



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA



LIDIANE MARIA DOS SANTOS LIMA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
VOLTADA À APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE GERAÇÃO
DE BIOETANOL**

**DIADEMA
2015**

LIDIANE MARIA DOS SANTOS LIMA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
VOLTADA À APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE GERAÇÃO
DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos

DIADEMA
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Lídiane

Atividade Enzimática de Fungos Filamentosos Voltada à Aplicação em Processos de Geração de Bioetanol / Lídiane Maria dos Santos Lima.

-- Diadema, 2015.

110 f.

Dissertação (mestrado) em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade - Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2015.

Orientadora: Suzan Pantaroto de Vasconcellos

1. Ligninases. 2. Celulases. 3. Mono-oxigenases. 4. Compostagem.
5. Proteases. I. Título.

CDD 572.7

FOLHA DE APROVAÇÃO

Diadema, 10 de junho de 2015.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos
Orientadora
ICAQF-UNIFESP/Diadema

Assinatura

Prof. Dr. Welington Luis de Araújo
Titular
ICB/USP

Assinatura

Profa. Dra. Mirian Chieko Shinzato
Titular
ICAQF-UNIFESP/Diadema

Assinatura

Profa. Dra. Sarah Santos Gonçalves
Titular
LEMI/UNIFESP

Assinatura

Prof. Dr. José Gregório C. Gomez
Suplente
ICB/USP

Assinatura

Prof. Dr. Nilson Antonio Assunção
Suplente
ICAQF-UNIFESP/Diadema

Assinatura

À minha querida mãe Edileusa,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** e ao meu **anjo guardião** por me acompanharem nesta jornada! À minha mãe **Edileusa** pelas orações, paciência e dedicação. Ao meu pai **José** que empenhou esforços para que eu pudesse fazer minha graduação. À minha irmã **Eveline** pelo apoio, aos meus tios **Teresa** e **Antônio** pelo incentivo para continuar estudando e também a **Cleusa** pelas palavras de motivação.

À minha orientadora **Profa. Dra Suzan Pantaroto de Vasconcellos**, pelo convite para fazer parte do seu grupo de pesquisa, disponibilidade para me orientar, bem como esclarecer minhas dúvidas no decorrer do mestrado, execução dos experimentos/cálculos de atividade enzimática e pela confiança depositada em mim, e principalmente pela paciência. Muito obrigada!

Ao **Dr. Michel R. Zambrano Passarini** pelo desenvolvimento inicial deste trabalho e principalmente ao **Dr. João Batista da Cruz** pelo apoio.

Às amigas **Caroline**, **Cindi** e **Vivian** pelas boas conversas e risadas no laboratório. Aos colegas em especial **Leonardo** e **Thamires** pelo auxílio e solicitude no início dos experimentos. À Lilian (INFAR-UNIFESP/EPM) pela atenção e disponibilidade para esclarecer dúvidas no ensaio de caracterização de proteases. À **Profa. Dra. Sarah**, **mestrando Mario** e **doutorando Hemílio** (LEMI-UNIFESP) pela solicitude e disponibilidade para esclarecer dúvidas na identificação dos fungos filamentosos por técnicas moleculares. E aos demais colegas de laboratório **Deborah**, **Fernanda**, **Hyejung**, **Keith**, **Marghuel**, **Marília**, **Meryellen** e **Vítor** que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório da UNIFESP/Diadema **Claudia**, **Paloma** e **Wilson** pela solicitude e empréstimo de equipamentos.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade UNIFESP/Diadema.**

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo.

À **FAPESP** pelo aporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Atividade Enzimática de Fungos Filamentosos Voltada à Aplicação em Processos de Geração de Bioetanol

A busca por fungos filamentosos mesófilos e termófilos isolados a partir de diferentes ambientes, bem como processos de tratamento de resíduos, tais como a compostagem, representa uma estratégia apropriada na obtenção de enzimas microbianas, devido às elevadas temperaturas a que tais processos ocorrem. Além disso, são habitats promissores no que se refere à recuperação de micro-organismos com potenciais e capacidades metabólicas de interesse. O presente estudo investigou o potencial enzimático de fungos isolados da compostagem de torta de filtro (subproduto do processamento da cana-de-açúcar) acrescida de amostras de solo da Mata Atlântica e/ou resíduos de podas triturados com o interesse de detectar e avaliar a atividade enzimática de hidrolases e oxidorreduções, para aplicação futura em processos de produção de etanol celulósico. Cerca de 200 linhagens fúngicas distintas (macro/microscopicamente) foram isoladas e submetidas a determinação de atividade celulolítica através do kit AZO-CM-Cellulose S-ACMC 04/07 (Megazyme®), para os testes de triagem da ação celulolítica. Nessa triagem inicial, 13 isolados foram selecionados como *hits* positivos: FPZ_SP3 01, SP3 05, SP3 47, SP3 72, SP3 74, SP3 75, SP3 91, SP2 121, SP1 129, SP1 135, SP1 141, SP1 148 e SP1 151. Tais fungos seguiram para novos ensaios enzimáticos visando a detecção e quantificação do complexo celulolítico ativo (ensaio FPase), bem como avaliação das atividades de ligninases, proteases, quitinases e mono-oxigenases. Os isolados selecionados também foram submetidos à análises de caracterização taxonômica, utilizando-se técnicas fenotípicas e moleculares. Os resultados obtidos no presente estudo sugeriram que os isolados SP3 01 (0,123 FPU/mL), SP3 75 (0,085 FPU/mL); SP3 74 e SP2 121 (0,084 FPU/mL), quando em condições de pH 4,8 foram eficientes produtores de enzimas celulolíticas. Com relação à atividade proteolítica, três isolados (SP3 01, SP3 72 e SP1 135) foram selecionados, sugerindo a presença de metalo proteases e serino proteases. Quanto à atividade quitinolítica, 12 isolados demonstraram atividades enzimáticas promissoras para exoquitinase, quitobiosidase e endoquitinase. No âmbito de óxido-redutases, foi possível identificar quatro isolados SP3 47, SP3 75, SP1 129 e SP1 141 com atividade ligninolítica. O isolado SP3 05 foi selecionado com atividade de mono-oxigenase induzida pela presença de HPAs (hidrocarbonetos poliaromáticos). No que tange à caracterização dos isolados, as técnicas fenotípicas e moleculares permitiram a identificação taxonômica de *Aspergillus niger* (SP3 01), *Mucor* sp. (SP3 47), *Aspergillus niger* (SP3 74), *Trichoderma koningii* (SP3 75), *Geotrichium candidum* (SP3 91), *Byssoschlamys nivea* (SP1 129), *Paecilomyces saturatus* (SP1 141), *Aspergillus fumigatus* (SP1 148) e *Aspergillus fumigatus* (SP1 151). Dessa forma, os isolados da compostagem de torta de filtro mostraram-se eficientes produtores de enzimas hidrolíticas e oxidativas de interesse à futura aplicação em processos de re-utilização de resíduos lignocelulósicos, visando à produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: Ligninases. Celulases. Mono-oxigenases. Compostagem. Proteases.

ABSTRACT

Enzymatic Activity of Filamentous Fungi Geared to Application in Bioethanol Generation Processes

The search for mesophilic and thermophilic filamentous fungi isolated from various environments, as well as waste treatment processes such as composting, represents an appropriate strategy to obtain microbial enzymes, due to the high temperatures at which such processes occur. Furthermore, habitats are promising as regards the recovery of micro-organisms and with potential metabolic capacities of interest. This study investigated the enzyme potential of fungi isolated from the filter cake compost (by-product of the processing of sugarcane) plus soil samples from the Atlantic Forest and / or pruning waste ground in the interest of detecting and evaluating the enzymatic activity of hydrolases and oxidoreductases, for future use in cellulosic ethanol production processes. Approximately 200 different fungal strains (macro / microscopically) were isolated and subjected to determination of cellulolytic activity using the kit AZO-CM-Cellulose S-ACMC 04/07 (Megazyme®) for screening tests of cellulolytic action. In this initial screening, 13 isolates were selected as positive hits: FPZ_SP3 01, SP3 05, SP3 47, SP3 72, SP3 74, SP3 75, SP3 91, SP2 121, SP1 129, SP1 135, SP1 141, SP1 148 and SP1 151. Such fungi followed for new enzymatic assays aimed at the detection and quantification of the active cellulolytic complex (FPase test) as well as evaluation of ligninases activities, proteases, chitinases and mono-oxygenase. The selected isolates were also subjected to taxonomic characterization analyzes, using phenotypic and molecular techniques. The results obtained in this study suggested that the isolated SP3 01 (0.123 FPU /ml), SP3 75 (0.085 FPU /ml); SP3 74 and SP2 121 (0.084 FPU /ml), when the pH conditions are 4.8 efficient producers of cellulolytic enzymes. With regard to the proteolytic activity, three isolates (SP3 01, SP3 72 and SP1 135) were selected, suggesting the presence of metallo proteases and serine proteases. As for chitinolytic activity, 12 isolates demonstrated promising enzyme activities for exochitinase, quitobiosidase and endochitinase. Under-oxide reductase, it was possible to identify four isolates SP3 47, SP3 75, SP1 129 and SP1 141 with ligninolytic activity. The isolated SP3 05 was selected with mono-oxygenase activity induced by the presence of PAHs (polyaromatic hydrocarbons). Regarding the characterization of isolates, the phenotypic and molecular techniques allowed the taxonomic identification of *Aspergillus niger* (SP3 01), *Mucor* sp. (SP3 47), *Aspergillus niger* (SP3 74), *Trichoderma koningii* (SP3 75), *Geotrichium candidum* (SP3 91) *Byssoschlamys nivea* (SP1 129), *Paecilomyces saturatus* (SP1 141), *Aspergillus fumigatus* (SP1 148) and *Aspergillus fumigatus* (SP1 151). Thus, isolated from the filter cake compost were efficient producers of hydrolytic enzymes and oxidative of interest to future enforcement in re-use of lignocellulosic waste processes to the production of second generation ethanol.

Keywords: Ligninases. Cellulases. Mono-oxygenases. Composting. Proteases.

LISTA DE ABREVIATURAS

ε	Coeficiente de extinção
λ	Comprimento de onda
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
ΔA	Diferença entre a absorbância final e a inicial
μL :	Microlitro
μmol	Micromol
Abz	Ácido orto-aminobenzóico
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato
BKG	Ágar acrescido de guaiacol
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
DNA	Desoxirribonucleotídeo
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E-64	Trans-epoxisuccinil- L - leucinamida - 4- guanidina butano
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência
FLU	Fluorescência
FPase	Atividade de Papel de Filtro
FPU/mL	Unidade de papel de filtro por mililitro
FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo

g	Grama
GH61	Glicosidase Hidrolase
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
HTS	Triagem rápida de alto desempenho
HPA	Hidrocarboneto poliaromático
INFAR	Instituto Nacional de Farmacologia
ITS	Espaço Transcrito Interno
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
L	Litro
Lac	Lacase
LEMI	Laboratório Especial de Micologia
LiP	Lignina peroxidase
LPMOs	Mono-oxigenases Líticas de Polissacarídeo
ME3%	Caldo extrato de malte 3%
MEA	Ágar extrato de malte
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mili litro
mM	Mili molar
mMmin ⁻¹	Mili molar por minuto
MnP	Manganês peroxidase
MYE	Caldo extrato de malte e levedura
NaOH	Hidróxido de sódio

nm	Nanômetro
<i>P. chrysosporium</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol/μL	Picomol por microlitro
PPG-CTS	Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade
PDA	Ágar dextrose batata
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
Q-EDDnp	Glutamina-N-2,4-dinitrofenil-etileno diamino
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio
t	Tempo
TAE	Tampão Tris acetato EDTA
<i>T. harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
Tris	Amino - 2 - hidroximetil - propano - 1,3 – diol
<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
U/mL	Unidade de atividade por mililitro
U/L	Unidade de atividade por litro
UNIFESP/EPM	Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina
UPCO	Unidade de Produção de Composto Orgânico
UV/VIS	Ultravioleta visível
V	Volume
YES	Ágar extrato de levedura e sacarose

4-MU-GlcNac	4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide
4-MU-(GlcNAc) ₂	4-methylumbelliferyl β -D-N,N'-diacetylchitobiose hydrate
4-MU-(GlcNAc) ₃	4-methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Emprego de consórcios enzimáticos, bem como linhagens na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, o qual é convertida em açúcares fermentáveis gerando o bioetanol.....22
- Figura 2.** Percentual de celulose, hemicelulose e lignina constituintes da biomassa lignocelulósica (Adaptado de Fuentes-Hernández et al., 2013, 06p).....23
- Figura 3.** Estrutura e caracterização química da biomassa lignocelulósica que consiste em cadeias lineares de celulose e ramificadas de hemicelulose envolvidas em uma matriz de lignina (Adaptado de Santos et. al., 2012; Manavalan et. al., 2015).....28
- Figura 4.** Estrutura química do monômero quitina (subunidades de N-acetil-D-glucosamina), cujo arranjo das cadeias pode originar dois tipos: α -quitina (anti-paralelas) ou em β -quitina (paralelas) (Adaptado de Seidl, 2008).....36
- Figura 5.** Ilustração da degradação enzimática de celulose. Abreviações: EG, endoglucanase; CBH, celobiohidrolase; CDH, celobiose-desidrogenase; CBM, módulo carboidrato-ligante. Notar que muitos sistemas enzimáticos celulolíticos têm múltiplas EGs e /ou CBHs que podem agir em diferentes partes do substrato, diferindo em termos de cristalinidade e acessibilidade. A figura também mostra uma oxigenase GH61 podendo gerar produtos ótimos para CBH2 e CBH1, respectivamente. A ação combinada das enzimas oxidantes C1 e C4 podem produzir celu-oligossacarídeos nativos a partir do centro da cadeia de celulose. A possível consequência da ação de GH61 é ilustrada no canto inferior esquerdo da figura, onde novos pontos de ataque por CBHs são indicados por setas (Adaptado de Horn et al., 2012).....38
- Figura 6.** Curva padrão de glicose 1mg/mL para determinar a liberação de glicose durante o ensaio de PFase em ambos os pHs..... 50
- Figura 7.** Curva padrão de solução de índigo 0,05-0,25mM para determinar a transformação de indol ao composto índigo durante o ensaio quantitativo para mono-oxigenases.....54
- Figura 8.** Atividade total de celulasas em unidades de papel de filtro por mililitro (FPU/mL) em pH 4,8 e 7,4; resultados obtidos a partir da média de triplicatas dos valores de absorbância no comprimento de onda 540 nm nos respectivos pHs, dados com erro padrão.....67
- Figura 9.** 69Determinação de atividade relativa proteolítica, obtida a partir da quantificação da média dos valores de fluorescência de triplicatas em três pHs, dados com erro padrão.....68

- Figura 10.** Efeito de diferentes tipos de inibidores na atividade proteolítica do isolado SP3 01, cuja protease foi inibida completamente pelos inibidores O-fenatrolina e EDTA em pH alcalino, atividade relativa obtida através da média de triplicatas.....69
- Figura 11.** Efeito de diferentes tipos de inibidores na atividade proteolítica do isolado SP3 72, cuja protease foi inibida completamente pelos inibidores O-fenatrolina e EDTA em pH ácido, atividade relativa obtida através da média de triplicatas.....70
- Figura 12.** Efeito de diferentes tipos de inibidores na atividade proteolítica do isolado SP1 135, cuja protease foi inibida completamente pelo inibidor PMSF em pH alcalino, atividade relativa obtida através da média de triplicatas.....70
- Figura 13.** Atividade quitinolítica obtida a partir da quantificação da fluorescência (média de duplicatas) emitida após a hidrólise dos substratos fluorogênicos, e como parâmetro o controle positivo (enzima) da linhagem *Trichoderma viride*.....76
- Figura 14.** Crescimento do fungo em meio ágar BKG acrescido do substrato guaiacol, o qual foi oxidado por enzimas ligninolíticas. O reverso da placa apresenta cor acastanhada ao redor da colônia, indicativo para a produção de enzimas ligninolíticas.....74
- Figura 15.** A atividade enzimática para LiP, MnP e Lac foram obtidas a partir da média dos valores (triplicatas), como controle positivo foi adotada a linhagem *Fusarium spp.* enquanto o controle negativo é o meio reacional sem inóculo.....78
- Figura 16.** Concentração de índigo em mM/min estimada através da média de triplicatas dos valores de absorbância no comprimento de onda 610 nm, a concentração foi calculada a partir da equação da reta obtida por meio da curva padrão de índigo.....81
- Figura 17.** Identificação taxonômica dos isolados de interesse utilizados nos ensaios de atividade enzimática.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor mínimo, médio e máximo de nutrientes, cinzas e matéria orgânica como constituintes da torta de filtro, valores expressos em grama na matéria seca a 80 °C (Nardin, 2007).....	26
Tabela 2. Componentes da reação de amplificação de DNA e seus respectivos volumes. Os primers foram diluídos 10X e o <i>Master Mix</i> ® (PROMEGA, EUA) contém (Taq polimerase, desoxinucleotídeos, cloreto de magnésio e tampão tris).....	60
Tabela 3. Dados da literatura para atividade enzimática de LiP, MnP e Lac em diferentes meios de cultivo: extrato de malte 0,5% suplementado com farelo de trigo 1% (ME0,5%+FT1%); extrato de malte 2% (ME2%); extrato de malte 2% acrescido de água marinha artificial (ME2%+AM); extrato de malte 0,5% + sais minerais (ME0,5%+SM) e extrato de malte 3% (ME3%). (*) Presente estudo.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação de enzimas conforme a reação catalisada (Lehninger, 2000).....	30
Quadro 2. Resumo das atividades enzimáticas dos isolados de interesse.....	83

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE QUADROS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Etanol	21
2.2. Compostagem	24
2.3. Torta de filtro como substrato microbiano	25
2.4. Fungos degradadores de lignocelulose.....	27
2.5. Enzimas.....	31
2.5.1. Enzimas Hidrolíticas	32
2.5.1.1. Celulases.....	33
2.5.1.2. Proteases	34
2.5.1.3. Quitinases	36
2.5.2. Óxido-redutases	38
2.5.2.1. Ligninases	39
2.5.2.2. Mono-oxigenases	39
2.6. Contextualização do Estudo.....	40
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4. FLUXOGRAMA.....	46
4.1. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.2. Isolados Fúngicos.....	47
4.3. Determinação das atividades enzimáticas de interesse	48
4.3.1 Atividade Celulolítica	48
4.3.1.1. Triagens para a detecção da atividade celulolítica.....	48
4.3.1.2. Confirmação da Atividade Celulolítica - Ensaio Atividade de Papel de Filtro (FPase).....	48
4.3.2. Detecção da Atividade de Proteases.....	51
4.3.3. Atividade Quitinolítica	52
4.3.4. Atividade de Ligninases.....	53
4.3.4.1. Triagem em Guaiacol	53

4.3.4.2. Qualificação e Quantificação da Atividade Ligninolítica	54
4.3.5. Atividade de Mono-oxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs)	56
4.4. Caracterização de Proteases	57
4.5. Caracterização Fenotípica dos Isolados de Interesse	58
4.6. Caracterização Molecular dos Isolados de Interesse	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. Atividade Enzimática dos Fungos Filamentosos de Interesse	66
5.1.1. Atividade Celulolítica	66
5.1.2. Atividade Proteolítica	68
5.2. Caracterização de Proteases	70
5.1.3. Atividade Quitinolítica	73
5.1.4. Atividade Ligninolítica	76
5.1.4.1. Triagem Inicial para atividade ligninolítica	76
5.1.4.2. Detecção de enzimas ligninolíticas	78
5.1.5. Atividade de Mono-oxigenases	81
5.3. Caracterização Fenotípica e Molecular dos Isolados de Interesse	83
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
8. APÊNDICE	104
8.1. APÊNDICE A	104
8.2. APÊNDICE B	105
8.3. APÊNDICE C	106
8.4. APÊNDICE D	107
8.5. APÊNDICE E	108
8.6. APÊNDICE F	109

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A demanda industrial/biotecnológica por enzimas incentiva a busca por novas linhagens microbianas em ambientes poucos explorados como oceanos, solos e regiões extremas como o continente antártico entre outros (Passarini 2012; O'Brien *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009).

Nesse contexto, a bioprospecção de micro-organismos em células de compostagem de resíduos orgânicos torna-se um micro-ambiente muito promissor a vida microbiana com potenciais e capacidades metabólicas de interesse. Tal processo de conversão de substratos orgânicos ocorre a partir da biomassa de micro-organismos que se encontram presentes, ou é gerada no decorrer do processo.

A diversidade microbiana muda em cada etapa da compostagem, têm-se a presença de diferentes organismos em distintas temperaturas a) *criofílicos* adaptados a baixas temperaturas, b) *mesofílicos* tolerantes a temperaturas de 40°C e c) *termofílicos* condicionados a temperatura entre 40 °C a 70 °C (Beck-Friis *et al* 2001; Chroni *et al* 2009). A sobreposição de organismos mesofílicos e termofílicos presentes na compostagem produz diferentes classes de enzimas (celulases, xilanases e proteases) que juntas atuam efetivamente na degradação do substrato (Sneh *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2009; Hubbe *et al.*, 2010).

A temperatura é o fator que mais influencia no desenvolvimento microbiano, promovendo alterações das biomoléculas e na manutenção das estruturas biológicas (Gomes *et al.*, 2007). A capacidade de adaptação microbiana às condições termofílicas tem despertado interesse de muitos pesquisadores na busca

por enzimas termoestáveis. O conhecimento da ampla diversidade e a compreensão da sucessão ecológica microbiana é essencial para estudos de bioprospecção de enzimas com aplicação industrial, bem como a obtenção de metabólitos de interesse. Nesse sentido, é importante aprimorar as etapas dos processos de compostagem, favorecendo comunidades microbianas, bem como o isolamento de microrganismos potenciais produtores de enzimas (Beck-Friis *et al* 2001; Chroni *et al* 2009).

Nesse sentido, no âmbito da FPZSP foram construídas duas células de compostagens, tendo torta de filtro como substrato, bem como resíduos de poda triturados e/ou amostras de solo da Mata Atlântica, sendo uma estratégia muito promissora na busca por fungos com potencial atividade hidrolítica e oxidativa, hábeis em sintetizar enzimas com futura aplicação em processos de geração de bioetanol.

