. 1992. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1992, Campinas.

DA SILVA, R., LAGO, E.S., *et al.* Production of xylanase and cmcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus miehe*. Brazilian Journal of Microbiology, v.36, p. 235-241, 2005.

DEMIRBAS, F.M.; BALAT, M.; *et al.* Biowastes-to-biofuels, Energy Conversion and Management, v. 52, p. 1815–1828, 2011.

DHILLON, G. S.; OBEROIA, H. S.; *et al.* Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. Industrial Crops and Products, v. 34, p. 1160 -1167, 2011.

DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. GCB Bioenergy, v. 1, p. 2-17, 2009.

DUNCAN, S.M; SCHILLING, J.S. Carbohydrate-hydrolyzing enzyme ratios during fungal degradation of woody and non-woody lignocellulose substrates, Enzyme and Microbial Technology, v. 47, p. 363–371, 2010.

DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, n. 2/3, p. 113-125, 2003.

EGOROVA, K.; ANTRANIKIAN, G. Industrial relevance of thermophilic Archaea. Current Opinion Microbiology, v. 8, n. 6, p. 649-655, 2005.

FENGXIA, L., MEI, L., *et al.* Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. Bioresource Technology, v. 99, p. 5938–5941, 2008.

FLITSCH, A; PRASETYO, E.N.; *et al.* Cellulose oxidation and bleaching processes based on recombinant *Myriococcum thermophilum* cellobiose dehydrogenase. Enzyme and Microbial Technology, v. 52, p. 60– 67, 2013.

GAO, L., GAO, F., *et al.* Biochemical characterization of a new β -glucosidase (Cel3E) from *Penicillium piceum* and its application in boosting lignocelluloses bioconversion and forming

disaccharide inducers: New insights into the role of β -glucosidase. Process Biochemistry, v. 49, p. 768-774, 2014.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 85-101. 2003.

GIRIO, F.M., FONSECA, C.; *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresource Technology, v. 101, p. 4775–4800, 2010.

GOMES, D.J., GOMES, J., *et al.* Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. Journal of Biotechnology, v. 37, p. 11-22, 1994.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; *et al.* Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. Química Nova, v. 30, No. 1, 136-145, 2007.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; *et al.* Characteristics of fungal cellulases. Bioresource Technology, v. 36, p. 37-50, 1991.

HARPER, H.A., RODWELL, V.W.; *et al.* Manual de Química Fisiológica, 5 ed., p. 736, 1982.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, v. 100, p. 10-18, 2009.

HENRIKSSON, G., JOHANSSON, G., PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. Journal of Biotechnology, v. 78, p. 93–113, 2000.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochemistry Journal, v. 316, p. 695–696, 1996.

HIGUCHI, T. Biodegradation of lignin: Biochemistry and potential applications. Experientia, v. 38, p. 159-166, 1982.

HILL, J.; NELSON, E.; *et al.* Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. PNAS 103, v. 30, p. 11206–11210, 2006.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages. Current Opinion in Microbiology, v. 8, p. 301–306, 2005.

HOUGH, D. W.; DANSON, M.J. Extremozymes. Current Opinion in Chemical Biology, v. 3, p. 39-46, 1999.

IEMBO, T.; AZEVEDO, M.O.; *et al.* Purification and partial characterization of a new β -xylosidase from *Hemicella grisea* var *thermoidea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 22, p. 475-479, 2006.

ISHIHARA, M., TAWATA, S., *et al.* Purification and some properties of a thermostable xylanase from thermophilic fungus strain HG-1. Journal of fermentation and bioengineering, v. 38, p. 478-480, 1997.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. Industrial Crops and Products, v. 11, p. 1 -5, 2000.

JEFFRIES, T.W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. Biodegradation, v. 1, p. 163-176. 1990.

JIANG, Z., CONG, Q., *et al.* Characterization of a thermostable xylanase from *Chaetomium* *sp.* and its application in Chinese steamed bread. Food Chemistry, v. 120, p. 457-462, 2010.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; *et al.* Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. Journal of Biotechnology, v. 60, p. 155–163, 1998.

KALOGERIS, E., CHRISTAKOPOULOS, P., *et al.* Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. Process Biochemistry, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KANG, S. W.; KO, E.H.; *et al.* Over-production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass, Biotechnology Letters, v. 21, p. 647-650, 1999.

KOLONOVA, K.; VRANSKA, M.; *et al.* Mode of action of endo- β -1,4-xylanases families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. Journal of Biotechnology, v. 121, p. 338-345, 2006.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems - An Overview. Critical Reviews in Biotechnology, v. 25, p. 1-30, 2005.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advances, v. 17, p. 561-594, 1999.

LANGSTON, J.A., BROWN, K., *et al.* Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1824 p. 802–812, 2012.