A produção do etanol convencional ocorre por meio da fermentação do caldo da cana-de-açúcar (hexoses) utilizando-se a enzima invertase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que promove a quebra da sacarose em glicose e frutose açúcares que serão convertidos em etanol e CO₂ pela enzima zimase. Já o etanol de segunda geração obtido a partir da hidrólise da biomassa, necessita de linhagens/consórcios enzimáticos promotores da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, ou seja, a quebra de moléculas de celulose, hemicelulose e lignina em açúcares (hexoses e pentoses) os quais serão fermentados e convertidos em etanol.

No entanto, a fermentação de pentoses ainda é uma tecnologia que não foi completamente dominada em escala industrial, em decorrência do alto custo

envolvido nas técnicas para a completa hidrólise da biomassa em açúcares fermentáveis. Assim, inserem-se um conjunto de enzimas, tais como as celulasas, proteases, quitinases, ligninases e mono-oxigenases com a finalidade de viabilizar a degradação da biomassa lignocelulósica, cujos os açúcares poderão ser fermentados obtendo-se o etanol de segunda geração.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etanol

A produção convencional de etanol é realizada pela fermentação do caldo da cana-de-açúcar pela reação química catalisada por enzimas produzidas por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), através da quebra da molécula de sacarose em glicose e frutose (enzima invertase) e posterior transformação em etanol e gás carbônico (enzima zimase). A reação global é: $C_{12}H_{22}O_{11(aq)} + H_2O_{(l)} \rightarrow 4C_2H_6O_{(aq)} + 4CO_{2(g)}$ (Peixoto *et al.*, 2012).

No Brasil, a produção de etanol é realizada exclusivamente por técnicas de primeira geração, através da fermentação da sacarose. Entretanto, se as outras partes da planta da cana-de-açúcar fossem utilizadas na produção do etanol, o país aumentaria o rendimento na produção deste combustível e reduziria a necessidade do uso de terra para o cultivo (Gray, 2006). Deste modo, é estrategicamente viável a utilização de micro-organismos produtores de enzimas na realização da hidrólise de todos os polissacarídeos (pentoses e hexoses) encontrados neste material ligninocelulósico, em etanol.

Em muitos países, incluindo Estados Unidos, Canadá e China, a matéria-prima comumente utilizada na produção de etanol é o amido de milho. Este material apresenta um elevado conteúdo protéico (10-13%) e, as leveduras utilizadas na produção de etanol são incapazes de metabolizar proteínas solúveis. Nos dias atuais, poucas pesquisas têm sido realizadas, enfatizando a utilização de proteases ácidas na produção de etanol, mesmo tendo em mente que, proteases ácidas

poderiam viabilizar a sacarificação (processo de hidrólise de um carboidrato complexo em monossacarídeos), lisando as partículas de amido, produzindo assim, aminoácidos que são fontes de nutrientes bem como aceleradores da fermentação (Guo *et al.*, 2011). Em 2011, Guo e colaboradores, clonaram o gene *Asp* que codifica a protease aspártica de *Neurospora crassa*, em uma linhagem de *S. cerevisiae* que produz etanol industrialmente através da hidrólise enzimática de amido cru. Com este trabalho, os autores puderam concluir que houve a expressão da protease ácida como também ocorreu um aumento no rendimento teórico (98-99%), com uma produção de 50,2- 50,5 g de etanol por 100 g de açúcar. Vale ressaltar que o rendimento teórico ótimo para uma linhagem de levedura é em torno de 93-95%.

No contexto da produção de bioetanol celulósico, obtido a partir da hidrólise enzimática da biomassa, linhagens e/ou consórcios enzimáticos são necessários para a quebra de moléculas de celulose, hemicelulose e lignina em açúcares (hexoses e pentoses) os quais serão fermentados e convertidos em bioetanol (Figura 1).

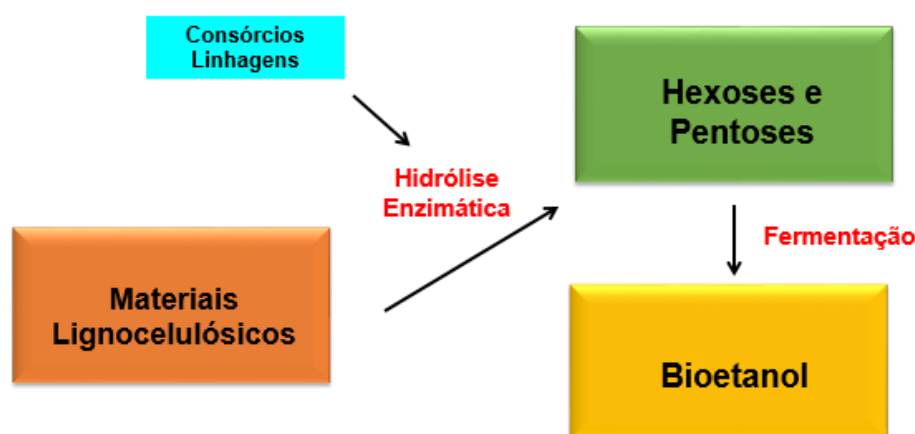


Figura 1. Emprego de consórcios enzimáticos, bem como linhagens na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, o qual é convertida em açúcares fermentáveis gerando o bioetanol. (Fonte: O Autor)

A fim de otimizar a produção de bioetanol, o aproveitamento integral da cana-de-açúcar (bagaço e outros resíduos) poderá aumentar o rendimento da produção de etanol celulósico a partir de matérias-primas lignocelulósicas (**Figura 2**).

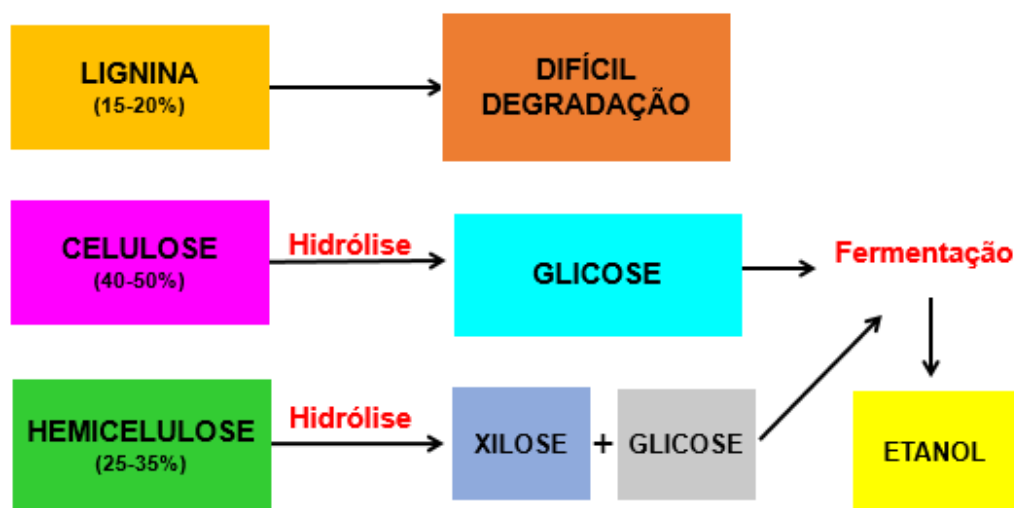


Figura 2. Percentual de celulose, hemicelulose e lignina constituintes da biomassa lignocelulósica (Adaptado de Fuentes-Hernández et al., 2013, 06p).

Portanto, temos diferentes complexos enzimáticos atuantes, incluindo hidrolases como as celulases que atuam com especificidade e sinergicamente sobre a celulose, bem como também as xilanases que clivam as ligações glicosídicas entre os monômeros de xilose, um dos constituintes da hemicelulose (Sanchez, 2009; Dionisi et al., 2014; Gutiérrez-Rojas et al., 2015; Gutiérrez-Rojas et al., 2015; Horn et al., 2012; Ângelo, 2010, Xião et al., 2004). Há também proteases que podem hidrolisar o conteúdo protéico de substratos como o milho (7-14 %) e o trigo (11-15 %) (Wayman e Parekh. 1990) e quitinases as quais podem ser empregadas na hidrólise de plantas. Além dessas enzimas, tal processo também pode ser incrementado por óxido-redutases como as ligninases que oxidam a lignina e as mono-oxigenases que promovem a clivagem oxidativa da celulose cristalina.

2.2. Compostagem

A compostagem caracteriza-se como um processo de conversão de substratos orgânicos a partir da biomassa de micro-organismos que se encontram presentes, ou é gerada no decorrer do processo. Ocorre pela oxidação dos resíduos orgânicos gerando um produto final estável e rico em matéria orgânica, o qual poderá ser aplicado como biofertilizante ou substrato para a produção de cogumelos ou biogás (Peters *et al.*, 2000).

É vasta a literatura que trata sobre o emprego da compostagem como um método utilizado por muitos municípios no tratamento de resíduos sólidos urbanos (Atkinson *et al.*, 1996; Beffa *et al.*, 1996; Herrmann & Shann 1997; Ryckeboer *et al.*, 2003).

Tratando-se dos diferentes contextos em que a técnica de compostagem é aplicada, verifica-se que a diversidade microbiológica muda significativamente em cada etapa do processo. Assim, a compostagem pode ser dividida em um processo de três fases, as quais são determinadas pelas temperaturas e micro-organismos presentes: a) mesofílica: temperatura atingindo até 40 °C, com crescimento de bactérias e fungos mesófilos; b) termofílica: caracterizada pelo aumento da temperatura entre 40 °C a 70 °C, com o crescimento de actinobactérias, bactérias e fungos termófilos; e c) criofílica: caracterizada por baixas temperaturas, onde pode-se encontrar nematóides, formigas, miriápodes, vermes, insetos e demais organismos presentes naturalmente no solo (Beck-Friis *et al.*, 2001; Chroni *et al.*, 2009; McKinley & Vestal, 1985).

A sobreposição de organismos mesofílicos e termofílicos presentes na compostagem produz diferentes classes de enzimas (celulases, xilanases e

proteases) que juntas atuam efetivamente na degradação do substrato (Sneh *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2009; Hubbe *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos da literatura descrevem também sobre a diversidade microbiana associada a processos de compostagem (Fracchia *et al.*, 2006; Grisolli *et al.*, 2009). Peters e colaboradores (2000) relatam sobre a microbiota associada a este processo, ressaltando sobre a importância do monitoramento das diferentes comunidades microbianas que acompanham as etapas de uma compostagem.

O conhecimento desta ampla diversidade e o entendimento sobre a sucessão ecológica microbiana é de fundamental importância em estudos que visem a bioprospecção de enzimas de interesse industrial bem como na estruturação de coleções de micro-organismos que objetivem a futura aplicação biotecnológica dos mesmos. Esta importância vem da necessidade do aprimoramento das etapas dos processos de compostagem onde, ao entendermos as alterações em suas propriedades bem como da comunidade microbiana, podemos direcionar o isolamento de grupos taxonômicos específicos, que poderá ser responsável pela produção das enzimas de interesse ambiental e/ou industrial (Beck-Friis *et al.*, 2001; Chroni *et al.*, 2009).

2.3. Torta de filtro como substrato microbiano

A utilização da torta de filtro (a qual é um subproduto gerado durante o processamento da cana-de-açúcar) representa uma potencial geração de nichos promissores no que se refere à obtenção de micro-organismos eficientes quanto à atividade lignocelulolítica, bem como proteolítica.

A torta de filtro, por definição, corresponde ao composto de bagaço da cana-de-açúcar triturado e lodo da decantação, ambos provenientes do processo de

clarificação do açúcar ou filtração do caldo extraído da cana moída. Quanto à sua composição, apresenta elevado teor de umidade, matéria orgânica, fósforo, cálcio, magnésio e nitrogênio (Nardin, 2007; Almeida Junior *et al.*, 2011; Schneider, *et al.*, 2012). A (**Tabela 1**) apresenta o teor dos constituintes da torta de filtro, portanto, sua composição química é variável e depende de fatores como tipo de solo, variedade da cana, processo de clarificação e maturação (Nardin, 2007; Almeida Junior *et al.*, 2011; Rocha, 2013).

Tabela 1. Teor mínimo, médio e máximo de nutrientes, cinzas e matéria orgânica como constituintes da torta de filtro, valores expressos em grama na matéria seca a 80 °C

Componentes	Teor na Matéria Seca a 80 °C (g/100g ⁻¹)		
	Mínimo	Médio	Máximo
N	0,9	1,45	2,7
P ₂ O ₅	0,45	1,11	1,92
K ₂ O	0,3	0,7	1,49
CaO	2,35	5,25	8,45
MgO	0,29	0,52	0,8
S	0,65	1,44	2,05
Cinzas	12	18,37	27,73
Matéria Orgânica	72,27	81,7	88

Fonte: Nardin, 2007.

Nesse contexto, a torta de filtro pode ser utilizada como biofertilizante em plantações de cana-de-açúcar (Koffler e Donzelli, 1987; Nardin, 2007). Tem potencial a contribuir como adubo orgânico no incremento de nutrientes e matéria orgânica no solo, aumentando a atividade dos micro-organismos, e conseqüentemente no desenvolvimento da planta (Rocha, 2013). Além disso,

também diminui ou elimina o aporte de adubo químico nas plantações de cana-de-açúcar (Santos *et al.*, 2012; Schneider *et. al.*, 2012).

2.4. Fungos degradadores de lignocelulose

Os fungos são seres eucarióticos, uni ou multicelulares e quimio organotróficos que habitam diferentes ambientes (Madigan; Martinko; Parker, 2010). São de grande importância para a ciclagem de matéria orgânica no solo e também pela produção de metabólitos de interesse como antibióticos, pigmentos, ácidos orgânicos e enzimas com aplicações industriais e biotecnológicas (Esposito & Azevedo, 2010).

Além disso, os fungos são eficientes decompositores de inúmeros substratos como a biomassa lignocelulósica, compostos aromáticos, corantes e metais (Sanchez, 2009; Silva & Esposito, 2010). O metabolismo fúngico libera enzimas extracelulares sobre o substrato, cuja hidrólise possibilita a absorção dos nutrientes pelo fungo (Silva & Esposito, 2010; Aguiar & Ferraz, 2011). A capacidade do fungo em assimilar compostos mais simples a partir de substratos complexos depende da sua habilidade a produzir enzimas que degradam o substrato (Tuomela *et. al.*, 2000; Menezes *et. al.*, 2009; Sanchez, 2009).

A biomassa lignocelulósica é um material abundante na Terra, componente de plantas e pouco aproveitado, constituindo resíduos da agricultura, floresta, indústrias e compostos orgânicos de municípios (Louime & Uckelmann, 2008; Sanchez, 2009; Aguiar & Ferraz, 2011; Dionisi *et al.*, 2014). É formada pela associação de três polímeros celulose, hemicelulose e lignina, além de pectina e proteínas (**Figura 3**) (Manavalan *et. al.*, 2015). A proporção desses compostos varia entre as espécies de plantas, perfazendo 40-50% de celulose, 25-35% de

hemicelulose e 15-20% de lignina (Menezes *et al.*, 2009; Aguiar e Ferraz, 2011; Fuentes-Hernández *et al.*, 2013).

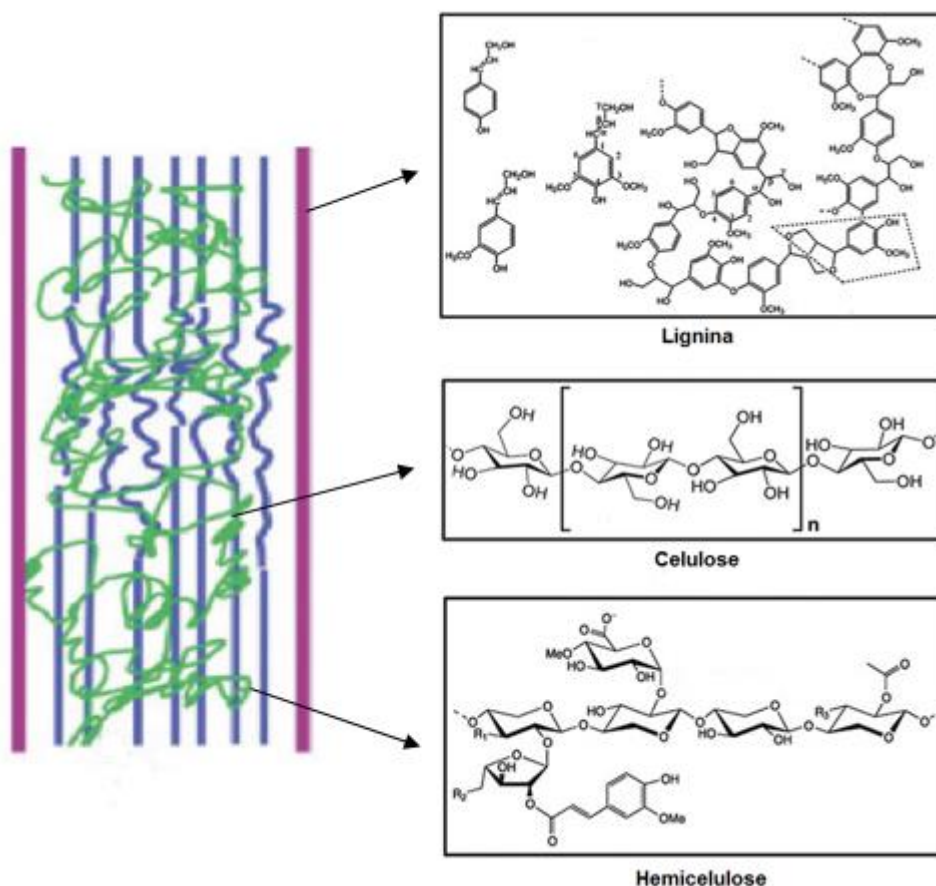


Figura 3. Estrutura e caracterização química da biomassa lignocelulósica que consiste em cadeias lineares de celulose, além de cadeias ramificadas de hemicelulose, envolvidas em uma matriz de lignina (Adaptado de Santos *et al.*, 2012; Manavalan *et al.*, 2015).

A celulose é um homopolímero linear, constituído por monômeros de glicose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas. As moléculas de celulose formam “microfibrilas cristalinas interligadas por ligações de hidrogênio”, cuja estrutura apresenta uma região cristalina e outra amorfa (Aguiar & Ferraz, 2011). A região cristalina confere à celulose alta tensão e resistência, o que dificulta a acessibilidade de enzimas, e conseqüentemente sua degradação (Ryu e Mandels, 1980; Louime e Uckelmann, 2008; Sanchez, 2009; Galvagno e Forchiassin, 2010).

Já a hemicelulose é um heteropolímero ramificado composto de açúcares como pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose), ácido acético e urônico (Galvagno e Forchiassin, 2010; Aguiar e Ferraz, 2011). Esse polissacarídeo encontra-se associado à celulose através de pontes de hidrogênio e à lignina por meio de ligações covalentes (Galvagno e Forchiassin, 2010). A lignina consiste em unidades de fenil propano (álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico) “formando uma matriz amorfa, junto à celulose e hemicelulose através de ligações covalentes” e de difícil degradação (Galvagno e Forchiassin, 2010; Santos *et al.*, 2012; Manavalan *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a diversidade estrutural do substrato requer diferentes enzimas como hidrolases e oxidases, as quais atuam no processo de degradação do polímero lignocelulose. Os fungos que conseguem metabolizar polissacarídeos da celulose e hemicelulose são denominados como fungos de podridão marrom “*brown-rot fungi*”, enquanto os degradadores de lignina são os fungos de podridão branca “*white-rot fungi*”. Aqueles que conseguem assimilar lignina e polissacarídeos são os fungos de podridão macia “*soft-rot fungi*” (Sanchez, 2009; Aguiar e Ferraz, 2011).

Os fungos de podridão branca conseguem mineralizar, eficientemente, a lignina a CO₂ e água, em um período muito curto de tempo se comparados aos fungos de podridão macia, devido à alta atividade oxidativa e baixa especificidade das enzimas ligninolíticas, como a lacase que oxida o átomo de carbono em diferentes posições no substrato (Sanchez, 2009; Durán, 2010; Galvagno e Forchiassin, 2010; Aguiar e Ferraz, 2011).

Nesse sentido, o organismo modelo utilizado nos estudos de ligninólise desde os anos 80 é a linhagem *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk, 1987; Farrell *et*

al., 1989; Sanchez, 2009; Galvagno e Forchiassin, 2010). Tal organismo “é causador de podridão branca, degrada rapidamente a lignina e tem temperatura ótima de crescimento entre 37 °C a 40 °C” (Galvagno e Forchiassin, 2010). Com base nesses estudos, a biodegradação de lignina demanda por enzimas ligninolíticas extracelulares, decorrentes do metabolismo secundário (Galvagno e Forchiassin, 2010; Ferraz, 2010). Nos últimos anos, outros fungos vêm sendo relatados como decompositores de lignina *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Picnoporus cinnabarium* e *Ganoderma* spp. (Eggert, 1997; Menezes *et al.*, 2009; Sanchez, 2009; Lee *et al.*, 2010; Dionisi *et al.*, 2014).

Tratando-se da celulose, bactérias e fungos são capazes de metabolizar esse polímero, para tanto, o complexo celulolítico atua com especificidade e sinergicamente sobre o substrato (Sanchez, 2009; Dionisi *et al.*, 2014; Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Horn *et al.*, 2012; Ângelo, 2010, Xião *et al.*, 2004). No tocante à biodegradação de hemicelulose, têm-se um complexo de enzimas (endo/exo hemicelulases) muito semelhantes ao complexo celulolítico. As xilanases clivam as ligações glicosídicas entre os monômeros de xilose, assim como as mananases que atuam entre os monômeros de manose, liberando dímeros, os quais serão convertidos em xilose e manose por β -xilosidase e β -manosidases respectivamente (Ferraz, 2010; Aguiar e Ferraz, 2011).

Diante do exposto, as recentes pesquisas nessa área buscam selecionar organismos com habilidade para degradar efetivamente a biomassa lignocelulósica. Os fungos são potenciais produtores de enzimas hidrolíticas e oxidativas, e o emprego desses biocatalisadores pode viabilizar processos de produção de etanol de segunda geração. Para tanto, é primordial estudos que visem prospectar

enzimas/consórcios enzimáticos com alto rendimento no processo de hidrólise de lignocelulose.