LEHNINGER, A. L. Bioquímica. São Paulo - Editora Edgard Blüncher, v.1, 1997.

LEITE, R.S.R.; ALVES-PRADO, H.F.; *et al.* Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. Enzyme and Microbial Technology, v. 43, p. 391–395, 2008.

LEITE, R.S., GOMES, E., *et al.* Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochemistry, v. 42, p. 1101-1106, 2007.

LEITE, R.S.R., ALVES-PRADO, H.F., *et al.* Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and

Aureobasidium pullulans in agricultural wastes. Enzyme and Microbial Technology, v. 43, p. 391-395, 2008.

LI, X.T., JIANG, Z.Q., *et al.* Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. Bioresource Technology, v. 96., p. 1370-1379, 2005.

LYNCH, J.M.; SLATER, J.H.; *et al.* Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. Journal of General Microbiology, v. 127, p. 231-236, 1981.

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. Biotechnology and Bioengineering, v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

LYND, L.R. *et al.* Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.

MACRIS, B.J.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M. Enhanced cellobiohydrolase production from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma harzianum*. Biology Division, Nuclear Research Centre Democritos, Aghia ParaskevL Attiki, Greece, 1985.

MADIGAN, M. T., OREN, A. Thermophilic and halophilic extremophiles, Current Opinion in Microbiology, 1999.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; *et al.* Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 64, p. 461-488, 2000.

MASAMI, G.,O.O.; USUI, I.Y.; *et al.* Ethanol production from the water hyacinth *Eichhornia crassipes* by yeast isolated from various hydrospheres. African Journal of Microbiology Research, v. 2, p. 110-113, 2008.

- MASLEN, S.L.; GOUBET, F.; *et al.* Structural elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC-MALDI-TOF/TOFMS/MS. Carbohydrate Resource, v. 342, p. 724-735, 2007.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; *et al.* Solid state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation. Heidelberg: Springer, 1^a ed, v. 01, p. 447, 2006.
- MOORE-LANDECKER, E. Fundamentals of The Fungi. 2^a Edição. New Jersey: Prentice-Hall Inc, 1982.
- MONTE, J.R.; CARVALHO, W.; *et al.* Use of a mixture of thermophilic enzymes produced by the fungus *Thermoascus aurantiacus* to enhance the enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse cellulose. American Journal of Agricultural and Biological Science, v. 5, p. 468-476, 2010.
- MORETTI, M.M.S., BOCCHINI-MARTINS, D.A., *et al.* Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of Cellulases and xylanases under solid-state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, p. 1062-1071, 2012.
- MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; *et al.* A molecular phylogeny of thermophilic fungi. Fungal Biology, v. 6, p. 489 – 502, 2012.
- MORPETH, F.F. Intracellular oxygen-metabolizing enzymes of *Phanerochaete chrysosporium*. Journal General Microbiology, v. 133, p. 3521–3525, 1987.
- NAGALLA, S.R.; SUBRAMANIAM, S.S.; *et al.* Cloning and characterization of a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Sporotrichum thermophile*. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 365, n. 2, p. 223–230, 1999.

NG, I., LI, C., *et al.* High-level production of a thermoacidophilic b-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. Bioresource Technology, v. 101, p. 1310-1317, 2010.

NISHIO, N.; SRINIVASAN, K.; *et al.* Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocalhastix* from talk, in a repeated batch culture. Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, 1-4-I Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 2001.

PAES, M.C.D., TEIXEIRA, F. F., *et al.* Composição química da palha de milho com qualidade para artesanato, 2010. Disponível em:
<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30082/1/Composicaoquimica.pdf>>.
Acesso em: 13 de out. de 2013.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 74, p. 69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. Biochemical engineering Journal, v. 13, p. 81-84, 2003.

PHILLIPS, C.M.; BEESON, W.T., *et al.* Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. ACS Chemical Biology, v. 6, p. 1399–1406, 2011.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Applied Microbiology Biotechnology, v. 67 (5), p. 577–591, 2005.

POLIZELI, M.L. Properties and commercial application of xylanases from fungi. Mycotechnology: current trends and future prospects, p. 82-108, 2009.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; *et al.* Some engineering aspects of solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 127-135. 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. Química Nova, v. 26, n. 6, p. 863-871. 2003.

RASMUSSEM, L.E.; SORENSEN, H.R.; *et al.* mode of action and properties of the xylosidase from *Talaromyces emersonni* and *Trichoderma reesei*. Biotechnology Bioenergy, v. 94, p. 869–876, 2006.

RENGANATHAN, V.; USHA, S.N.; *et al.* Cellobiose-oxidizing enzymes from the lignocellulose-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: interaction with microcrystalline cellulose. Applied Microbiology Biotechnology, v. 32, p. 609-613, 1990.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 197-203, 2003.