2.5. Enzimas

As enzimas são biocatalisadores de natureza protéica que aceleram as reações bioquímicas nos organismos (Lehninger, 2000). Têm importante papel nos processos biológicos (reprodução, metabolismo e sobrevivência) quanto em processos biotecnológicos (Coelho *et al.*, 2008). Além disso, são altamente específicas e seletivas quanto à sua função. Podem ser intracelulares quando produzidas no interior das células, sendo constituintes do metabolismo e extracelulares quando são liberadas no ambiente externo hidrolisando substratos que serão absorvidos como fonte de energia (Lehninger, 2000; Ângelo, 2010).

Diversos organismos são fontes de enzimas como vegetais (bromelina), micro-organismos (invertase) e animais (pepsina). As enzimas de fonte microbiana são robustas e versáteis, obtidas a partir de organismos selecionados e adaptados a condições de estresse ambiental, sendo preferencialmente utilizados em processos de produção de enzimas em escala industrial (Ângelo, 2010).

A classificação das enzimas segue a nomenclatura da IUBMB que são agrupadas de acordo com a reação que catalisam (**Quadro 1**) (Coelho *et al.*, 2008).

EC	Classes das Enzimas	Tipo de reação catalisada	Exemplo
1	Oxidoredutases	catalisam reações de transferência de elétrons, adicionando ou removendo hidrogênio	oxidases
2	Transferases	transferência de grupos funcionais entre moléculas doadoras e moléculas aceptoras.	quinases
3	Hidrolases	reações de hidrólise, transferência de grupos funcionais para a água	proteases
4	Liasas	adição de água, amônia ou dióxido de carbono a duplas ligações, ou remoção destes elementos para produção de duplas ligações.	descarboxilases
5	Isomerasas	catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos	cis-trans isomerase
6	Ligases	catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre às custas de energia (ATP).	sintetases

Quadro 1. **Classificação de enzimas conforme a reação catalisada (Lehninger, 2000).**

2.5.1. Enzimas Hidrolíticas

As enzimas hidrolíticas ou hidrolases promovem a clivagem hidrolítica de ligações C-O; C-N e C-C, e são uma classe importante tanto do ponto de vista biológico (transformação de açúcares, gorduras e proteínas) quanto em aplicações industriais de detergentes, têxtil, clarificação de suco, vinhos e cervejas, polpa e papel, medicamentos, tratamento de couro e processamento de alimentos (Ângelo, 2010).

2.5.1.1. Celulases

As celulases hidrolisam o polímero celulósico, e tais hidrolases representam um complexo celulolítico, constituído de endo/exo glucanases e β -glucosidases que atuam sinergicamente na hidrólise da celulose (Sanchez, 2009; Dionisi *et al.*, 2014; Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Horn *et al.*, 2012; Ângelo, 2010, Xião *et al.*, 2004).

A endoglucanase conhecida como endo-1,4- β -D-glucano-4-glucano hidrolase (EC 3.2.1.4) hidrolisa aleatoriamente a estrutura amorfa da celulose, liberando celobiose e glicose. Enquanto as exoglucanases atuam a partir de extremidades, liberando oligossacarídeos, sendo caracterizadas como glucano hidrolase ou 1,4- β -D-glucano-glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) e celobiohidrolase ou 1,4- β -D-glucano-celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91), ainda divididas em celobiohidrolase 1 e 2 responsáveis pela hidrólise de extremidades redutoras e não redutoras respectivamente. Já a β -glucosidase ou β -D-glucosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21) faz a conversão de celobiose em glicose (Wang *et al.*, 2012; Castro & Pereira Jr., 2010; Ângelo, 2010).

A ação das celulases em conjunto favorece a completa degradação da celulose. Há três mecanismos de sinergia entre as hidrolases, sendo endo-exo onde as endoglucanases liberam terminais redutores e não redutores para as celobiohidrolase 1 e 2 respectivamente; exo-exo as quais celobiohidrolases atuam ao mesmo tempo nos terminais redutores e não redutores e exo- β -glucosidade onde as celobiohidrolases liberam celobiose, que serve de substrato para a β -glucosidase (Castro & Pereira Jr. 2010; Ângelo 2010; Bon *et al.*, 2008. O desempenho das

celulases é influenciado pelo tipo e tamanho do substrato, concentração enzimática e proporção entre as enzimas (Ângelo, 2010).

As celulases são sintetizadas por bactérias e dentre os gêneros relatados pela literatura têm-se *Cellulomonas* e *Thermobifida*, além de fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* e de actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Lynd *et al.*, 2002). No entanto, o potencial celulolítico de fungos ganhou notoriedade através dos estudos de Reese em meados dos anos 50, ao investigar a produtividade celulolítica elevada em *Trichoderma reesei*, tal organismo, tornou-se o modelo de estudo para celulases (Lynd *et al.*, 2002; Castro & Pereira Jr., 2010; Kubicek, 2013).

Nesse contexto, celulases fúngicas são empregadas em processos industriais, sendo a segunda classe de hidrolases mais comercializadas no mundo (Wang *et al.*, 2012; Castro e Pereira Jr., 2010; Ângelo, 2010). As celulases apresentam inúmeras aplicações, desde como incrementos em ração animal, quanto como insumo em processos de clarificação de sucos e de vinhos; no setor têxtil na degradação de fibras em tecidos, além da aplicação no processamento de papel e em detergentes. Atualmente, as celulases têm ganhado destaque nos processos de hidrólise da biomassa lignocelulósica (Palouvá *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2012; Castro & Pereira Jr., 2010).

2.5.1.2. Proteases

As proteases ou peptidases clivam ligações peptídicas em proteínas ou em fragmentos protéicos (Barrett *et al.*, 1998). Estão presentes em plantas, animais e micro-organismos (Vermelho *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 1998; Zanthorlin *et al.*, 2010). Em humanos participam das vias metabólicas, sinalização celular, desenvolvimento, diferenciação e imunidade (Barrett *et al.*, 1998). São agrupadas em exopeptidases,

hidrolisando os aminoácidos da extremidade N- ou C- terminal da cadeia polipeptídica e em endopeptidases, as quais atuam no interior da cadeia protéica (Ângelo, 2010).

Esse grupo de enzimas apresenta alta especificidade e seletividade, além da diversidade estrutural, sendo classificadas de acordo com o mecanismo de ação em serina, metalo, cisteína, treonina e ácido aspártico proteases por conta do resíduo de aminoácido no seu sítio ativo (Barrett *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 1998; Sanman e Bogyo, 2014). As serino proteases (EC 3.4.21) são ativas em pH alcalino elevado com ampla especificidade ao substrato, são encontradas em bactérias, fungos e leveduras. Enquanto, as metalo proteases (EC 3.4.24) necessitam de íon metálico divalente para serem ativas, são tolerantes a pH neutro/alcalino e perdem sua atividade enzimática na presença de agentes quelantes. Já as cisteíno proteases (EC EC 3.4.22) têm resíduos de aminoácidos cisteína e histidina no sítio ativo, e eficiência enzimática em pH neutro. As treonina proteases (EC 3.4.25), por sua vez, são pouco caracterizadas e as ácido aspártico proteases (EC 3.4.23) são ácidas (Rao *et al.*, 1998; Vermelho *et al.*, 2008;).

A principal fonte de proteases são os micro-organismos, sendo que as proteinases bacterianas podem ser neutras ou alcalinas (Ângelo, 2010; Rao *et al.*, 1998). Tratando-se das fúngicas, as mesmas podem ser ácidas, neutras e alcalinas, sendo descritas na literatura como expressas por espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicilium* (Morya *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2013), além de leveduras, tais como *Candida* spp e *Sacharomyces cerevisiae* (Reid *et al.*, 2012).

As proteases são amplamente utilizadas na indústria (Chouyyok *et al.*, 2005). O setor de detergentes utiliza proteases alcalinas como aditivo na formulação

de detergentes (Ângelo, 2010). Já o setor de laticínios emprega as peptidases como agente coagulante do leite em processos de fabricação de queijos (Ângelo, 2010; Hurley *et al.*, 2000). No setor de alimentos é utilizada para promover a hidrólise do glúten em pães e biscoitos (Lauer *et al.*, 2000); e também no processamento de carnes e embutidos (Yang *et al.*, 2000). Além disso, são úteis no tratamento do couro e de efluentes (Bajza & Vrcek, 2001).

2.5.1.3. Quitinasas

As quitinasas hidrolisam quitina, um homopolímero formado por monômeros N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (Patil *et al.*, 2000; Seidl, 2008). A quitina é o componente estrutural do exoesqueleto de insetos, nematoides, concha de crustáceos e da parede celular de fungos filamentosos (Googay, 1990; Dahiya *et al.*, 2006; Galante *et al.*, 2012; Brzezinska *et al.*, 2014). É um polímero insolúvel em água e cristalino, apresentando-se de duas formas conforme o arranjo das cadeias de GlcNAc, em α -quitina (anti-paralelas) ou em β -quitina (paralelas) (**Figura 4**) (Seidl, 2008; Aam *et al.*, 2010; Karthik *et al.*, 2014).

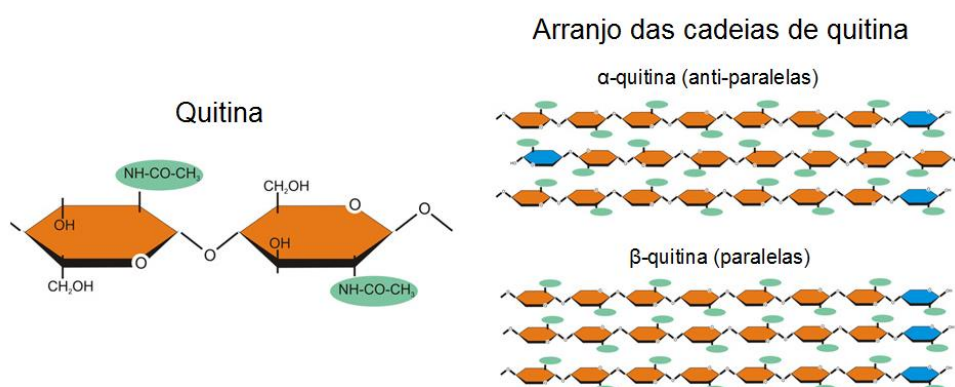


Figura 4. Estrutura química do monômero quitina (subunidades de N-acetil-D-glucosamina), cujo arranjo das cadeias pode originar dois tipos: α -quitina (anti-paralelas) ou β -quitina (paralelas) (Adaptado de Seidl, 2008).

Nesse contexto, as quitinases são sintetizadas por uma ampla variedade de organismos como vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas e mamíferos (Karthik *et al.*, 2014). Em cada organismo essas enzimas executam funções diferentes. Nas plantas constitui resposta de defesa contra fungos fitopatogênicos. Nos insetos está associada à transformação durante o estado larval, bem como na degradação e síntese do exoesqueleto. Em fungos está envolvida no remodelamento da parede celular durante o crescimento da hifa, processos de autólise e nutrição, como fator de virulência em fungos mico e entomopatogênicos, enquanto nas bactérias auxilia na nutrição. Nos mamíferos a “quitotriosidase está relacionada aos macrófagos humanos”, enquanto a “quitinase ácida AMcase está presente no trato gastrointestinal e pulmões” (Sahai & Manocha, 1993; Patil *et al.*, 2000; Duo-Chuan, 2006; Matsumoto, 2006; Seidl, 2008; Aam *et al.*, 2010; Karthik *et al.*, 2014).

São classificadas como glicosidases hidrolases pertencentes às famílias 18, 19 e 20 (Duo-Chuan, 2006). A família 18 agrupa quitinases de fungos, vírus, animais e algumas plantas, enquanto a 19 é quase exclusivamente de plantas e a 20 corresponde a β -N-acetylhexosaminidases de bactérias e humanos (Dahiya *et al.*, 2006).

O sistema quitinolítico é constituído de endoquitinases (E.C. 3.2.1.14) as quais clivam aleatoriamente a cadeia de quitina, liberando oligômeros de baixo peso molecular como quitotetraose, quitotriose e diacetil quitotriose (Duo-Chuan, 2006). Já as exoquitinases são divididas em quitobiosidases (E.C. 3.2.1.29) ou quitina 1-4- β -quitobiosidase que catalisam a liberação de diacetilquitobiose a partir das extremidades não redutoras da cadeia de quitina (Karthik *et al.*, 2014), e β -1,4-N-acetilglucosaminidase (E.C. 3.2.1.52) promovem a remoção de unidades de GlcNAc

resultantes dos produtos de endoquitinases e quitobiosidases (Sahai e Manocha, 1993; Dahiya *et al.*, 2006).

Atualmente, essas enzimas apresentam reconhecido potencial na agricultura, medicina, química, meio ambiente e biotecnologia. Na agricultura atuam como agentes antimicrobianos e inseticidas no controle biológico de patógenos de plantas, minimizando o impacto ambiental decorrentes de agroquímicos (Patil *et al.* 2000; Wang *et al.* 2002; Dahiya *et al.*, 2006; Karthik *et al.*, 2014). Brzezinska *et al.* (2014) relatam a inibição de vários fungos fitopatogênicos como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporium* e *Penicillium aurantiogriseum* por preparados contendo enzimas quitinolíticas.

Outra possibilidade é o melhoramento da resistência de plantas usando técnicas de manipulação genética. O gene Chit42 de *T. harzianum*, codifica uma poderosa endoquitinase, logo um antifúngico com atividade potente para uma vasta gama de fungos fitopatogênicos (Duo-Chuan, 2006). Além disso, os oligossacarídeos de quitina também têm potencial atividade biológica, incluindo efeito anti-tumoral e atividade anti-inflamatória (Patil *et al.* 2000; Matsumoto, 2006; Dahiya *et al.*, 2006; Aam *et al.*, 2010).

2.5.2. Óxido-redutases

As oxidorredutases representam uma classe de enzimas que catalisam reações de oxidação e redução, têm potencial aplicação para a síntese de produtos químicos, farmacêuticos e de valor agregado decorrentes de transformações oxidativas (Powell *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2014). Além disso, podem ser empregadas em processos de biodegradação e biorremediação (Silva e Esposito, 2010; Shraddha *et al.*, 2011).

2.5.2.1. Ligninases

As ligninases representam um sistema enzimático constituído por peroxidases e lacase (Hattaka, 1994; Durán, 2010). As peroxidases dividem-se em lignina (LiP) e manganês (MnP) peroxidase. A lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) e a manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) são heme proteínas e dependentes de peróxido de hidrogênio como agente oxidante. A LiP oxida substratos não fenólicos e a MnP substratos fenólicos, além de necessitar do íon de manganês divalente (Durán, 2010; Wong, 2009; Sánchez, 2009; Johannes *et al.*, 2006; Kamitsuji *et al.*, 2005).

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas extracelulares multi cúpricas que catalisam a redução de oxigênio molecular a água acompanhada da oxidação de substratos fenólicos, estando presentes em plantas, insetos e micro-organismos (Desai & Ntyanand, 2011; Shraddha *et al.*, 2011; Duran, 2010; Wong, 2009; Gochev *et al.*, 2007; Kamitsuji *et al.*, 2005; Baldrian, 2005). A ação da lacase também pode ser ampliada para substratos não fenólicos através de mediadores como 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato (ABTS) e siringaldazina (Gochev *et al.*, 2007).

2.5.2.2. Mono-oxigenases

As mono-oxigenases contêm cobre em seu sítio catalítico, as quais podem atuar na degradação de celulose via clivagem oxidativa. Estas enzimas oxidativas pertencem à família GH61 da família das carboidratos-agentes, denominadas como mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs). LPMOs tipo-GH61 têm sido identificadas em linhagens de fungos (**Figura 5**) (Horn *et al.*, 2012), porém bactérias também foram descritas por conter LPMOs tipo CBM33.

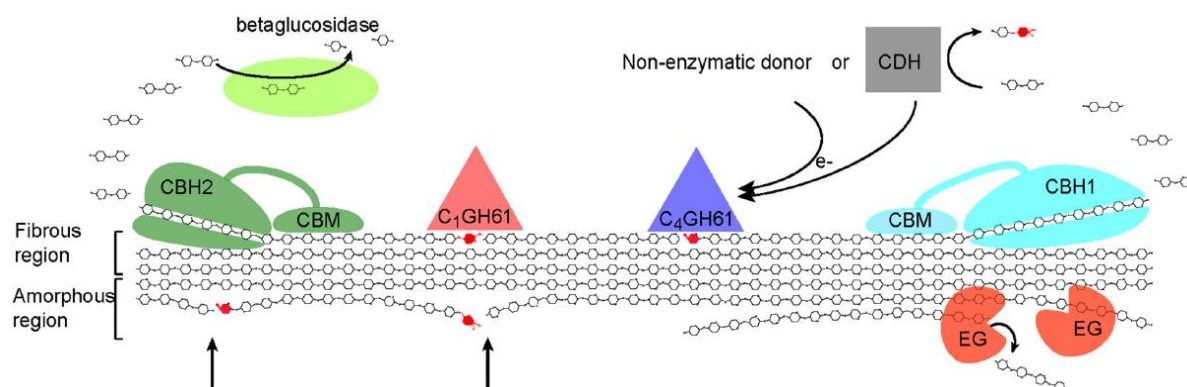


Figura 5. Ilustração da degradação enzimática de celulose. Abreviações: EG, endoglucanase; CBH, celobiohidrolase; CDH, celobiose-desidrogenase; CBM, módulo carboidrato-ligante. Notar que muitos sistemas enzimáticos celulolíticos têm múltiplas EGs e /ou CBHs que podem agir em diferentes partes do substrato, diferindo em termos de cristalinidade e acessibilidade. A figura também mostra uma oxigenase GH61 podendo gerar produtos ótimos para CBH2 e CBH1, respectivamente. A ação combinada das enzimas oxidantes C1 e C4 podem produzir celu-oligossacarídeos nativos a partir do centro da cadeia de celulose. A possível consequência da ação de GH61 é ilustrada no canto inferior esquerdo da figura, onde novos pontos de ataque por CBHs são indicados por setas (Adaptado de Horn *et al.*, 2012).

As LPMOs bacterianas agem principalmente sobre quitina, clivando o polímero polissacarídico. Representam uma classe de enzimas pobremente descritas, mas com potencial biotecnológico e propriedades únicas ainda inexploradas. Assim, essa nova classe insere-se como enzimas acessórias junto as celulasas na degradação de celulose cristalina (Vermaas, *et al.*, 2015; Beeson, *et al.*, 2015)

2.6. Contextualização do Estudo

No âmbito da área ocupada pela FPZSP foram construídas duas células de compostagens, a primeira contendo torta de filtro, solo da Mata Atlântica e resíduos de podas triturados, enquanto a segunda torta de filtro e resíduos de podas triturados. Em agosto de 2012 foram coletadas amostras das composteiras em tempos diferentes, sendo a primeira coleta no (tempo 0), após vinte dias da primeira coleta foi realizada a segunda coleta (tempo 1) e decorridos quarenta dias após a

primeira coleta foi realizada a terceira coleta (tempo 2), obtendo-se triplicatas das amostras em cada coleta.

Para cada amostragem, cerca de 10 gramas de compostagem foram acondicionados em tubos plásticos esterilizados de 50 ml. As amostras foram processadas misturando-se 10 g do material em 90 mL de água destilada estéril e diluídas seriadamente (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). Alíquotas de 100 µl de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo os meios de cultura MEA e PDA. As placas foram incubadas a 28 °C no período de 1 a 4 semanas e o isolamento das colônias foi realizado do segundo ao trigésimo dia após a inoculação das placas. As colônias puras obtidas foram preservadas por criopreservação utilizando-se glicerol a 10%, bem como água destilada estéril de acordo com o método de Castellani (1964), os isolados foram acondicionados a 4 °C.

Os isolados foram reativados em meio de cultivo MEA por sete dias a 28 °C, após a incubação foram realizadas análises macro e microscópicas dos fungos. De modo que a classificação em nível de gênero foi de acordo com as referências da literatura (Pitt 1980; Pitt and Kocking 1997; Passarini *et al.* 2013). As cores das colônias e crescimento foram visualizados em um estereoscópio (Leica MZ 125-Switzerland), enquanto que a presença e tamanho de esclerótios, seriação de cabeça e morfologia de conídios foram determinados através da coloração em lâminas com lactofenol ou azul de algodão com auxílio de um microscópio óptico (Leica DRM Switzerland).

Os resultados das análises macro e microscópicas demonstraram a presença do gênero *Aspergillus* (n=45) como mais abundante nas amostras estudadas. Seguido dos gêneros *Trichoderma* (n=43), *Penicillium* (n=8) e

Cladosporium (n=1). Além disso, foi possível a identificação de outros grupos taxonômicos como os zigomycetos (n=13), dematiaceous (n=23), esse táxon de fungos filamentosos é caracterizado pela coloração negra em suas estruturas tais como conídeos e/ou conidióforos e fungos hialinos (n=57), caracterizados por conídios e/ou conidióforos hialinos ou ligeiramente coloridos (Passarini *et al.* 2013).

Nesse contexto, foram isolados 190 fungos a partir das amostras de compostagem de torta de filtro. Sendo recuperadas 42 linhagens no tempo zero (FPZSP1), 38 linhagens no tempo 1 (FPZSP2) e 110 linhagens no tempo 2 (FPZSP3). Os fungos da compostagem de torta de filtro são provavelmente termotolerantes. No entanto, não foram isolados em uma real fase de compostagem, uma vez que as células de compostagens não atingiram uma temperatura de 40 °C.