RYABOVA, O.; VRSANSKA, M.; *et al.* A novel family of hemicellulolytic α -glucuronidase. FEBS Letters, v. 583 (9), p. 1457–1462, 2009.

SADDLER, J.N., MANSFIELD, S., *et al.* Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization. Applied and Environmental Microbiology, v. 63, p. 3804-3809, 1997.

SALAR, R. K.; ANEJA, K. R. Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography. Journal of Agriculture Technology, v. 3, p. 77-107, 2007.

SALAZAR, R.F.S.; SILVA, G.L.P.; *et al.* Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Anais. Campinas: Unicamp, 2005. p. 1-6. Disponível em:
<<http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/top15.pdf>>. Acesso em: 13 de outubro de 2013.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M.C.N. Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *Lentinus strigosus* de ocorrência na amazônia. Arquivos Instituto Biológico, São Paulo, v. 77, p. 539-543, 2010.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology Advances, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANTOS, H.; LAMOSA, P.; *et al.*; Extremófilos: Microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. Biotecnologia Microbiana: Boletim de Biotecnologia. n. 2, 2001.

SAHA, T.; GHOSH, D.; *et al.* Cellobiose dehydrogenase production by the mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clypeatus*. Process Biochemistry, v. 43, p. 634–641, 2008.

SARATALE, G.D.; SARATALE, R.G.; *et al.* Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces sp.* MDS. Biomass and Bioenergy, v. 47, p. 302-315, 2012.

SEDEROFF, R.R. *et al.* Unexpected variation in lignin. Current Opinion in Plant Biology. v. 2, p. 145-152. 1999.

SEDLMEYER, F.B. Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential use for food applications, Food Hydrocolloids, v. 25, p. 1891-1898, 2011.

SETHURAMAN, A.; AKIN, D.E.; *et al.* Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. Biotechnology Applied Biochemistry, v. 27, p. 37-47, 1998.

SHEN, Q., LIU, D., *et al.* 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.

SHIRAKI, K.; NISHIKORI, S.; *et al.* Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart. European Journal Biochemistry, v. 268, n. 15, p. 4144–4150, 2001.

SHOU, C., CHRISTENSEN, M.H., *et al.* Characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Humicola insolens*. Biochemistry Journal, v. 330, p. 565–571, 1998.

SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases, cap. Enzimas como agentes biotecnológicos, Ribeirão Preto, v. 31, 2004.

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

STOICA, L.; RUZGAS, T.; *et al.* Electrochemical evidence of self-substrate inhibition as functions regulation for cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete chrysosporium. Bioelectrochemistry, v. 76, p. 42–52, 2009.

SONCINI JÚNIOR, G.; FRANCHETTI, S. M. M.; *et al.* Mycelial growth and microscopic characteristics of *Thermomyces lanuginosus Tsiklinskaya* in YpSs medium with different carbon sources. Hoehnea, v. 34, p. 239-243, 2007.

SORENSEN, H.R.; MEYER, A.S.; *et al.* Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. Enzyme Microbial Technology, v. 36, p. 773–784, 2003.

STRYER, L. Bioquímica, 4º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SUN, J.X. *et al.* Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. Polymer Degradation and Stability, v. 84, p. 331-339, 2004.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Critical Review Biotechnology, v. 17, p. 39–67, 1997.

SZENGYEL, Z. Ethanol from wood: Cellulase enzyme production. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.

TEMP, U., EGGERT, C., Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied Environmental Microbiology, v. 65, p. 389–395, 1999.

TREVISAN, H.C.; SAID, S.; *et al.* Enzimas como agente Biotecnológico, 1. ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 115-135, 2004.

TUOHY, M.G.; BUCKLEY, R.J.; *et al.* Enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi on lignocellulosic substrates. Enzyme systems for lignocellulose degradation. London and New York: Elsevier, p. 293-312, 1989.

VOUTILAINEN, S. Fungal thermostable cellobiohydrolases: Characterization and protein engineering studies. VTT Publications, v. 754, p. 14-30, 2010.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering, v. 88, n. 7, p. 797-824. 2004.

ZIGLIO, B. R.; BEZERRA, J. R. M. V.; *et al.* Elaboração de pães com adição de farinha de sabugo de milho. Revista Ciências Exatas e Naturais, v. 9, nº 1, 2007.

YEOMAN, C.J.; HAN, Y.; *et al.* Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. Advances in Applied Microbiology, cap. 1, v. 70, p. 1-55, 2010.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. Annual Review Entomology, v. 55, p. 609- 632, 2010.

WONG, K. K.; TAN, L.U.; *et al.* Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiology Review, v. 52, p. 305-317, 1988.

<<http://nutrition.jbpub.com/resources/chemistryreview9.cfm>>. Acessado em: 10 de out. de 2013, às 12:47.