Assim, os 190 isolados foram avaliados quanto à atividade celulolítica, sendo inoculados em meios de culturas suplementado com 10 gL⁻¹ de celulose (Celuflok 100®). A atividade celulolítica foi quantificada utilizando-se o kit comercial AZO-CM-Cellulose (Megazyme®), de acordo com as instruções do fabricante. Dentre os isolados, 13 foram selecionados (FPZ_SP3 01, SP3 05, SP3 47, SP3 72, SP3 74, SP3 75, SP3 91, SP2 121, SP1 129, SP1 135, SP1 141, SP1 148 e SP1 151) como os melhores produtores de celulase em comparação a *T. reesei* adotado como controle positivo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

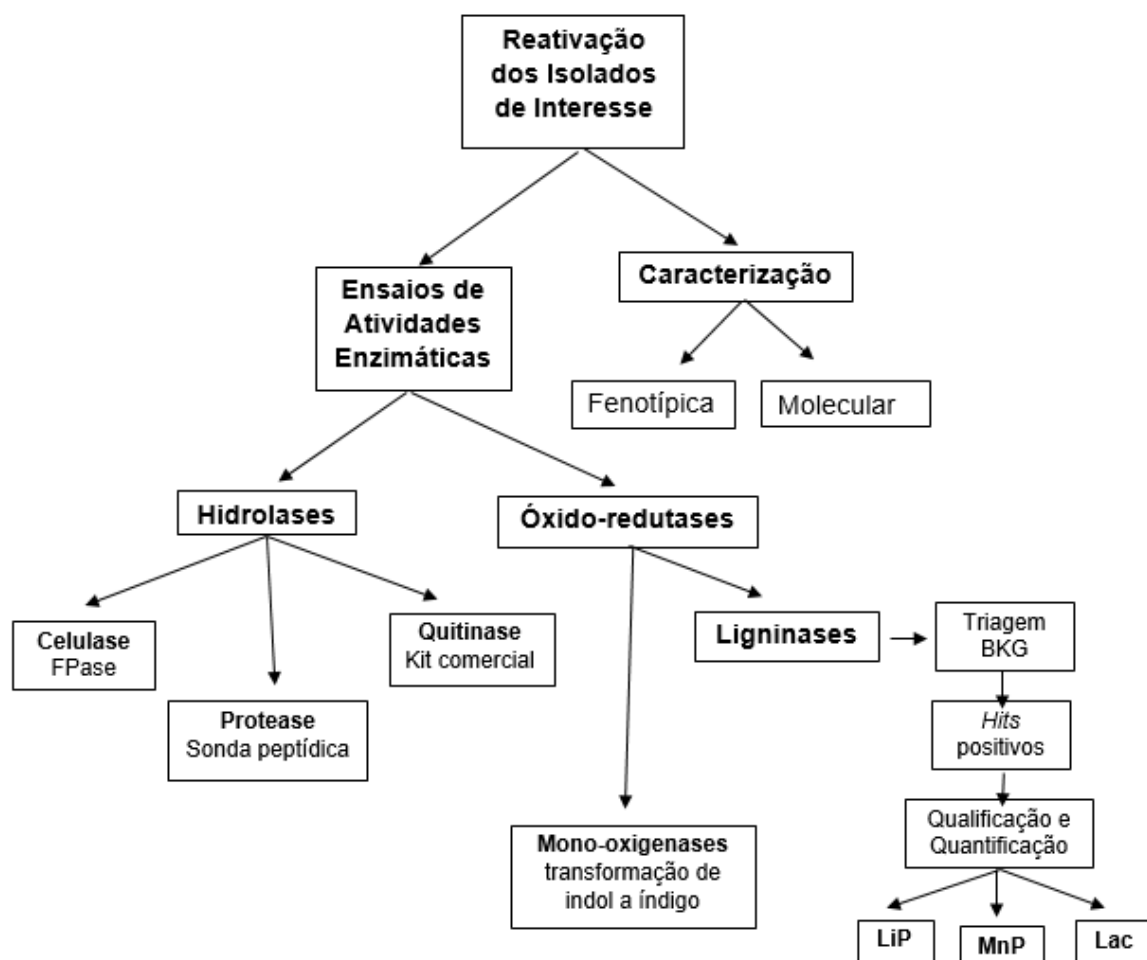
O presente trabalho investigou o potencial de hidrolases, ligninases, quitinases e mono-oxigenases, de fungos isolados a partir da compostagem de torta de filtro acrescido de resíduos de poda triturados e amostras de solo da Mata Atlântica, no âmbito da área ocupada pela FPZSP.

3.2. Objetivos Específicos

- Bioprospecção das atividades enzimáticas celulasas, proteases, quitinases, ligninases e mono-oxigenases utilizando metodologias baseadas em triagens rápidas de alto desempenho (HTS), bem como o aprimoramento da produção em escala de bancada;
- Identificação taxonômica através de técnicas fenotípicas e moleculares dos isolados de interesse.

MATERIAL E MÉTODOS

4. FLUXOGRAMA



4.1. MATERIAL E MÉTODOS

Vale salientar que o presente estudo constituiu continuidade do Projeto CNPQ – 475166/2013-2 de pós-doutoramento desenvolvido pelo Dr. Michel R. Zambrano Passarini, aluno vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade (PPG-CTS), o qual realizou as coletas das amostras na compostagem de torta de filtro, bem como o isolamento das culturas de fungos e seleção dos 13 isolados celulolíticos.

4.2. Isolados Fúngicos

No âmbito da área ocupada pela FPZSP foram construídas duas células de compostagens, a primeira contendo torta de filtro, solo da Mata Atlântica e resíduos de podas triturados, enquanto a segunda torta de filtro e resíduos de podas triturados. Em agosto de 2012 foram coletadas amostras das composteiras em tempos diferentes.

Para cada amostragem, cerca de 10 gramas de compostagem foram acondicionados em tubos plásticos esterilizados de 50 ml. As amostras foram processadas misturando-se 10 g do material em 90 mL de água destilada estéril e diluídas seriadamente (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). Alíquotas de 100 μ L foram semeadas nos meios de cultura MEA e PDA, incubados a 28 °C por um período de 7 a 28 dias. Após o isolamento e caracterização macro e microscópica, os isolados fúngicos obtidos foram preservados em água destilada estéril conforme o método de Castellani (1964), bem como criopreservados a – 20 °C.

Para o presente estudo, foram reativados os isolados de interesse em meio de cultivo MEA e incubados a 28 °C por 7 dias. Após a incubação, as colônias

foram cultivadas em condições específicas para realização dos ensaios funcionais a serem descritos a seguir.

4.3. Determinação das atividades enzimáticas de interesse

4.3.1 Atividade Celulolítica

4.3.1.1. Triagens para a detecção da atividade celulolítica

Os isolados foram cultivados em frascos erlenmeyers (125 mL) contendo 50 mL de caldo MYE [Extrato de Malte 13 g L⁻¹; Extrato de Levedura 0,5 g L⁻¹ e Peptona 5,5 g L⁻¹], como fonte de carbono. Após 14 dias de incubação a 28 °C sob agitação rotacional de 150 rpm, foi determinada a atividade enzimática com a utilização do kit comercial AZO-CM-Cellulose S-ACMC 04/07 (Megazyme®), de acordo com especificações do fabricante. Leituras de absorbância foram determinadas no comprimento de onda de 590 nm.

4.3.1.2. Confirmação da Atividade Celulolítica - Ensaio Atividade de Papel de Filtro (FPase)

Os isolados selecionados como positivos na triagem inicial, foram cultivados em caldo MYE, sendo que alíquotas de 1mL do sobrenadante foram utilizadas para a realização do ensaio FPase (Xiao *et al.*, 2004). A metodologia adotada foi aplicada de acordo com o procedimento padrão recomendado pela IUPAC, mas miniaturizado em microplacas de 96 poços, de acordo com método proposto por Xiao *et al.* (2004), adaptado por Ramos (2013).

A primeira fase do ensaio consistiu em inocular 100 µL do sobrenadante do pré-inóculo dos isolados em 900 µL de Meio Mandels (KH₂PO₄ 2,0 g L⁻¹, (NH₄)SO₄ 1,4 g L⁻¹; CaCl₂.2H₂O 0,3 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,3 g L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,005 g L⁻¹;

MnSO₄.7H₂O 0,0016 g L⁻¹; ZnSO₄.H₂O 0,0014 g L⁻¹; CoCl₂ 0,002 g L⁻¹; Tween-80 1 mL⁻¹; Peptona 1,0 g L⁻¹; CMC 0,75 g L⁻¹) nos pHs 4,8 e 7,4 em placas *deep well*, tendo-se a CMC como única fonte de carbono. Em seguida foi adicionado um disco de papel de filtro Whatman nº 1 cortado com furador de papel, a placa foi vedada com papel alumínio e pequenos furos foram feitos na superfície deste papel para favorecer a aeração. As placas foram incubadas em agitador rotacional por 5 dias, 150 rpm a 28 °C. Como controle positivo foi utilizada a linhagem de *Trichoderma reesei* gentilmente cedida pela Dra. Juliana Velasco (CTBE), enquanto como controle negativo foi adotado o meio de cultura não inoculado por microrganismos.

Na fase seguinte, as placas *deep well* foram centrifugadas por 15 min, 3000 rpm a 5 °C. Foram retirados 32 µL do sobrenadante e transferidos para microplacas de 96 poços, uma para cada pH (4,8 e 7,4). Em seguida adicionou-se 64 µL de tampão acetato de sódio pH 4,8 / tampão fosfato de sódio pH 7,4 e um disco de papel de filtro. As microplacas foram incubadas a 50 °C por 60 minutos em banho de água fervente para a digestão do substrato. A reação foi interrompida com a adição de 100 µL do reagente de Sumner (ácido 3,5 dinitrosalicílico 10 g L⁻¹; NaOH 16 g L⁻¹ e tartarato duplo de sódio e potássio 300 g L⁻¹). Para o desenvolvimento da cor, as microplacas foram aquecidas em água fervente à 95 °C por 5 minutos e logo em seguida resfriadas em banho de gelo (choque térmico). Foram retirados 200 µL dos açúcares redutores para uma nova microplaca de 96 poços. A absorbância foi aferida no comprimento de onda (λ) 540 nm no leitor de microplaca *Biotek Synergy HT*. De maneira a quantificar a atividade enzimática, utilizou-se glicose, em diferentes concentrações para a construção de uma curva padrão (**Figura 6**). Foram preparadas soluções em concentrações conhecidas (1 mg/mL a 4 mg/mL) a partir da

solução estoque 10 mg/mL. As soluções foram submetidas às reações de digestão anteriormente descritas, também em microplacas, posteriormente aferindo-se os valores de absorbância no mesmo leitor Elisa.

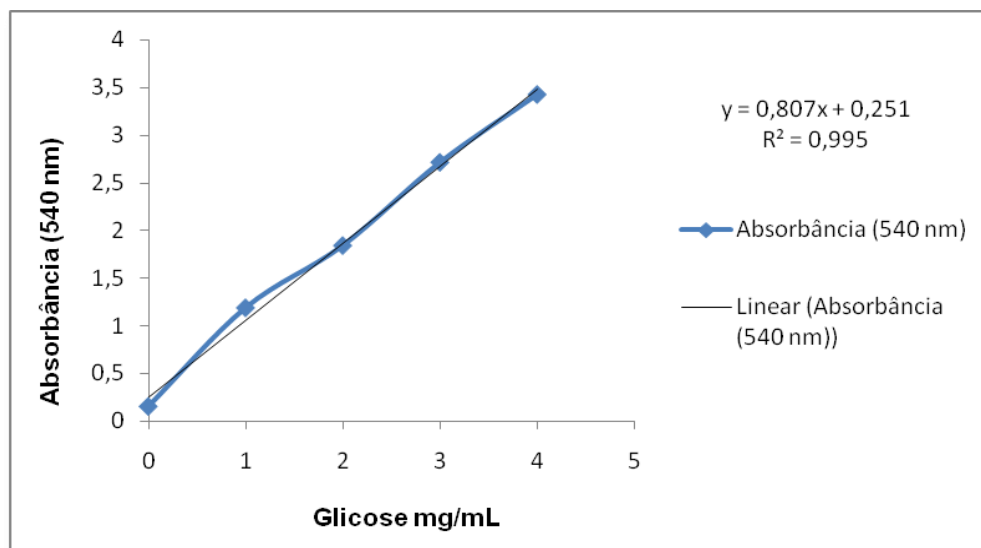


Figura 6. Curva padrão de glicose 1mg/mL para determinar a liberação de glicose durante o ensaio de PFase em ambos os pHs.

Cálculo da Unidade de Papel de Filtro (FPU)

Para a determinação da atividade enzimática total de celulasas em unidades FPU/mL foi adotada a equação descrita por Xiao *et al.* (2004) (**Equação 1**). A quantidade em equivalentes de glicose foi determinada a partir da construção de curva padrão de glicose, na qual uma unidade enzimática foi definida como 1 μ mol de glicose liberado por mL por minuto no período reacional, sendo expressa em FPU.

$$\text{FPU/mL} = \frac{(A_{540} \text{ amostra})}{(A_{540}/\text{mg padrão})} \times (5,55 \mu\text{mole/mg}) \times \frac{1}{60 \text{ min}} \times \frac{1}{X \text{ mL}} \quad (1)$$

Onde:

FPU / mL: Corresponde à atividade de celulase determinada na amostra.

A₅₄₀ amostra: Absorbância obtida a partir do ensaio com tampão acetato e fosfato de sódio nos respectivos pHs.

A₅₄₀/mg padrão: absorbância de 01 mg de glicose, como derivados a partir da curva padrão de glicose.

5,55 µmole/mg: e µmoles de glicose em 01 mg.

60 minutos: tempo de incubação.

X mL: volume de extrato enzimático em mL.

4.3.2. Detecção da Atividade de Proteases

A atividade proteolítica foi baseada na metodologia desenvolvida por Oliveira *et al.* (2012), a qual utiliza bibliotecas de sondas peptídicas (Abz–G–X–X–X–X–X–Q–EDDnp) do tipo FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*).

Os isolados foram inoculados em placas *deep well* com 1,5 mL de caldo MYE, incubadas em agitador rotacional (140 rpm) a 28 °C, em triplicata. Após 7 dias, as culturas foram centrifugadas por 45 min, 4000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi retirado para os experimentos em microplacas específicas de 96 poços para leitura de fluorescência. A reação consistiu em 150 µL de tampão 50 mM Acetato de sódio pH 4,0; ou tampão 50 mM Tris pHs 7,0 e 9,0, seguindo-se a adição de 50 µL do extrato enzimático bruto e 2,4 µL de sonda peptídica Abz–GXXXXXXQ–EDDnp, gentilmente sintetizada e cedida pelo grupo de pesquisas coordenado pela Profa. Dra. Maria A. Juliano (UNIFESP/EPM) Oliveira *et al.* (2012).

A hidrólise da sonda peptídica foi avaliada nos três pHs em espectrofluorímetro de microplacas (*Biotek Synergy HT*) por 2 horas, através da quantificação de fluorescência (aumento linear inicial de fluorescência em função do tempo) emitida pelo grupamento Abz como doador de fluorescência no $\lambda_{\text{excitação}}$ 320 nm, seguido pela emissão no $\lambda_{\text{emissão}}$ 420 nm pelo grupo Q–EDDnp como acceptor da

fluorescência. Os ensaios foram realizados em triplicatas, sendo que como controle positivo foi adotada uma linhagem de *Escherichia coli*, enquanto o controle negativo consistiu no meio de cultura não inoculado por microrganismos. Após a quantificação de fluorescência, foi obtida a média dos valores de triplicatas para cada linhagem e respectivos pHs.

4.3.3. Atividade Quitinolítica

Os isolados foram inoculados em tubos de vidro com tampa de rosca contendo 5 mL de caldo MYE, incubados em agitador rotacional (140 rpm) a 28 ° C por 7 dias. Após o período de incubação, transferiu-se 5 mL do sobrenadante para tubos *Falcon* (15 mL), os quais foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, retirou-se o sobrenadante dos isolados de interesse para avaliar a produção da enzima quitinase.

A atividade quitinolítica foi determinada utilizando-se sonda fluorescente comercial *Fluorimetric Chitinase Assay Kit CS1030* (Sigma Aldrich®), de acordo com as recomendações do fabricante, realizando-se ensaios miniaturizados em microplacas de 96 poços, em duplicata.

Cálculo da Atividade Quitinolítica

A atividade quitinolítica foi determinada através do cálculo de uma única concentração padrão, ou seja, a fluorescência de 100 ng (1,9 nmol/mL). Uma unidade enzimática (U) foi definida como uma unidade de atividade quitinolítica liberada por 1 µmol de substrato (4-metil-umbeliferona), por minuto. A atividade enzimática foi expressa em Units/mL do extrato enzimático e os cálculos realizados a partir da **Equação 2**, de acordo com o boletim técnico do kit Sigma Aldrich®.

$$\text{Units/mL} = \frac{(\text{FLU}_{\text{amostra}} - \text{FLU}_{\text{branco}}) \times 1,9 \times 0,3 \times \text{DF}}{\text{FLU}_{\text{padrão}} \times \text{tempo} \times V_{\text{enzima}}} \quad (02),$$

Onde:

FLU_{amostra}: fluorescência do caldo enzimático

FLU_{branco}: fluorescência do branco (contendo apenas a solução de trabalho)

0,3: volume final da reação em mililitros após a adição da solução que interrompe a reação

DF: fator de diluição da enzima

FLU_{padrão}: fluorescência da solução padrão menos a fluorescência do padrão branco

tempo: minutos

V_{enzima}: quantidade de caldo enzimático em mL

4.3.4. Atividade de Ligninases

4.3.4.1. Triagem em Guaiacol

Os 13 isolados selecionados foram inoculados em meio ágar BKG (Glicose 10 g L⁻¹; Peptona 2 g L⁻¹; Extrato de Levedura 1 g L⁻¹; Ágar 20 g L⁻¹ e Guaiacol 4mM 0,496 g L⁻¹) tendo guaiacol como substrato microbiano. Após incubação a 30 °C por 7 dias, os isolados produtores de enzimas ligninolíticas foram detectados através da oxidação do substrato guaiacol. A produção de cor acastanhada ao redor da colônia indicou atividade de enzimas oxidativas (D'Souza-Ticlo *et al.*, 2006).

Os isolados detectados como positivos na triagem inicial, foram cultivados em frascos erlenmeyers (125 mL) com 30 mL de meio ME3%, incubados em agitador rotacional (140 rpm) a 28 °C por 7 dias, em duplicata. Após o período de incubação, transferiu-se 2 mL do sobrenadante para microtubos, os quais foram centrifugados a 10.000 rpm a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante dos

isolados de interesse foram avaliados quanto a produção das enzimas: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac). Como controle positivo foi adotada uma linhagem de *Fusarium spp.* como parâmetro de atividade ligninolítica (Santos, 2014), enquanto o controle negativo consistiu na reação enzimática sem o inóculo microbiano.

4.3.4.2. Qualificação e Quantificação da Atividade Ligninolítica

Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade de LiP foi mensurada por meio da leitura em espectrofotômetro UV/VIS, da ocorrência da reação de oxidação do substrato álcool veratrílico a aldeído veratrílico. A mistura reativa foi constituída por 50 µL de tampão tartarato de sódio 125 mM (pH 3,0); 25 µL de álcool veratrílico 10 mM; 25 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 25 µL de extrato enzimático. A reação foi iniciada quando se adicionou o peróxido de hidrogênio. A liberação de aldeído veratrílico foi determinada através da absorbância no comprimento de onda (λ) 310 nm ($\epsilon = 9.300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Arora e Gill, 2001) modificado.

Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade da MnP foi determinada através de leituras de valores de absorbância no comprimento de onda (λ) de 610 nm ($\epsilon = 4.460\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), de forma a detectar a oxidação do substrato vermelho de fenol. A mistura reativa foi constituída por 5 µL de vermelho de fenol (0,01%); 5 µL de lactato de sódio 0,25 M; 10 µL de albumina bovina (0,5%); 25 µL MnSO_4 2 mM; 50 µL de peróxido de hidrogênio em

tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5) e 5 µL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 30 °C por 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de NaOH 2N (Kuwahara *et al.*, 1984) modificado.

Lacase (Lac)

A atividade da Lac foi detectada através de leituras de valores de absorbância no comprimento de onda (λ) 530 nm ($\epsilon = 64.000\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para a detecção da oxidação do substrato siringaldazina. A mistura reativa foi constituída por 145 µL de siringaldazina 20 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e 5 µL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 30 °C por 10 minutos (Saito *et al.*, 2003) modificado.

Cálculo da Atividade Ligninolítica

A atividade ligninolítica foi determinada através do cálculo da diferença de valores de absorbância (final menos inicial). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em UL^{-1} do extrato enzimático e os cálculos realizados a partir da **Equação 3**, derivada da Lei de Beer-Lambert (Magrini, 2012).

$$\text{UL}^{-1} = \frac{\Delta A \times V \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} \quad (03),$$

Onde:

ΔA : diferença entre a absorbância final e a inicial

V: volume da reação em litros

10⁶: converte os mols do ϵ para μmols

ϵ : coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

R: quantidade de caldo enzimático (L)

t: tempo de reação (minutos)

4.3.5. Atividade de Mono-oxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs)

Os isolados foram inoculados em tubos *Falcon* estéreis (50 mL) contendo 30 mL de meio mineral Bushnell Haas [MgSO_4 0,2 g L^{-1} ; CaCl_2 0,02 g L^{-1} ; KH_2PO_4 1,0 g L^{-1} ; K_2HPO_4 1,0 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)(\text{NO}_3)$ 1,0 g L^{-1} e FeCl_3 1,0 g L^{-1}] suplementado com 3 mL de meio ME3% e 200 μL de naftaleno 1mM como substrato indutor, seguindo-se a incubação em agitador rotacional (140 rpm) a 28 °C, após o crescimento inicial, foram adicionados mais 200 μL de naftaleno 1mM (2º dia) totalizando 4 dias de incubação. Seguiu-se à centrifugação dos tubos a 7.000 rpm por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante das culturas foi utilizado nos ensaios de detecção de LPMOs (O'Connor & Hartmans, 1998).

Transformação de indol a índigo

A ocorrência da transformação de indol a índigo foi determinada através da absorbância no comprimento de onda (λ) 610 nm ($\epsilon = 15.900\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). A reação consistiu em 160 μL de tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,0 contendo 0,25 mM de indol, essa solução foi previamente climatizada a 30 °C; 40 μL de extrato enzimático foram transferidos para *deep well*. Seguiu-se à incubação em um ângulo de 45 °C, sob agitação vigorosa em banho-maria a 30 °C. Alíquotas (10 μL) da reação foram

transferidas para microplacas, sendo toda a reação analisada a cada 5 minutos durante 30 minutos (O'Connor & Hartmans, 1998) modificado.

Com a finalidade de quantificar a transformação de indol a índigo, utilizou-se o reagente índigo (Sigma), em diferentes concentrações para a construção de uma curva padrão (**Figura 7**). Foram preparadas soluções em concentrações conhecidas (0,05 mM; 0,10 mM; 0,15 mM; 0,20 mM e 0,25 mM). As soluções foram submetidas às reações anteriormente descritas, também em microplacas, posteriormente aferindo-se os valores de absorbância no mesmo leitor Elisa.

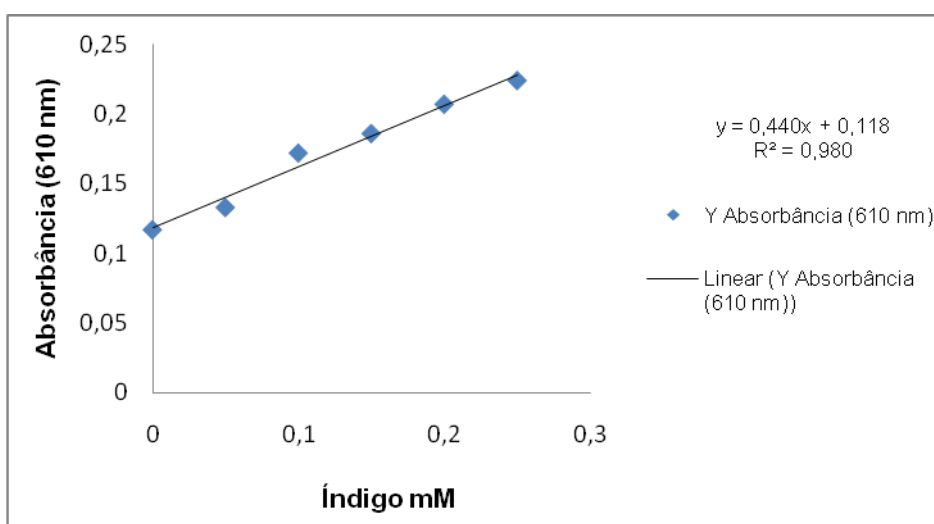


Figura 7. Curva padrão de solução de índigo 0,05-0,25mM para determinar a transformação de indol ao composto índigo durante o ensaio quantitativo para mono-oxigenases.

4.4. Caracterização de Proteases

Os isolados detectados como positivos no ensaio de atividade proteolítica, foram encaminhados aos ensaios de caracterização de proteases no Laboratório de Biofísica INFAR/UNIFESP.

Os fungos foram inoculados em tubos de vidro com tampas de rosca contendo 5 mL de caldo MYE, incubados em agitador rotacional (140 rpm) a 28 °C por 7 dias. Após o período de incubação, transferiu-se 5 mL do sobrenadante para

Falcon (15 mL), os quais foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante dos isolados de interesse foi retirado para realizar a caracterização de proteases em pH ótimo de atividade enzimática, utilizando-se os inibidores Iodoacetamida e E-64 inibidores de cisteína proteases; PMSF inibidor de serina proteases; Pepstatina inibidor de ácido aspártico proteases; EDTA e Orto fenantrolina inibidores de metalo proteases (Oliveira *et al.* 2012).

Em microplacas específicas de 96 poços para leitura de fluorescência foram adicionados 150 µL de tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,0 ou tampão 50 mM Tris pH 9,0; 50 µL do extrato enzimático bruto e inibidores (1 µL de PMSF 1 mM; 1 µL de Iodo-acetamida 50 µM; 1 µL de O-fenantrolina 1mM; 2 µL de EDTA 5 mM; 1 µL de E-64 5 µM e 1 µL de Pepstatina 1 mM), após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi adicionado 2,4 µL de sonda Abz–GXXXXXXQ-EDDnp.

O efeito do uso de inibidores na atividade proteolítica foi avaliada em espectrofluorímetro de microplacas (*Molecular Devices SpectraMax M2*) por 02 horas, através da quantificação de fluorescência como descrito no item (4.3.2).

4.5. Caracterização Fenotípica dos Isolados de Interesse

A morfologia dos isolados fúngicos foi realizada a partir da semeadura de cada linhagem em meios de cultura MEA e PDA (Gonçalves *et al.*, 2012). As cepas foram inoculadas em três pontos equidistantes em placas de Petri (90x15mm), com auxílio de alça de platina. As placas foram incubadas à temperatura de 25°C durante 7 a 14 dias. Após este período, os isolados foram analisados levando em consideração aspectos como diâmetro da colônia, cor, textura, topologia e pigmento no ágar. Além disso, cada isolado foi semeado, com o auxílio de uma alça de platina, nas extremidades de blocos (1,0X1,0cm) de PDA em placas de Petri (60X15

mm). Cada bloco foi coberto com uma lamínula esterilizada e, em seguida, as placas foram incubadas a 25°C durante 5 a 7 dias. Após o período de incubação, foi montada a lâmina de cada cultivo pingando uma gota de ácido láctico 85% e, em seguida, cobrindo-a com a lamínula. Cada lâmina foi observada em microscópio de luz com objetiva de 40x (Olympus BX51, Tóquio, Japão) onde foram analisadas as características das estruturas do micélio reprodutivo como: hifas, presença e disposição de conídios e conidióforos.

4.6. Caracterização Molecular dos Isolados de Interesse

A caracterização molecular dos fungos com atividade enzimática de interesse detectada nos ensaios anteriores, foi baseada na análise de sequências de genes conservados, região ITS do DNA ribossômico, envolvendo a extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento de DNA. Esse procedimento foi realizado no LEMI/UNIFESP sob a coordenação da Profa. Dra. Sarah Santos Gonçalves.

Repique de fungos filamentosos

Para a extração de DNA de fungo filamentoso, as linhagens foram repicadas em meio de cultura específico YES (Extrato de Levedura 20 g L⁻¹; Sacarose 150 g L⁻¹; Ágar 20 g L⁻¹). Após incubação a 25 °C por 3 dias, os isolados foram submetidos a extração de DNA.

Extração de DNA de fungo filamentoso

Com um bisturi estéril foram retirados fragmentos do micélio fúngico crescido no meio de cultura YES, removendo-se todo o ágar da amostra, a qual foi transferida

para um microtubo contendo 200 µL de *PrepMan kit* (Applied Biosystems, EUA), seguindo-se de acordo com as recomendações do fabricante.

Quantificação de DNA e pureza das amostras

O DNA total foi quantificado no espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE). Além da concentração do DNA, foi observada a pureza das amostras através dos valores gerados das razões DO260/DO230 (pureza quanto à quantidade de sais). A razão entre as leituras DO260/DO280 (quantidade de proteínas) permitiu uma estimativa da pureza do DNA, que apresentou valores entre 1,8 e 2,0. A razão abaixo de 1,6 indicou grande quantidade de contaminantes e proteínas, e, na sua ocorrência, a extração de DNA foi realizada novamente.

Amplificação da região ITS

O DNA dos isolados de interesse foi amplificado com iniciadores capazes de sintetizar a região ITS do rDNA. As sequências dos primers utilizados foram o ITS1 forward (5' TCCGTAGGTGAACCTGCG 3') e ITS4 reverse (5' TCCTCCGC TTATTGATAT3') e à amplificação foi realizada de acordo com metodologias prévias, descritas por Gonçalves et al. (2012).

As reações da PCR foram preparadas em microtubos para centrifugação, adicionando-se os componentes descritos na (**Tabela 2**).

Tabela 2. Componentes da reação de amplificação de DNA e seus respectivos volumes. Os primers foram diluídos 10X e o *Master Mix*® (PROMEGA, EUA) contém (Taq polimerase, desoxinucleotídeos, cloreto de magnésio e tampão tris)

Componentes	Concentração	Volume na Reação (μL)
Água Milli-Q	-	9,5
Primer ITS1	10 pmol/ μL	1,0
Primer ITS4	10 pmol/ μL	1,0
Master Mix	-	12,5
Amostra de DNA	40 ng/ μL	1,0
Total	-	25

Fonte: Gonçalves *et al.*, 2012.

As amostras de DNA foram previamente diluídas em água Milli-Q a uma concentração final de 40 ng/ μL . As reações da PCR foram encaminhadas ao termociclador Veriti Applied Biosystems (*Life Technologies*), cujo ciclo da PCR foi programado para ITS, a 94 °C por 3 min para desnaturação do DNA; a 94 °C por 1 min para a abertura da fita de DNA; a 57 °C por 1 min para o anelamento dos primers; a 72 °C por 1 min para a atuação da enzima Taq Polimerase repetido 40 vezes; a 72 °C por 5 min para estabilização e a 4 °C para armazenamento.

Eletroforese em Gel de Agarose

Os resultados da amplificação de DNA foram visualizados em géis de agarose 1,2% (agarose 1,2 g mL⁻¹ e 100 mL de tampão 0,5 M Tris-acetato-EDTA pH 8,0 [TAE] 1X), corados com 5 μL de Sybr Safe que apresenta a mesma sensibilidade que o brometo de etídeo. O gel foi montado em cuba de eletroforese, seguindo-se a inserção de pentes, os quais foram removidos após a polimerização do gel, formando poços para a deposição das amostras.

A preparação da amostra consistiu em 5 μL de amostra (produto da PCR) acrescida de 2 μL de tampão carregador Orange, do mesmo modo para o marcador de massa molecular (*Ladder*) de 100 pares de base previamente diluído (10^{-1}) em água Milli-Q.

Após o preparo das amostras, as mesmas foram aplicadas nos poços, seguindo-se a adição de tampão de eletroforese TAE 1X cobrindo-se todo o gel. A fonte de corrente contínua foi conectada a cuba de eletroforese, sendo que o tempo, a corrente e a voltagem foram ajustados para 60 minutos, 400 mA e 70-100 V respectivamente.

Os géis de agarose foram fotodocumentados. As estimativas das concentrações de DNA foram feitas através da comparação com padrões de concentração de DNA (fago λ).

Sequenciamento

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o kit de purificação QIAquick PCR (Quiagen), de acordo com as normas do fabricante, antes de serem submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (*Applied Biosystem*, Foster City, CA, USA).

As reações de seqüenciamento foram realizadas com o kit *BigDye*TM (*Applied Biosystems*). Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os mesmos empregados na amplificação. A reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de 96 poços (*Applied Biosystems*, EUA), cada um contendo um produto de PCR purificado diluído em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e um *mix* preparado especificamente para cada iniciador. O volume final em cada poço da

placa foi de 15 µL na qual continha 40—80 ng de DNA (3 µL de DNA diluído em 3 µL de água DEPC), 2 µL de pré-mix Big Dye terminator (*Applied Biosystems*, EUA), 4 µL de tampão de sequenciamento e 3 µL de iniciador a 2 pmol/µL. A placa de sequenciamento foi ciclada em um termociclador (*Veriti, Life Technologies*, EUA), submetida a 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C.

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados a fim de eliminar o excesso de iniciadores, sais, *dNTPs* e *ddNTPs* (di-desoxirribonucleosídeos trifosfatados) não incorporados na amplificação do DNA. Resumidamente, 2,0 µL de EDTA 125 mM, 2,0 µL de acetato de sódio 3 M e 55 µL de etanol absoluto foram adicionados a cada poço da placa de sequenciamento de 96 poços. Em seguida, 55 µL de etanol absoluto foram adicionados a cada poço da placa de sequenciamento, sendo esta vedada, homogeneizada e incubada por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após a incubação, a mesma foi centrifugada por 35 minutos a 3700 rpm e 20 °C. Nesta etapa, ocorreu a precipitação das moléculas de DNA. Após a centrifugação, o etanol foi descartado e os *pellets* foram lavados com 70 µL de etanol 70% e a placa novamente foi homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 3700 rpm a 20 °C. Em seguida, o etanol foi descartado por inversão e o excesso retirado por evaporação a 95°C.

Após a precipitação, os fragmentos foram submetidos a uma etapa de desnaturação. Para tanto, 15 µL de formamida HiDi (*Applied Biosystems*, Gouda, Netherlands) foram adicionados a cada um dos poços da placa. A placa foi vedada com uma septa (*Applied Biosystems*, EUA) específica para separação eletroforética

em capilar, homogeneizada por 20 segundos e incubada a 94 °C por 3 minutos, seguida de um choque térmico em gelo por 1 minuto.

O sequenciamento foi realizado por separação eletroforética em capilar em um sequenciador modelo 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA), que utiliza poliacrilamida POP7 (Applied Biosystems, EUA) e tampão TBE 1x (Tris/Borato/EDTA), durante 30 minutos, a 54 °C e 1300 volts, com o laser na potência de 25 %. Todo o sequenciamento foi realizado no Laboratório Alerta da disciplina de Infectologia da UNIFESP.

Análises das sequências

As sequências foram submetidas à edição no programa *Sequencher* versão 4.5 (Gene Codes Corporation), que fornece uma sequência consenso entre as sequências de nucleotídeos alinhadas geradas pelos iniciadores senso e antisenso. As seqüências consensos obtidas foram comparadas com seqüências já existentes depositadas em bancos de dados, como o *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/index.htm>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade Enzimática dos Fungos Filamentosos de Interesse

5.1.1. Atividade Celulolítica

Em trabalho anterior, foi possível isolar cerca de duzentas (200) linhagens fúngicas distintas da compostagem de torta de filtro, sendo submetidas à determinação de atividade celulolítica através do kit AZO-CM-Cellulose S-ACMC (Megazyme®). Nessa triagem inicial, 13 cepas foram detectadas como positivas FPZ_SP3 01, SP3 05, SP3 47, SP3 72, SP3 74, SP3 75, SP3 91, SP2 121, SP1 129, SP1 135, SP1 141, SP1 148 e SP1 151. Assim, os 13 isolados passaram a ser os microrganismos selecionados como objeto do presente estudo, seguindo assim diversos ensaios para a detecção de suas atividades enzimáticas, incluindo hidrolases e oxigenases.

Os treze isolados foram, primeiramente, encaminhados ao ensaio de atividade enzimática para celulasas - Atividade de Papel de Filtro (FPase), de maneira a detectar e avaliar a atividade total de endo/exo celulasas.

A atividade enzimática das treze linhagens no ensaio FPase foi inferior ao controle positivo adotado (*T. reesei*). Em ambos os pHs, 46,2% (6) isolados apresentaram atividade celulolítica muito semelhantes, ou seja, a diferença máxima entre os valores de atividade enzimática nos dois pHs foi 0,010 FPU/mL. Enquanto, 53,8% (7) isolados, apresentaram atividade total de celulasas diferentes em ambos pHs. Portanto, quatro linhagens SP3 01, 74, 75 e SP2 121 mostraram atividade celulolítica superior em pH ácido a pH alcalino.

Em contrapartida, (3) isolados apresentaram atividade celulolítica elevada em pH 7,4 quando comparado ao pH 4,8 (**Figura 8**). Apesar do baixo rendimento de atividade total de celulases frente ao controle positivo, o isolado com melhor atividade celulolítica foi SP3 01 (0,123 FPU/mL) seguido de SP3 75 (0,085 FPU/mL); SP3 74 e SP2 121 (0,084 FPU/mL) em pH 4,8. Enquanto em pH 7,4 o isolado com melhor atividade foi SP3 72 (0,086 FPU/mL) seguido de SP3 91 (0,077 FPU/mL) e SP1 129 (0,056 FPU/mL). Sendo assim, a maioria dos isolados apresentou atividade enzimática promissora quando comparados aos resultados de Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) que estudaram 64 isolados fúngicos cultivados em meio CMC como única fonte de carbono, a atividade enzimática variou entre 0,014 a 0,023 FPU/mL.

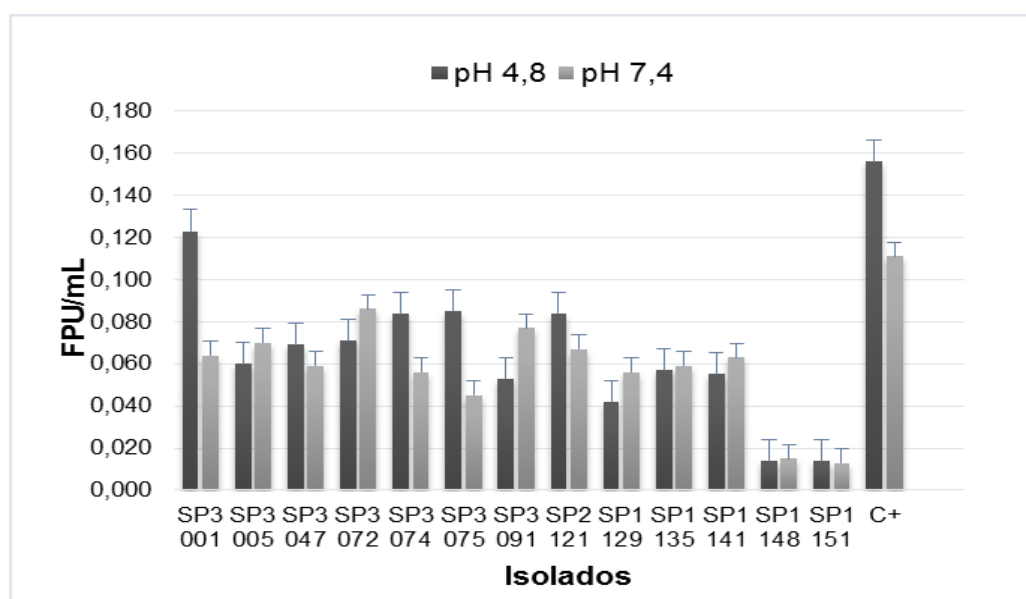


Figura 8. Atividade total de celulases em unidades de papel de filtro por mililitro (FPU/mL) em pH 4,8 e 7,4; resultados obtidos a partir da média de triplicatas dos valores de absorbância no comprimento de onda 540 nm nos respectivos pHs, dados com erro padrão.

Diferentes tipos de substratos incorporados ao meio de cultivo têm sido testados em diversos estudos visando a obtenção de potenciais isolados fúngicos produtores de celulase. Raghuwanshi *et al.* (2014) utilizaram linhagens mutantes de

Trichoderma sp. em meio de sais e farelo de trigo como fonte de carbono. A atividade total de celulasas nessas linhagens foi alta (0,622 a 1,013 FPU/mL) quando comparadas à linhagem padrão adotada, ou seja, *T. asperellum* RCK 2011 0,613 FPU/mL. Em relação à atividade enzimática dos isolados da compostagem de torta de filtro, os dados reportados pelos autores também foram mais elevados.

Silva (2012) avaliou isolados fúngicos em diferentes temperaturas (28 °C; 30 °C e 35 °C) e pHs (3,5; 4,5 e 5,5) utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato. O autor obteve os melhores resultados entre 0,043 a 0,119 FPU/mL à temperatura de 30 °C em pH 5,5, resultados estes similares aos obtidos com o substrato CMC como fonte de carbono no presente estudo.

Um aspecto importante que deve ser considerado nos ensaios de FPase é o pH, o qual influencia a atividade total de celulase. Há estudos que mostram diferenças na atividade enzimática de celulasas, decorrentes da variação de pH em uma faixa de 4,0 a 9,0 (Ruegger e Tauk-Tornisielo 2004; Li *et al.*, 2013).

Além do pH, a temperatura e o tipo de substrato são variáveis significativas na produção de celulasas. Diferentes condições de cultivo, cujos parâmetros estejam controlados ou não, refletem em resultados distintos, porém sugestivos para a otimização das variáveis nos ensaios em laboratório e para aplicação em ampla escala industrial.

5.1.2. Atividade Proteolítica

Dentre os treze isolados submetidos ao ensaio de atividade proteolítica em três condições de pH (4,0, 7,0 e 9,0), três (3) isolados apresentaram atividade proteolítica (valor de interesse igual ou superior a 100), a seguir, SP3 1 (pH 9,0),

SP3 72 (pHs 4,0; 7,0 e 9,0) e SP1 135 (pH 9,0) em relação à linhagem bacteriana *E. coli*, adotada como controle positivo.

A atividade proteolítica pode ser detectada através de substratos protéicos, cromogênicos ou fluorescentes. A caseína, assim como a gelatina e albumina são substratos protéicos empregados em ensaios de protease (Oliveira *et al.*, 2012). Wang (1999) afirmou que o substrato protéico é útil para certas proteases, pois simula as condições fisiológicas em que tal hidrolase atuaria. No entanto, após a clivagem do substrato protéico, alguns produtos contendo aminoácidos aromáticos não são reconhecidos, limitando assim o reconhecimento de algumas proteases (Reimerdes e Klostermeyer, 1976).

Por outro lado, ensaios baseados em substratos fluorogênicos têm sido amplamente utilizados para a detecção de proteases e estudos de inibição, principalmente devido a sua alta sensibilidade (Zhang, 2012; Gonçalves e Marsaioli, 2014). O método baseado em FRET “consiste na adição de um grupo fluorescente (Abz) em uma das extremidades do peptídeo, e um grupo supressor na outra extremidade (EDDnp)” (Oliveira *et al.*, 2012). O peptídeo FRET tem um grupo “acendedor” ligado a um “apagador” por uma cadeia polipeptídica, cuja a ligação peptídica é clivada pela protease, sendo que o sinal fluorescente é resultado da ação enzimática. A variação da intensidade do sinal de fluorescência é detectada à medida que a energia por ressonância é transferida do doador para o aceptor, aumentando o sinal no aceptor e diminuindo no doador (Zhang, 2012).

No contexto do presente estudo, o método FRET mostrou-se eficiente e de alto desempenho para a seleção de potenciais isolados com atividade proteolítica **(Figura 9)**.

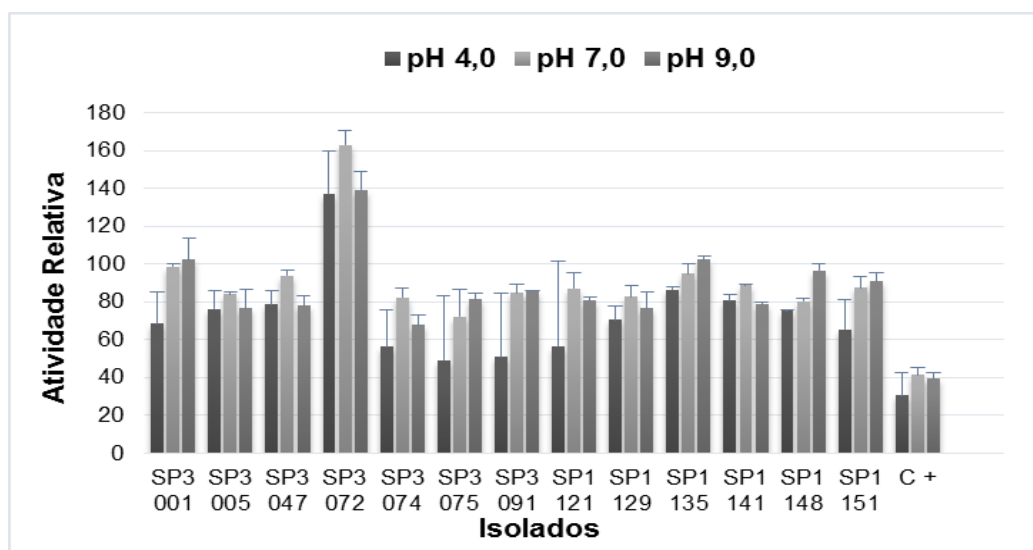


Figura 9. Determinação de atividade relativa proteolítica, obtida a partir da quantificação da média dos valores de fluorescência de triplicatas em três pHs, dados com erro padrão.

5.2. Caracterização de Proteases

Os três *hits* positivos detectados no ensaio de atividade proteolítica foram encaminhados as análises para a caracterização das enzimas ativas, através do uso dos inibidores Iodo-acetamida e E-64 inibidores de cisteína proteases; PMSF inibidor de serina proteases; Pepstatina inibidor de ácido aspártico proteases; EDTA e Orto fenantrolina inibidores de metalo proteases.

O isolado SP3 1 demonstrou 100 % de inibição de atividade proteolítica quando na presença de O-fenantrolina e EDTA, sugerindo que a protease produzida pertence à classe de metalo proteases, e moderada inibição por Iodo-acetamida e E-64 sugerindo que a segunda protease pertence à classe de cisteína proteases, ambas eficientes em pH alcalino (**Figura 10**). Além disso, foi possível determinar o substrato de preferência para maior atividade catalítica na posição P1, sendo o aminoácido triptofano.

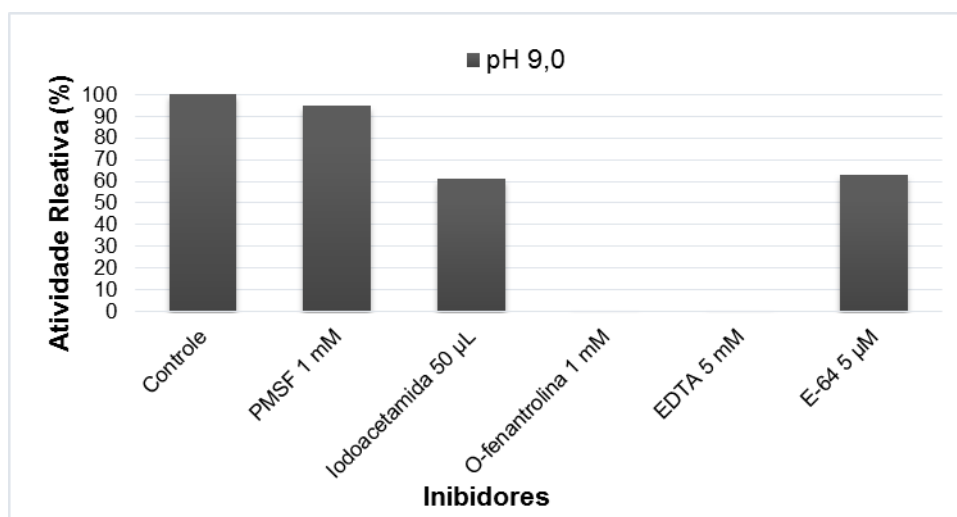


Figura 10. Efeito de diferentes tipos de inibidores na atividade proteolítica do isolado SP3 01, cuja protease foi inibida completamente pelos inibidores O-fenatrolina e EDTA em pH alcalino, atividade relativa obtida através da média de triplicatas.

Já o isolado SP3 72 também demonstrou 100% de inibição de atividade proteolítica quando na presença de O-fenatrolina e EDTA, sugerindo que a protease produzida pertence à classe de metalo proteases e ativa em pH ácido (**Figura 11**). Na posição P1 foi determinado o substrato de preferência, sendo dois aminoácidos tirosina e arginina.

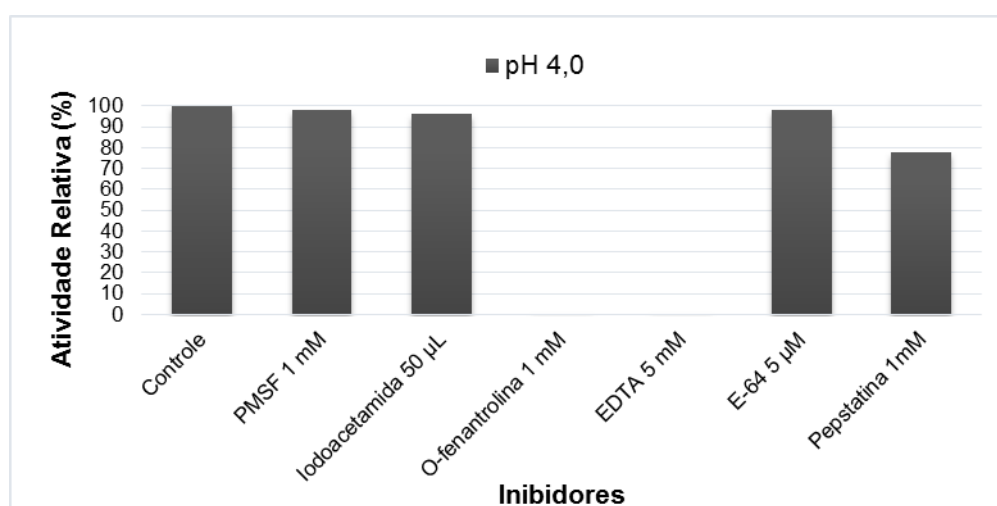


Figura 11. Efeito de diferentes tipos de inibidores na atividade proteolítica do isolado SP3 72, cuja protease foi inibida completamente pelos inibidores O-fenatrolina e EDTA em pH ácido, atividade relativa obtida através da média de triplicatas.

Enquanto, o isolado SP1 135 apresentou 100% de inibição de atividade proteolítica quando na presença de PMSF, sugerindo que a protease produzida pertence à classe de serina proteases e com pH ótimo alcalino (**Figura 12**). Também foi possível determinar o substrato de preferência para maior atividade catalítica na posição P1, sendo o aminoácido prolina.

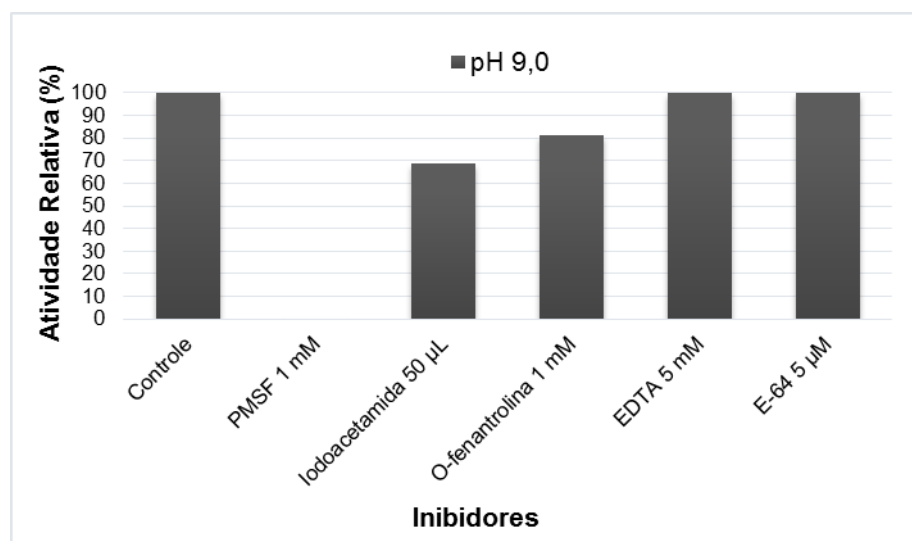


Figura 12. Efeito de diferentes tipos de inibidores na atividade proteolítica do isolado SP1 135, cuja protease foi inibida completamente pelo inibidor PMSF em pH alcalino, atividade relativa obtida através da média de triplicatas.

O ensaio de caracterização de proteases possibilitou a diferenciação das mesmas quanto em pH ótimo de atividade catalítica, bem como a especificidade ao substrato e consequentemente sua classificação de acordo com o efeito dos inibidores.

Assim, foi possível detectar metalo proteases alcalina (SP3 01) e ácida (SP3 72), resultados estes semelhantes ao estudo reportado por Merheb-Dini *et al.* (2009), cuja hidrolase do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* foi caracterizada como metalo protease ácida. Rao *et al.* (1998) relataram as metalo proteases como dependentes de íons metálicos bivalentes para sua atividade, sendo

as alcalinas com ampla especificidade, e as neutras ativa na presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, e inibidas por agentes quelantes.

Por outro lado, a classe serina proteases são ativas em pH alcalino e hidrolisam ligações peptídicas de aminoácidos como tirosina, fenilalanina e leucina na extremidade carboxila (Carvalho, 2010). No entanto, o isolado SP1 135 produziu serina protease alcalina com especificidade ao aminoácido prolina, resultado igual ao estudo de Silva e colaboradores (2014) os quais detectaram serina protease alcalina e especificidade pela prolina no fungo *Aspergillus fumigatus fresenius*.

5.1.3. Atividade Quitinolítica

Os 13 isolados submetidos ao ensaio de atividade quitinolítica baseado na hidrólise enzimática de substratos fluorogênicos apresentaram 12 *hits* positivos para o substrato 4-MU-GlcNac; 07 *hits* para 4-MU-(GlcNac)₂ e 10 *hits* para 4-MU-(GlcNac)₃, em relação ao controle positivo do kit *Fluorimetric Chitinase Assay* (Figura 13).

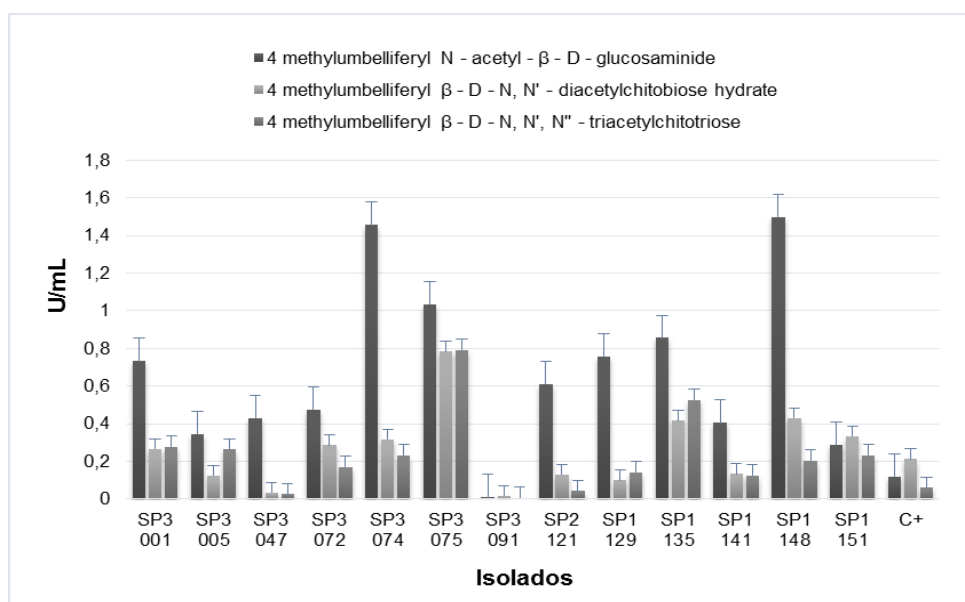


Figura 13. Atividade quitinolítica obtida a partir da quantificação da fluorescência (média de duplicatas) emitida após a hidrólise dos substratos fluorogênicos, e como parâmetro o controle positivo (enzima) da linhagem *Trichoderma viride*.

Os isolados da compostagem de torta de filtro apresentaram atividade enzimática de exoquitinases, seguido de endoquitinases e quitobiosidases decorrentes da hidrólise dos substratos *4-methylumbelliferyl-N-acetylglucosaminide*, *chitobiose* e *chitotriose*, respectivamente.

Sharma e colaboradores (2013) também detectaram atividade quitinolítica através dos mesmos substratos fluorogênicos citados acima para o fungo *Trichoderma harzianum* S17TH. Segundo os autores foram detectadas atividades enzimáticas para exoquitinase ($3,9 \text{ U mL}^{-1}$), quitobiosidase ($0,5 \text{ U mL}^{-1}$) e endoquitinase ($0,2 \text{ U mL}^{-1}$), quando o fungo foi inoculado em meio de cultivo contendo sais minerais acrescidos de 1 % de quitina coloidal.

Comparando-se as atividades enzimáticas desse fungo com os resultados dos isolados da compostagem de torta de filtro, cultivados em meio extrato de malte/levedura e peptona como fontes de carbono e nitrogênio, foi possível detectar atividades enzimáticas promissoras para exoquitinase, quitobiosidase e endoquitinase. Vale ressaltar que não foi utilizado substrato indutor (quitina) no meio de cultura.

Nesse sentido, substratos indutores presentes no meio de cultivo podem potencializar a produção de quitinases em fungos. De acordo com Matsumoto (2006) a produtividade de quitinases aumenta na presença de quitina. Esse substrato na forma coloidal é mais acessível aos fungos que na forma pura, e ainda melhor que outras fontes de quitina (Seidl, 2008; Karthik *et al.*, 2014). A produção de quitinases é influenciada por fatores como o estágio do inóculo, componentes da cultura, aeração, pH, temperatura, tempo de incubação, condições de fermentação e tipo de

substrato acrescido ao meio de cultivo, podendo suprimir ou incrementar a síntese dessas hidrolases (Matsumoto, 2006; Karthik *et al.* 2014).

No âmbito de ensaios de atividade quitinolítica, buscam-se métodos reprodutíveis, rápidos e sensíveis. Diversos compostos como quitina coloidal ou derivados de quitina são empregados nesses ensaios visando o monitoramento da atividade enzimática (Matsumoto, 2006). Nesse sentido, os métodos colorimétricos são baseados na dosagem de açúcares redutores por meio do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (Ferrari *et al.*, 2014). No entanto, tal procedimento é laborioso e demanda tempo, além da necessidade de aquecimento para o desenvolvimento da cor.

Outro aspecto importante refere-se à baixa seletividade desses ensaios, os quais permitem a quantificação de atividade enzimática sem a diferenciação quanto ao tipo de quitinase (Tronsmo e Harman, 1993).

Em contrapartida, os substratos fluorogênicos apresentam os grupamentos 4-metilumbeliferil unidos por ligações β -1,4 similares aos monômeros de (GlcNAc), um composto análogo aos oligossacarídeos de quitina (Chernin *et al.*, 1998). O uso do substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil permite a detecção de quitinases e tem sido freqüentemente usado para distinguir endo e exo quitinases em ensaios com o extrato enzimático bruto ou em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Tronsmo e Harman, 1993).

5.1.4. Atividade Ligninolítica

5.1.4.1. Triagem Inicial para atividade ligninolítica

Após a triagem inicial dos 13 isolados quanto à produção de ligninases em meio ágar BKG suplementado com guaiacol, quatro cepas (FPZ_SP3 47; SP3 75; SP1 129 e SP1 141) apresentaram atividade enzimática positiva, constatada através da geração de cor acastanhada ao redor da colônia conforme a **(Figura 14)**.



Figura 14. Crescimento do fungo em meio ágar BKG acrescido do substrato guaiacol, o qual foi oxidado por enzimas ligninolíticas. O reverso da placa apresenta cor acastanhada ao redor da colônia, indicativo para a produção de enzimas ligninolíticas.

A suplementação do meio de cultivo com substratos indutores de enzimas é um método eficiente para selecionar fungos com potencial enzimático de interesse. O guaiacol é um composto fenólico sintético utilizado como substrato em triagem inicial de enzimas ligninolíticas produzidas por fungos. A partir destes ensaios qualitativos, é possível selecionar isolados com potencial produção de enzimas como a lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) (D'Souza *et al.*, 2006).

Neste contexto, o substrato guaiacol é acrescido em meio sólido MEA para o inóculo de cepas fúngicas. Após o tempo necessário de incubação 07 a 21 dias é possível visualizar a formação de halo acastanhado ao redor da colônia em meios

com ágar guaiacol. O reagente induz a liberação de enzimas ligninolíticas, as quais promovem a oxidação do composto sintético, que pode ser notada através da mudança de cor (D'Souza-Ticlo *et al.*, 2006).

Ang *et al.* (2011) realizaram triagem de atividade ligninolítica de quatro fungos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus sanguineus*, *Phlebia radiata* e *Pleurotus sajor-caju*) em meios de cultura MEA acrescido de guaiacol 0,01% a 35 °C por 06 dias. Segundo os autores, todos os fungos cresceram em ágar guaiacol e apresentaram atividade enzimática positiva. Esse resultado é similar a triagem realizada para as 13 cepas do banco de fungos da compostagem de torta de filtro FPZSP, onde foram selecionados 04 isolados promissores produtores de enzimas oxidativas em condições semelhantes (30 °C por 07 dias).

D'Souza *et al.* (2006) também realizaram triagem de fungos derivados marinhos em meio ágar 11% a 50% de água marinha suplementado com guaiacol 4 mM. Dos 40 fungos marinhos inoculados neste meio de cultivo, apenas três apresentaram atividade enzimática positiva. O meio ágar guaiacol é um método presuntivo na investigação de enzimas ligninolíticas em fungos. Portanto, um bom indicativo de atividade ligninolítica quando comparado a outros substratos como a siringaldazina e RBBR em meios sólidos (Erden *et al.*, 2009; Ang *et al.*, 2011).

A triagem inicial de fungos com potencial atividade ligninolítica baseada em ensaios colorimétricos requer temperatura ótima de crescimento e meio de cultivo suplementado com o substrato adequado. A temperatura interfere nas condições fisiológicas do fungo, podendo potencializar o metabolismo fúngico para a produção de enzimas oxidativas, como também suprimir a produção enzimática e inativar enzimas. O método de triagem inicial é indicativo para enzimas ligninolíticas.

5.1.4.2. Detecção de enzimas ligninolíticas

Os isolados FPZ_SP3 47, SP3 75, SP1 129 e SP1 141, foram submetidos aos ensaios enzimáticos para detecção de lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac). Todas as linhagens (100 %) apresentaram atividade enzimática para lignina peroxidase, enquanto dois isolados (SP3 75, SP1 129) tiveram atividade para manganês peroxidase e apenas um isolado (SP1 129) obteve atividade para lacase em relação ao controle positivo adotado, uma linhagem de *Fusarium* spp. com elevada atividade ligninolítica, esse fungo foi isolado do trato digestório de aves migratórias (irerê) capturadas em áreas circunvizinhas ao lago da FPZSP (Santos, 2014).

Os isolados da torta de filtro utilizados nesse estudo mostraram-se como potenciais produtores de lignina peroxidase, destacando-se as cepas SP3 75 com atividade para LiP e MnP e SP1 129 para MnP e Lac de acordo com a (Figura 15).

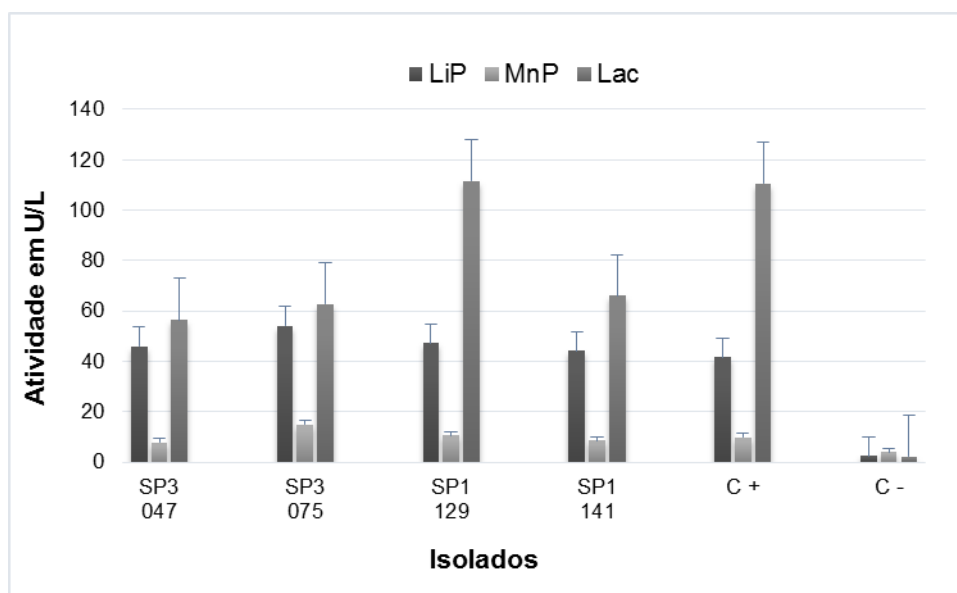


Figura15. A atividade enzimática para LiP, MnP e Lac foram obtidas a partir da média dos valores (triplicatas), como controle positivo foi adotada a linhagem *Fusarium* spp. enquanto o controle negativo é o meio reacional sem inóculo.

Neste contexto, fungos de podridão branca produzem diferentes combinações enzimáticas, ou seja, não é obrigatória a presença de todas as enzimas no micro-organismo. Há fungos produtores de LiP e MnP, bem como fungos produtores de MnP e Lac, e aqueles produtores de LiP e Lac e outros que só produzem LiP ou MnP (Hatakka, 1994).

Tabela 3 Dados da literatura para atividade enzimática de LiP, MnP e Lac em diferentes meios de cultivo: extrato de malte 0,5% suplementado com farelo de trigo 1% (ME0,5%+FT1%); extrato de malte 2% (ME2%); extrato de malte 2% acrescido de água marinha artificial (ME2%+AM); extrato de malte 0,5% + sais minerais (ME0,5%+SM) e extrato de malte 3% (ME3%). (*) Presente estudo (Fonte: O Autor)

Isolados	Enzima	Atividade	Substrato	Referência
<i>Phlebia floridensis</i>	LiP	0,230 U mL ⁻¹	ME0,5%+FT1%	Arora & Gill (2005)
<i>Phlebia floridensis</i>	MnP	0,140 U mL ⁻¹	ME0,5%+FT1%	Arora & Gill (2005)
<i>Phlebia floridensis</i>	Lac	8,040 U mL ⁻¹	ME0,5%+FT1%	Arora & Gill (2005)
<i>Marasmiellus spp.</i>	LiP	2,117 U mL ⁻¹	ME2%	Bonugli-Santos <i>et al.</i> (2012)
<i>Marasmiellus spp.</i>	LiP	1,036 U mL ⁻¹	ME2%+AM	Bonugli-Santos <i>et al.</i> (2012)
<i>Trametes versicolor</i>	LiP	0,640 U L ⁻¹	ME0,5%+SM	Arora & Gill (2001)
<i>Irpex flavus</i>	LiP	1,190 U L ⁻¹	ME0,5%+SM	Arora & Gill (2001)
<i>P. chrysosporium</i>	LiP	2,400 U L ⁻¹	ME0,5%+SM	Arora & Gill (2001)
<i>Polyporus sanguineus</i>	LiP	0,600 U L ⁻¹	ME0,5%+SM	Arora & Gill (2001)
<i>Fusarium sp.</i>	LiP	22,200 U L ⁻¹	ME3%	Santos (2014)
<i>Fusarium sp.</i>	MnP	44, 200 U L ⁻¹	ME3%	Santos (2014)
<i>Fusarium sp.</i>	Lac	8,300 U L ⁻¹	ME3%	Santos (2014)
<i>Mucor sp</i>	LiP	46,048 U L ⁻¹	ME3%	(*)
<i>Trichoderma koningii</i>	LiP	54,194 U L ⁻¹	ME3%	(*)
<i>Trichoderma koningii</i>	MnP	34,345 U L ⁻¹	ME3%	(*)
<i>Byssoschlamys nivea</i>	LiP	47,23 U L ⁻¹	ME3%	(*)
<i>Byssoschlamys nivea</i>	Lac	111,516 U L ⁻¹	ME3%	(*)
<i>Paecilomyces saturatus</i>	LiP	44,194 U L ⁻¹	ME3%	(*)

Comparando-se os resultados para LiP com dados reportados na literatura, os isolados apresentaram alta produtividade em meio extrato de malte 3% como única fonte de carbono. Arora & Gill (2005) relataram elevada produção de lignina peroxidase e lacase para o basidiomiceto *P. floridensis* em meio extrato de malte 0,5% acrescido de farelo de trigo 1% (ME0,5%+FT1%), e não foi detectada a atividade enzimática de LiP em meio extrato de malte 0,5%, mas em meios suplementados e com limitação de nitrogênio (**Tabela 3**).

A produção de LiP pode ser influenciada por diferentes condições nutricionais como a taxa de carbono/nitrogênio, pH e temperatura ótima. Bonugli-Santos *et al.* (2012) estudaram fungos derivados de ambientes marinhos, visando avaliar a produção de LiP em 7 dias nos diferentes meios de cultivos, extrato de malte 2% (ME2%) e extrato de malte acrescido de água marinha artificial (ME2% + AM). Em ambos os cultivos, foram detectadas atividade enzimática de lignina peroxidase para *Marasmiellus spp.* CBMAI 1062 com significativa produção de LiP. Entretanto, esses resultados são similares aos obtidos por Arora & Gill (2005) em meios de cultivos suplementados, e inferiores se comparados com os isolados da compostagem da torta de filtro cultivados em ME3% como única fonte de carbono.

Em estudo anterior de Arora e Gill (2001), quatro linhagens distintas foram submetidas a ensaios de atividade enzimática para LiP, cultivadas em meio extrato de malte 0,5% acrescido de sais minerais a 25 ° C por 7 dias em condição estacionária. As quatro cepas apresentaram atividade para LiP muito inferiores ao controle positivo adotado no presente estudo que serve como parâmetro para as linhagens provenientes da compostagem de torta de filtro. O tipo de fonte de carbono pode influenciar a atividade enzimática, bem como o acréscimo de

indutores pode ou não suprimir a produção de lignina peroxidases (Kirk & Farrel, 1987).

5.1.5. Atividade de Mono-oxigenases

No ensaio de transformação de indol a índigo, (13) isolados foram cultivados em meio mineral suplementado com extrato de malte (3%) e naftaleno como substrato indutor. Um isolado (SP3 05) foi selecionado com atividade enzimática para oxigenase. Esse resultado sugere a presença de “naftaleno mono ou di oxigenase” capaz de converter indol e seus derivados em índigo. A taxa de transformação máxima foi $0,518 \text{ mMmin}^{-1}$. Após 15 minutos, a concentração de índigo diminuiu 1,24 vezes (**Figura 16**).

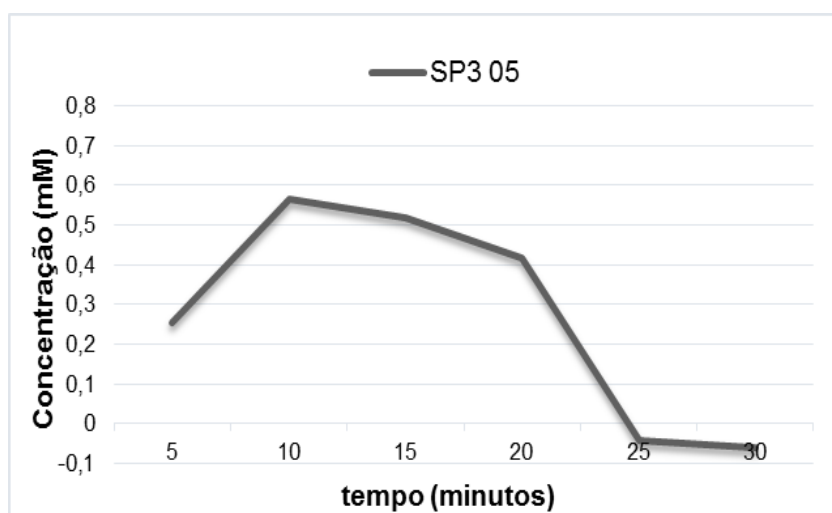


Figura 16. Concentração de índigo em mM/min estimada através da média de triplicatas dos valores de absorbância no comprimento de onda 610 nm, a concentração foi calculada a partir da equação da reta obtida por meio da curva padrão de índigo.

A atividade de oxigenases pode ser detectada em ensaios colorimétricos baseado no Reagente de Gibbs (2,6-dicloroquinona-4-cloroimida); 4-AAP (4-aminoantipirina) e Indol (Joern *et al.*, 2001; Johannes, *et al.*, 2006). Ensaio com o Reagente de Gibbs e 4-AAP são muito semelhantes nos produtos que são capazes de detectar, e ambos reagem fortemente com os compostos fenólicos orto e meta

substituindo-os por compostos intensamente coloridos (Colonna *et al.*, 1999; Johannes, *et al.*, 2006). Entretanto, 4-AAP tem sido utilizado em triagens de alto rendimento, enquanto o Reagente de Gibbs é empregado em ensaios de evolução dirigida de oxigenases (Veitch & Smith 2001).

Já indol pode ser oxidado por mono ou di oxigenases em diferentes posições, sendo que os compostos formados dimerizam aos compostos índigo e indirubina, ambos os produtos gerados são intensamente coloridos e detectados (Johannes *et al.*, 2003). O indol é um composto aromático, o qual pode ser sintetizado por bactérias que degradam o triptofano através da enzima triptofanase (Ensley *et al.*, 1983). Portanto, o ensaio de transformação de indol e seus derivados a índigo possibilitam a seleção de micro-organismos capazes de sintetizar mono ou di-oxigenases constitutivas ou induzidas no âmbito de atividade enzimática (O'Connor *et al.*, 1998). Além disso, extensos estudos têm utilizado esse método para biossintetizar índigo microbiano, visando à produção em escala comercial (O'Connor & Hartmans, 1998).

Ensley e colaboradores (1983) desenvolveram o método microbiano para produzir índigo a partir da transformação de indol. Para tanto, construíram *E. coli* mutante contendo genes bacterianos de *P. putida* 9816-11, cultivado em meio mineral suplementado com naftaleno. A oxidação de indol a índigo foi realizada pela “naftaleno di-oxigenase”, enzima codificada pelo organismo recombinante.

Nesse contexto, a maioria dos micro-organismos produtores de índigo microbiano são degradadores de hidrocarbonetos aromáticos, responsáveis pela síntese de oxigenases quando cultivados em meios contendo compostos aromáticos como indutores. Estudos realizados com bactérias conseguiram detectar mono ou di

oxigenases presentes em *Pseudomonas putida* PgG7 degradadora de naftaleno (Ensley *et al.*, 1983); *P. putida* mt-2 degradadora de tolueno (Eaton *et al.*, 1995) e *P. putida* CA-3 e S12 degradadoras de estireno (O'Connor *et al.* 1997).

Entre os fungos, alguns têm sido investigados quanto a habilidade para degradar indol. Arora *et al.* (2015) relataram que *Aspergillus niger* é capaz de oxidar indol em outros compostos, desencadeando uma cascata de transformações. Já o fungo endofítico *Phomopsis liquidambari* utiliza indol como única fonte de carbono e nitrogênio, inicialmente oxida-o a oxindole e isatina.

No presente estudo, o ensaio indol foi direcionado à detecção de atividade enzimática de oxigenases. Tais biocatalisadores poderão constituir um eficiente incremento aos consórcios/complexos enzimáticos em processos de hidrólise de resíduos lignocelulósicos visando a obtenção de etanol de segunda geração.

5.3. Caracterização Fenotípica e Molecular dos Isolados de Interesse

A partir da caracterização morfológica dos 13 isolados foi possível identificar fungos pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Geotrichium*, *Byssochlamys* e *Paecilomyces*. Além da caracterização macro e microscópica, a identificação através de técnicas moleculares, cujo o sequenciamento da região ITS do DNA ribossômico, resultou na identificação de gêneros e espécies de fungos em concordância com a caracterização fenotípica.

Dentre os treze isolados, 9 foram identificados em nível de gênero e espécie (**Figura 17**).

Isolados	Gênero	Espécie
SP3 001	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
SP3 005	-	-
SP3 047	<i>Mucor</i>	sp.
SP3 072	-	-
SP3 074	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
SP3 075	<i>Trichoderma</i>	<i>koningii</i>
SP3 091	<i>Geotrichium</i>	<i>candidum</i>
SP2 121	-	-
SP1 129	<i>Byssochlamys</i>	<i>nivea</i>
SP1 135	-	-
SP1 141	<i>Paecilomyces</i>	<i>saturatus</i>
SP1 148	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
SP1 151	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>

Figura 17. Identificação taxonômica realizada através do sequenciamento da região ITS dos isolados de interesse utilizados nos ensaios de atividade enzimática.

Dentre os isolados da compostagem de torta de filtro, quatro foram identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Os isolados (SP3 01) e (SP3 74) como *Aspergillus niger* e (SP1 148) e (SP1 151) como *Aspergillus fumigatus*. Esse gênero é saprófito e ubíquo, cresce e sobrevive em uma variedade de restos orgânicos presentes no solo (Hirsh & Zee, 2003). E ambas as espécies são relatadas amplamente na literatura como produtoras de enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases, proteases, lipases, amilases e pectinases) (Gutierrez-Rojas *et al.*, 2015; Soleiro, 2012; Bon *et al.*, 2008; De Vries & Visser, 2001). Entretanto, há poucos estudos relatando a presença de enzimas oxidativas nessas espécies.

O isolado (SP3 47) foi identificado como *Mucor spp.*, o qual é descrito como saprófita, presente no solo, em restos de plantas, flores e frutos e também em fezes de herbívoros (Alves *et al.*, 2002). Esse gênero produz várias enzimas como amilase, lipase, protease e pectinase (Domsch *et al.* 1995, Petruccioli e Federici 1992).

O isolado (SP3 75) caracterizado como *Trichoderma koningii* está presente em quase todos os tipos de solo, principalmente onde há matéria orgânica (Esposito e Silva, 1998). Pode ser “facilmente isolado, cultivado e multiplicado, é colonizador do sistema radicular de diversas plantas” (Lucon, 2008). De um modo geral, esse gênero é extremamente reconhecido como produtor de enzimas hidrolíticas, com destaque para as celulasas (Kubicek, 1992). A espécie *T. koningii* também é capaz de sintetizar celulasas e ligninases (Sanchez, 2009), além de lipase (Marques *et al.*, 2012) e quitinases (Henkin *et al.*, 2013).

O isolado (SP3 91), identificado como *Geotrichium candidum*, pode ser isolado do “solo, água e produtos lácteos” (Marcellino *et al.*, 2001). Essa espécie é capaz de produzir lipase (Marcelino *et al.*, 2001; Maldonado, 2006) e celulasas (Witkowska e Piegza, 2006; Rodionowa *et al.*, 2000).

O isolado (SP1 129) identificado como *Byssochlamys nivea* tem como habitat o solo e frutos (Chapman *et al.*, 2007). Esse fungo provoca a deterioração de “produtos à base de frutas” por meio da ação de enzimas pectinolíticas, proteases e lipases (Bosso *et al.*, 2015; Ferreira, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011).

O isolado (SP1 141) caracterizado como *Paecilomyces saturatus*, é um fungo saprófita que tem como habitat o solo, folha, flores e raízes de vegetais. O gênero *Paecilomyces* é capaz de produzir protease, quitinase e lipase (Sejas, 2002) e ligninases (Andrade, *et al.*, 2005).

A identificação taxonômica por técnicas moleculares dos isolados (SP3 05), não foi possível, pelo fato de não ter-se conseguido qualidade nas sequências obtidas, enquanto os isolados (SP3 72), (SP2 121) e (SP1 135) os respectivos meios

de cultura em placas de Petri foram contaminados, não sendo possível sua utilização nos procedimentos de extração de DNA, PCR e sequenciamento.

Dentre os treze isolados de interesse da compostagem de torta de filtro identificados, quatro linhagens foram capazes de produzir a tríade de enzimas celulase, protease e quitinase ou celulase, quitinase e ligninase. *A. niger* e SP3 72 são produtores de enzimas hidrolíticas, enquanto *Trichoderma koningii* (SP3 75) e *Byssoschlamys nivea* (SP1 129) produzem hidrolases e oxidases. Além disso, há fungos produtores de dois tipos de enzimas quitinase e ligninase como *Mucor* sp (SP3 47) e *Paecilomyces saturatus* (SP1 141), enquanto *A. niger* (SP3 74) e (SP2 121) são produtores de celulase e quitinase e (SP1 135) é produtor de protease e quitinase. Já os isolados *Geotrichum candidum* (SP3 91) produz celulase e os dois isolados de *A. fumigatus* (SP1 148 e SP1 151) produzem quitinases (**Quadro 2**).

Isolados	Identificação	Atividades Enzimáticas
SP3 001	<i>Aspergillus niger</i>	Celulase, Protease, Quitinase
SP3 005	-	Quitinase, Mono-oxigenase
SP3 047	<i>Mucor</i> sp	Quitinase, Ligninase,
SP3 072	-	Celulase, Protease, Quitinase
SP3 074	<i>Aspergillus niger</i>	Celulase, Quitinase
SP3 075	<i>Trichoderma koningii</i>	Celulase, Quitinase, Ligninase
SP3 091	<i>Geotrichum candidum</i>	Celulase
SP2 121	-	Celulase, Quitinase
SP1 129	<i>Byssoschlamys nivea</i>	Celulase, Quitinase, Ligninase
SP1 135	-	Protease, Quitinase
SP1 141	<i>Paecilomyces saturatus</i>	Quitinase, Ligninase
SP1 148	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Quitinase
SP1 151	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Quitinase

Quadro 2. Resumo das atividades enzimáticas dos isolados de interesse.

Nesse contexto, entre os 13 isolados, quatro são promissores fungos produtores de hidrolases ou hidrolases e oxidases. *A. niger* (SP3 1), tem elevada

atividade celulolítica em pH ácido, bem como metalo protease alcalina e endo/exoquitinases, seguido de (SP3 72) com habilidade para sintetizar celulase, protease ácida e endo/exoquitinases, *Trichoderma koningii* (SP3 75) cuja atividade celulolítica foi expressiva em pH ácido, além de LiP e endo/exoquitinases e *Byssochlamys nivea* (SP1 129) produtor de celulase, quitinase e LiP/Lac.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados dos ensaios de atividades enzimáticas baseados em triagens de alto desempenho para os treze isolados de interesse, sugerem que os fungos da compostagem de torta de filtro são produtores de enzimas hidrolíticas e oxidativas.

Além disso, também foi constatada a eficiência das análises miniaturizadas, as quais detectaram fungos produtores de enzimas de interesse ao incremento da produção de etanol celulósico. Dentre os treze isolados, *A. niger* (SP3 1), (SP3 72), *Trichoderma koningii* (SP3 75) e *Byssochlamys nivea* (SP1 129) foram os mais promissores nas atividades enzimáticas.

Os isolados promissores serão selecionados para ensaios futuros visando a otimização de meios de cultivos e substratos a fim de se obter elevada atividade enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B.B. et al. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Mar Drugs**. 8, 5, 1482-1517, 2010.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Quim. Nova** 34. n. 10, 1729-1738, 2011.

ALMEIDA JÚNIOR, A. et al. Fertilidade do solo e absorção de nutrientes em cana-de-açúcar fertilizada com torta de filtro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v.15, n.10, p.1004-1013, 2011.

ALVARENGA, R. P.; QUEIROZ, T. R. Produção mais Limpa e Aspectos Ambientais na Indústria Sucroalcooleira. In: 2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production 20-22 may São Paulo, Brazil, 2009.

ALVES, M.H. Táxons de *Mucor* Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, 25, 2, 147-160, 2002.

ANDRADE, J. L. **Peroxidases de *Paecilomyces variotii* e sistemas biomiméticos na oxidação de isossafrol**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

ANG, T. N. et al. A quantitative method for fungal ligninolytic enzyme screening studies. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**. 06, 589–595, 2011.

ÂNGELO, R.S. Enzimas Hidrolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2 ed. rev. Caxias do Sul: Educs, 2010, 215-242p.

ARORA, D.S.; GILL, P.K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresour.Technol.** 77 (1), 89-91, 2001.

ARORA, D.S.; GILL, P.K. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 1021-1028, 2005.

ARORA, P.K. et al. Review Article Microbial degradation of indole and its derivatives. **Journal of Chemistry**. 2015, 1-13.

ATKINSON, C.F. et al. Biodegradability and microbial activities during composting of poultry litter. **Compost Science and Utilization**. 14-23, 1996.

- BAJZA, Z.; VRCEK, V. Thermal and enzymatic recovering of proteins from untanned leather waste. **Waste Management**. 21, 79-84, 2001.
- BALDRIAN, P. Fungal Laccases – occurrence and properties. **FEMS**. 30, 215-242, 2006.
- BARRETT A.J. et al. Handbook of Proteolytic Enzymes. V.1. London: Academic. 1998.
- BEESON, W.T. et al. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. Review in Advance first, 2015
- BECK-FRIIS, B., et al. Gaseous emissions of carbon dioxide, ammonia and nitrous oxide from organic household waste in a compost reactor under different temperature regimes. **Journal of Agricultural Engineering Research** 78, 423–430, 2001.
- BEFFA, T. et al. Isolation of *Thermus* Strains from hot composts (60-80 °C). **Applied and Environmental Microbiology**, 1723-1727, 1996.
- BRZEZINSKA, M.S. et al. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Curr Microbiol** 68, 71-81, 2014.
- BIESEMEYER, K.F. **Variação nictemeral da estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica em função da temperatura da água nas épocas de seca e chuva em reservatório urbano raso mesotrófico (Lago das Ninféias), Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo**. Dissertação (Mestrado). 162p. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BONUGLI-SANTOS, R.C. et al. The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents. **Water Air Soil Pollut**. 223. 2333-2345, 2012.
- BON, E.P.S. et al. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E.P.S. et al. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 241-271.
- CASTELLANI, A. The Water Cultivation of Pathogenic Fungi. **Ann. Soc. Belge Medicine Tropical**. 44, 2, 217-220, 1964.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**. 33, 1, 181-188, 2010.
- CAVALCANTI, S.D.B. **Aplicação de Metodologias de Preservação e Caracterização de Fungos na Coleção de Culturas do Instituto de Medicina**

Tropical de São Paulo. Dissertação (Mestrado). 74p. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHERNIN, L. S. et al. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**. 4435-4441, 1998

CHOUYYOK, W. et al. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR25 fermentation broth. **Process Biochem**. 40, 3514–3518, 2005.

CHRONI, C. et al. Microbial characterization during composting of biowaste Microbial. **Waste Management**, 1520-1525, 2009.

COELHO, M.A.Z. et al. Tecnologias Enzimáticas. Petrópolis: EPUB, 2008, 288p.

CRUZ, J.B. (2004). O processo de compostagem como instrumento de preservação ambiental na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). In: I Simpósio sobre compostagem, Ciência e Tecnologia 19-20 ago, 2004, Botucatu. Pôster São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2004.

DAHIYA, N. et al., Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**. 71: 773–782, 2006.

DESAI, SS.; NITYANAND, C. Microbial laccases and their applications: a review. **Asian Journal of Biotechnology**. 3. 98-124, 2011.

DIONISI, D. et al. The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. **J Chem Technol Biotechnol**. 90, 366-383, 2015.

DOMSCH, K.H. et al. **Compendium of soil fungi**. IHW-Verlag, Alemanha, 1995.

D'SOUZA, T.M. et al. Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology** 5307-5313, 1999.

D'SOUZA, D.T. et al. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**. 38, 504-511, 2006.

D'SOUZA-TICLO, D. et al. Effect of nutrient nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC # 2a, isolated from mangrove wood. **Indian Journal of Marine Sciences**. 35 (4), 364-372, 2006.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**. 161, 345-360, 2006.

DURÁN N. Enzimas Ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2 ed. rev. Caxias do Sul: Educs, 2010, 215-242p.

EATON, R.W. et al. Formation of indigo and related compounds from indolecarboxylic acids by aromatic acid-degrading bacteria: chromogenic reactions for cloning genes encoding dioxygenases that act on aromatic acids. **J. Bacteriol.** 177, 6983-6899, 1995.

EGGERT, C. et al. Laccase is essencial for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **FEBS Letters** 407, 89-92, 1997.

ERDEN, E. et al. Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of remazole marine blue. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40, 346-353, 2009.

ENSLEY, B.D. et al. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of índigo. **Science**, 22, 167-169, 1983.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2 ed. rev. Caxias do Sul: Educs, 2010, 638p.

FARRELL, R. L. et al. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme Microb. Technol.** 11, 322-326.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2 ed. rev. Caxias do Sul: Educs, 2010, 215-242p.

FERRARI, A. et al. A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection. **Biotechnology for biofuels**, 7, 2014.

FRACCHIA, L. et al. The assessment of airborne bacterial contamination in three composting plants revealed site-related biological hazard and seasonal variations. **Journal of Applied Microbiology**, 973-984, 2006.

FUENTE-HERNÁNDEZ, A. et al. Biofuels and Co-products out of hemicelluloses. In: FANG, Z. Liquid, Gaseous and Solid Biofuels – Conversion. In Tech, 2013, 03-35p.

GALANTE, R.S. et al. Purification, characterization and structural determination of chitinases produced by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. 84, 469-486, 2012.

- GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2 ed. rev. Caxias do Sul: Educs, 215-242p, 2010.
- GRAY, K.A. et al. Bioethanol. **Current Opinion in Chemistry Biology**. v. 10, n. 2, 141-146, 2006.
- GOCHEV, V.K. et al. Fungal Laccases. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 13, 75-83, 2007.
- GOODAY, G.W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. **Biodegradation**. 1, 177-190, 1990.
- GONÇALVES, C.C.S.; MARSAIOLI, A. J. Monitorando atividades enzimáticas com sondas fluorogênicas. **Quim. Nova**. 37, 6, 1028-1036, 2014.
- GONÇALVES S.S. et al. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. Medical Mycology, 1-9, 2012.
- GRISOLI, P. et al. Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. **Environ Res**. 109-135, 2009.
- GUTIÉRREZ-ROJAS, I. et al. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa em hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. **Revista Iberoamericana de Micología**. 32 (1), 01-12, 2015.
- GUO, Z-P. et al. Expression of aspartic protease from *Neurospora crassa* in industrial ethanol-producing yeast and its application in ethanol production. **Microbial Technol**. 48: 148-154, 2011.
- HATAKKA, A.I. et al. Lignin modifying enzymes from selected white-rot fungi: productions and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol**. 153, 125-135, 1994.
- HENKIN, N.C.N. Produção e atividade antifúngica de quitinases produzidas por *Trichiderma koningii* e *Penicillium funiculosum*. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia 29 set-03 out, 2004, Natal. Pôster Congresso Brasileiro de Microbiologia: Universidade Federal Mato Grosso do Sul, 2013.
- HERRMANN, R.F.; SHANN, J.F. Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. **Microbio Ecology**. 33, 78-85, 1997.
- HORN, S.J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 5, 45, 2012.

- HUBBE, M.A. et al. Composting as a way to convert cellulosic biomass and organic waste into high-value soil amendments: a review. **BioResources** 5(4), 2808-2854, 2010.
- HURLEY, M.J. et al. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. **Intern. Dairy J.** 10, 673-681, 2000.
- JOHANNES, T.W. et al. High-throughput screening methods developed for oxidoreductases. In: REYMOND, J.L. Enzyme assays: high-throughput screening, genetic selection and fingerprinting, 2006.
- KARTHIK, N. et al. Production, purification and properties of fungal chitinases – a review. **Indian Journal of Experimental Biology**. 52, 1025-1035, 2014.
- KIRK, T. K. Lignin-degrading enzymes. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. A**. 321, 465-505, 1987.
- KOFFLER, N. F.; DONZELLI, P. L. Avaliação dos solos brasileiros para a cultura da cana-de-açúcar. In: Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas, Fundação Cargill, v.1, p. 19. 1987.
- KUBICEK, C.P. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology** 163. 133-142, 2013.
- KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.** 169. 247-250, 1984.
- LAUER G. et al. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. **J Invest Dermatol** 115:12, 2000.
- LEE, H. et al. Degrading ability of oligocyclic aromates by *Phanerochaete sordid* selected via screening of white-rot fungi. **Folia Microbiol**, 55 (5), 447-453, 2010.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3 ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152p.
- LI, C. et al. Effect of pH on cellulose production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **Journal of Biotechnonology**. 168, 470-477, 2013.
- LOUIME, C.; UCKELMANN, H. Cellulosic ethanol: securing the planet future energy needs. **Int. J. Mole. Sci.** 9, p. 838-841, 2008.

LUCON, C.M.M. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. **Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal**. 77, 2008.

Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77>. Acesso em: 27 mai 2015.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 66. 3. 506-577, 2002.

MACHADO, K.M.G. et al. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**. 246-252, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004, 463p.

MAGRINI, M.J. **Degradação de HPAs e Produção de Enzimas Ligninolíticas por Fungos Basidiomicetos Derivados de Esponjas Marinhas**. Dissertação (Mestrado). 112p. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MALDONADO, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Dissertação (Mestrado). 142p. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MANAVALAN, T. et al. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. **Curr Microbiol**, 70, p.485-498, 2015.

MARCELLINO, N. et al. Diversity of *Geotrichum candidum* Strains Isolated from Traditional Cheesemaking Fabrications in France. **Applied and Environmental Microbiology**. 67, 10, 4752-4759, 2001

MATSUMOTO, K.S. Fungal chitinases. **Advances in Agricultural and Food Biotechnology**, 289-304, 2006.

MARQUES, T.A. Lipase de *Trichoderma koningii*: efeito da temperatura e do pH na atividade da enzima In: XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia 28 out-01 nov, 2012, Santos. Pôster XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia: Universidade Estadual de Londrina, 2012.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**. 553-560, 2008.

MASCOTTI, M.L. Insights in the kinetic mechanism of the eukaryotic Baeyer-Villiger monooxygenase BVMOAf1 from *Aspergillus fumigatus* Af293. **Biochimie**. 107. 270-276, 2014.

MCKINLEY, V.L.; VESTAL, R. Physical and Chemical Correlates of Microbial Activity and Biomass In Composting Municipal Sewage Sludge. **Applied and environmental microbiology** 50 (6), 1395-1403, 1985.

MERHEB-DINI, C. et al. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **J. Agric. Food Chem.** 57, 9210-9217, 2009.

MENEZES, C. R. et al. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos** v5, n.1, 68-78, 2009.

NARDIN, R. R. **Torta-de-filtro aplicada em argissolo e seus efeitos agronômicos em duas variedades de cana-de-açúcar colhidas em duas épocas**. Dissertação (Mestrado). 39p. Instituto Agronômico, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

O'BRIEN, H.E. et al. **Applied and Environmental Microbiology**. 5544-5550, 2005.

O'CONNOR, K.; HARTMANS, S. Indigo formation by aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. **Biotechnology Letters**, 20. 3, 219-223, 1998.

O'CONNOR, K.E. et al. Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. **Applied and Environmental Microbiology**. 63, 11. 4287-4291, 1997.

OLIVEIRA, L.C.G. et al. Internally Quenched fluorescent peptide libraries with randomized sequences designed to detect endopeptidases. **Analytical Biochemistry**. 421, p.299-307, 2012.

PALOUVÁ, L. et al. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnol Adv.** 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.002>>. Acesso em 18 mai 2015.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. 69-80, 2000.

PASSARINI, M.R.Z. Caracterização da Diversidade de Fungos Filamentosos Associados a Esponjas Marinhas e Avaliação da Produção de Lacase. Tese (Doutorado). 112p. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

PASSARINI, M.R.Z. Avaliação do Potencial Biotecnológico e Taxonomia Polifásica de Fungos Filamentosos Isolados de Compostagem de Torta de Filtro de Refinaria. Relatório (Pós-Doutorado). 40p. Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2015.

PATIL, R.S. et al. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbiol Technology** 26, 473-483, 2000.

PEIXOTO, C.R.M. et al. Miniprojeto para ensino de química geral experimental baseado na fermentação do caldo de cana-de-açúcar. **Química Nova**. 1686-1691, 2012.

PETERS, S. et al. Succession of Microbial Communities during Hot Composting as Detected by PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based Genetic Profiles of Small-Subunit rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, p.930-936, 2000.

PETRUCCIOLI, M.; FEDERICI, R.G. A note on the production of extracellular hydrolitic enzymes by yeast-like fungi and related microorganisms. *Annals Microbiology and Enzimology* 42:81-86, 1992.

PRINS, R.A.; STEWART, C.S. Micro-organisms in ruminant nutrition : a seminar in the EU programme of co-ordination of agricultural research on anaerobic fungi and their role in the nutrition of extensively fed ruminants. In: DeBron Conference Centre, Dalfsen, oct 13-15, 1993, Netherlands.

RAGAUSKAS, A.J. et al. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**. 484-489, 2006.

RAGHUWANSHI, S. et al. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**. 124, 183-189, 2014.

RAMOS, G.F.C. **Atividade Celulolítica e Proteolítica de Bactérias Isoladas do Trato Gastrointestinal e do Processo de Compostagem dos Restos Orgânicos de Hipopótamo**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2013.

RAO, M. ET al. Molecular and biotechnology aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62, 597-635, 1998.

REIMERDES, E.H.; KLOSTERMEYER, H. Determination of Proteolytic Activities on Casein Substrates. In: COLOWICK, S.P. KAPLAN, N.O. *Methods in Enzymology*. V. 45. Academic Press 1976, 1-943.

Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=4rGSwrP2pUEC&pg=PA26&lpq=PA26&dq=ernest+h+reimerdes+klostermeyer+proteolytic+enzymes&source=bl&ot>>

s=wEYcT7xv3P&sig=CJCXT_wYV-oF9-tMcvGasp8KB3Y&hl=pt-BR&sa=X&ei=CpWVaH3MsWxggSTqoGwBw&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q&f=false>
Acesso em: 15 mai 2015.

ROCHA, K. **Decomposição no solo da torta de filtro derivada do processamento da cana-de-açúcar: emissão de gases de efeito estufa e aspectos microbiológicos**. 98p. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.** v.27. n. 02, 205-211, 2004.

RYCKEBOER, J. et al. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. **Journal of Applied Microbiology**. 94, 127-137, 2003.

RYU, D.Y., MANDELS, M. Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v.2, p.91-102, 1980.

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host – parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**. 11, 317-338, 1993.

SAITO, T. et al. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. **Enzyme and Microbial Technology**. 33, 520-526, 2003.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances** 27, 185-194, 2009.

SANMAN, L.E.; BOGYO, M. Activity-Based Profiling of Proteases. **Annu. Rev. Biochem.** 83. 249–73, 2014.

SANTOS, F.A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SANTOS, D. H. et al. Efeito residual da adubação fosfatada e torta de filtro na brotação de soqueiras de cana-de-açúcar. **Revista Agrarian**, Dourados, v.5, n.15, p.1-6, 2012.

SANTOS, M.P. **Caracterização e Triagem Ligninolítica de Fungos Filamentosos Isolados de Aves Migratórias Provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo**. Dissertação (Mestrado). 85p. Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2014.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**. 22, 36-42, 2008.

SEJAS, F. **Análise e quantificação de enzimas produzidas pelo fungo endofítico entomopatogênico *Paecilomyces spp.* isolado da soja (*Glycine max* (L.) Merrill).** Monografia (Graduação) - Universidade Federal do Paraná, 2002. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/36755/Monografia%20Flavia%20Sejas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 27 mai 2015.

SCHNEIDER, C.F. et al. Fomas de Gestão e Aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando a redução de impactos ambientais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Mossoró, v. 7, n. 5, p. 08-17, 2012.

SHARMA, V. et al. Chitinase expression due to reduction in fusaric acid level in an antagonistic *Trichoderma harzianum* S17TH. **Indian J. Microbiol.** 53, 214-220, 2013.

SHRADDHA, R.S. Laccase: microbial sources, production, purification, and potencial biotechnological applications. *Enzyme research*. 1-11, 2011.

SILVA, D.F. **Seleção de Microrganismos Celulolíticos, Imobilização e Aplicação das Celulasas, Produzidas e Comercial, na Hidrólise da Celulose.** Dissertação (Mestrado). 87p. Instituto de Biociências, Rio Claro, 2012.

SOLEIRO, C.A. Caracterização de *Aspergillus fumigatus* isolados de diferentes origens quanto ao perfil enzimático, genético e produção de gliotoxina. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

TRONSMO, A.; HARMAN, G.E. Detection and quantification of N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase and endochitinase in solutions and on gels. **Analytical Biochemistry**, 208, 74-79, 1993.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. 72. 169-183, 2000.

VALENTE, B.S. et al. Fatores que Afetam o Desenvolvimento da Compostagem de Resíduos Orgânicos. **Archivos de Zootecnia**. Pelotas, 58, p. 59-85, 2009.

VEITCH, N.C.; SMITH, A. Horseradish peroxidase, *Advances in Inorganic Chemistry*, 14, 24, 107-167, 2001.

VERMAAS, J.V. et al. Effects of lytic polysaccharide monooxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulases. **The Journal of Physical Chemistry**, 01-49, 2015.

VERMELHO, A.B. et al. Enzimas Proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E.P.S. et al. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E.P.S. et al. Enzimas em

Biotecnologia: produção, aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 241-271.

XIAO, Z. et al. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulose activity. **Biotechnology and Bioengineering** v.8. n.7, 832-837, 2004.

YANG, S.J. et al. *J Microbiol.* 17-23, 2009.

YANG, J.K. Production of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enz. Microb. Technol.**, 26, 406-423, 2000.

ZANPHORLIN, L.M. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**. 46, 2137-2143, 2011.

ZHANG, P.Y.H. et al. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**. 452-481, 2006.

ZHANG, G. Protease Assays. In: HOLLER, T.; NAPPER, A. Assay Guidance Manual. 2012. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92006/>>. Acesso em: 14 mai 2015.

ZHAO, X.Q. Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. **Adv Biochem Engin/Biotechnol.**128. 25-51, 2012.

WANG, K.K.W. Detection of Proteolytic Enzymes Using Protein Substrates. In: Sterchi, E.E.; Stöcker,W. Proteolytic Enzymes. Springer Lab Manual, p. 49-62. 1999.

WANG, M. et al. Cellulolytic Enzyme Production and Enzymatic Hydrolysis for Second-Generation Bioethanol Production. **Adv Biochem Engin/Biotechnol.** 128. 1–24, 2012.

APÊNDICE

8. APÊNDICE

8.1. APÊNDICE A

Resultados dos ensaios para a quantificação da atividade celulolítica, utilizando papel de filtro como substrato celulósico nos pHs 4,8 e 7,4. O fungo *Trichoderma reesei* foi utilizado como parâmetro positivo no presente ensaio.

Isolados	pH	Média		pH	Média	
		Abs	FPU/mL		Abs	FPU/mL
SP3 001	4,8	0,424	0,123	7,4	0,220	0,064
SP3 005	4,8	0,205	0,060	7,4	0,242	0,070
SP3 047	4,8	0,236	0,069	7,4	0,204	0,059
SP3 072	4,8	0,245	0,071	7,4	0,296	0,086
SP3 074	4,8	0,290	0,084	7,4	0,193	0,056
SP3 075	4,8	0,293	0,085	7,4	0,156	0,045
SP3 091	4,8	0,181	0,053	7,4	0,266	0,077
SP2 121	4,8	0,290	0,084	7,4	0,230	0,067
SP1 129	4,8	0,143	0,042	7,4	0,191	0,056
SP1 135	4,8	0,197	0,057	7,4	0,204	0,059
SP1 141	4,8	0,189	0,055	7,4	0,215	0,063
SP1 148	4,8	0,049	0,014	7,4	0,053	0,015
SP1 151	4,8	0,047	0,014	7,4	0,046	0,013
<i>Trichoderma reesei</i>	4,8	0,273	0,156	7,4	0,383	0,111

8.2. APÊNDICE B

Resultados dos ensaios para a quantificação da atividade quitinolítica determinada através do kit *Fluorimetric Chitinase Assay*. Como parâmetro positivo foi utilizada enzima de *Trichoderma viride* presente no kit.

Isolados	Média		Média		Média	
	FLU	4-MU-GlcNac	FLU	4-MU-(GlcNAc)2	FLU	4-MU-(GlcNAc)3
SP3 001	47600	0,7333	24000	0,2675	23965	0,2792
SP3 005	23000	0,347	11545	0,1256	22650	0,2635
SP3 047	28250	0,4295	3490	0,0338	2800	0,0274
SP3 072	31250	0,4766	25690	0,2867	14800	0,1701
SP3 074	93650	1,4564	28440	0,318	20015	0,2322
SP3 075	66900	1,0364	69325	0,7838	67165	0,7931
SP3 091	1505	0,0095	2075	0,0177	965	0,0055
SP1 121	39800	0,6108	12085	0,1317	4150	0,0434
SP1 129	49150	0,7576	9215	0,099	12390	0,1415
SP1 135	55400	0,8558	36950	0,415	44800	0,5271
SP1 141	26768	0,4062	12240	0,1335	11035	0,1253
SP1 148	96400	1,4996	38370	0,4311	17590	0,2033
SP1 151	19400	0,2905	29869	0,3343	20100	0,2332
<i>T. viride</i>	8500	0,1193	19300	0,2139	5625	0,061

8.3. APÊNDICE C

Resultados dos ensaios para a quantificação da atividade ligninolítica a 28 °C por 7 dias, em duplicata. O fungo *Fusarium* sp foi utilizado como parâmetro positivo no presente ensaio.

LiP	Abs - A	Abs - B	UL ⁻¹ - A	UL ⁻¹ - B	Média
SP3 75	1,129	0,887	60,699	47,688	54,194
SP3 47	0,851	0,862	45,753	46,344	46,048
SP1 141	0,836	0,808	44,946	43,441	44,194
SP1 129	0,874	0,883	46,989	47,473	47,231
<i>Fusarium</i> sp	0,8	0,747	43,011	40,161	41,586

MnP	Abs - A	Abs - B	UL ⁻¹ - A	UL ⁻¹ - B	Média
SP3 75	0,183	0,15	37,749	30,942	34,345
SP3 47	0,082	0,092	16,915	18,978	17,946
SP1 141	0,106	0,088	21,865	18,152	20,009
SP1 129	0,127	0,111	26,197	22,897	24,547
<i>Fusarium</i> sp	0,113	0,108	23,309	22,278	22,794

Lac	Abs - A	Abs - B	UL-1 - A	UL-1 - B	Média
SP3 75	1,593	1,083	74,672	50,766	62,719
SP3 47	1,146	1,258	53,719	58,969	56,344
SP1 141	1,615	1,2	75,703	56,25	65,977
SP1 129	2,386	2,372	111,844	111,188	111,516
<i>Fusarium</i> sp	2,282	2,437	106,969	114,234	110,602

8.4. APÊNDICE D

Resultados dos ensaios para a atividade de mono-oxigenases a 28 °C por 4 dias, em triplicata.

Isolados	Média					
	Abs 5 min	Abs 10 min	Abs 15 min	Abs 20 min	Abs 25 min	Abs 30 min
SP3 001	0,105	0,262	0,234	0,06	0,202	0,272
SP3 005	0,23	0,367	0,346	0,302	0,099	0,091
SP3 047	0,226	0,102	0,379	0,304	0,16	0,079
SP3 072	0,129	0,346	0,11	0,158	0,221	0,141
SP3 074	0,129	0,085	0,237	0,096	0,274	0,088
SP3 075	0,099	0,187	0,095	0,083	0,098	0,119
SP3 091	0,044	0,064	0,32	0,053	0,193	0,179
SP2 121	0,145	0,282	0,106	0,049	0,127	0,057
SP1 129	0,155	0,267	0,109	0,109	0,097	0,181
SP1 135	0,293	0,159	0,12	0,064	0,201	0,044
SP1 141	0,108	0,082	0,136	0,296	0,125	0,124
SP1 148	0,194	0,289	0,057	0,15	0,064	0,097
SP1 151	0,054	0,097	0,052	0,098	0,049	0,05

8.5. APÊNDICE E

Controles positivos adotados nos ensaios enzimáticos para celulases, ligninases e quitinases.

Atividade Enzimática Celulolítica

Controle Positivo	pH 4,8	pH 7,4
<i>Trichoderma reesei</i>	0,156 FMU/mL	0,111 FMU/mL

Atividade Enzimática Quitinolítica

Controle Positivo	4-MU-GlcNac	4-MU-(GlcNac) ₂	4-MU-(GlcNac) ₃
<i>Trichoderma viride</i>	8500 FLU	19300 FLU	5625 FLU

Atividade Enzimática Ligninolítica

Controle Positivo	LiP	MnP	Lac
<i>Fusarium spp</i>	22,2 U/L	44,2 U/L	8,3 U/L

8.6. APÊNDICE F

Fabricante dos meios de cultura e reagentes utilizados nos ensaios de atividades enzimáticas.

Componente		
Reagente ou Meio de cultura	Fabricante	País
Extrato de levedura	Acumedia®	EUA
Extrato de malte	Acumedia®	EUA
Peptona	Himedia®	EUA
Indol	Sigma-Aldrich®	EUA
Índigo	Sigma-Aldrich®	EUA
Ágar dextrose batata	Difco®	EUA
Carboximetilcelulose	Synth®	Brasil
Guaiacol	Sigma-Aldrich®	EUA
Glucose	Synth®	Brasil
Naftaleno	Sigma-Aldrich®	EUA
Sacarose	Synth®	Brasil
KH ₂ PO ₄	Sigma®	EUA
(NH ₄)SO ₄	Merck®	Alemanha
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck®	Alemanha
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck®	Alemanha
FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck®	Alemanha
MnSO ₄ .7H ₂ O	Merck®	Alemanha
ZnSO ₄ .H ₂ O	Merck®	Alemanha
(NH ₄)(NO ₃)	Merck®	Alemanha
K ₂ HPO ₄	Synth®	Brasil
FeCl ₃	Merck®	Alemanha
MgSO ₄	Merck®	Alemanha
CoCl ₂	Merck®	Alemanha
CaCl ₂	Merck®	Alemanha

Continuação - APÊNDICE F

Componente		
Reagente ou Meio de cultura	Fabricante	País
Tween-80	Synth [®]	Brasil
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	Merck [®]	Alemanha
NaOH	Sigma [®]	EUA
Tartarato duplo de sódio e potássio	Ecibra [®]	Brasil
Tris-Base	Sigma [®]	EUA
Ácido acético glacial	Merck [®]	Alemanha
Acetato de sódio	Synth [®]	Brasil
Vermelho de fenol	Synth [®]	Brasil
Lactato de sódio	Synth [®]	Brasil
Peróxido de hidrogênio	Synth [®]	Brasil
EDTA	Ecibra [®]	Brasil
Ágar	Himedia [®]	EUA
Siringaldazina	Sigma [®]	EUA