

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis**

**Ilva de Fátima Souza**

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NATURALMENTE  
OCORRENTES EM BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PARA A PRODUÇÃO DE  
ENZIMAS HOLOCELULOLÍTICAS**

**Diamantina  
2015**

**Iva de Fátima Souza**

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NATURALMENTE  
OCORRENTES EM BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PARA A PRODUÇÃO DE  
ENZIMAS HOLOCELULOLÍTICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos  
Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lílian de Araújo Pantoja  
e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela

**Diamantina**

**2015**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

S729i	<p>Souza, Ilva De Fátima Isolamento e avaliação de fungos filamentosos naturalmente ocorrente em biomassas lignocelulósicas para a produção de enzimas holocelulolíticas / Ilva De Fátima Souza. – Diamantina, 2016. 105 p. : il.</p> <p>Orientador: Alexandre Soares dos Santos, Coorientador: Lillian De Araújo Pantoja, Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2015.</p> <p>1. Celulases. 2. Xilanases. 3. fungos filamentosos. 4. Bioetanol. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD 660.634</b></p>
-------	---

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Iva de Fátima Souza**

**ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS NATURALMENTE OCORRENTES EM  
BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

Data de aprovação: 14/12/2015

---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Verônica Ferreira Melo**  
**Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - RJ**

---

**Prof<sup>o</sup> Dr. Donaldo Rosa Pires Júnior**  
**Faculdade de Medicina – UFVJM – Diamantina/MG**

---

**Prof<sup>o</sup> Dr. Harriman Aley Moraes**  
**Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – UFVJM – Diamantina/MG**

Diamantina/MG, 14 de Dezembro de 2015.



*Dedico a meu Pai, pelo homem bom que foi!  
Que com carinho, amor e na sua inocência,  
soube me ensinar e mostrar o caminho  
correto a seguir. Tudo que sou hoje devo a ti  
meu Pai! Estarás sempre em meus  
pensamentos! Sempre te amarei!*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser presente em minha vida, por conduzir meu caminho, abençoando e iluminando. Obrigada Senhor, por me dar ânimo, confiança e calma onde já não era possível e amigos nos momentos mais difíceis de minha vida. Obrigada Senhor por mais esta vitória alcançada!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos, por ter me recebido e confiado este trabalho! Agradeço pela paciência, ensinamentos e por ter contribuído, e muito, em meu crescimento profissional! Muito obrigada!

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> LÍlian de Araújo Pantoja, mais que coorientadora, amiga! Obrigada pelo carinho, empenho, dedicação, por abraçar este trabalho como sendo seu. Pelas horas a fio que dedicamos juntas para o desenvolvimento do mesmo, me proporcionando um aprendizado que levarei por toda a minha vida.

A minha mãe, que mesmo em sua fragilidade, conseguiu passar confiança, tranquilidade, amor e sempre compreendeu minha ausência! Agradeço aos meus irmãos Valdecir, Edvaldo e Evalter, meus primos, tios e sobrinhos queridos. Agradeço à Hilda, madrinha querida, pelo interesse e satisfação em cada passo dado nesta jornada! Agradeço a minha querida irmã Vilma, Patrícia, Edvânia, Tuca e tia Marta pela amizade e por suprir minha ausência!

Ao grupo do LABBIO: Philipe Brito, Ramon Silva, Ricardo Santos, Alice Lopes, Jéssica Matos, Gabriela, Jéssica Lopes, Daniel, Fidel, Raquel, Tamarah, Marina, Fernanda, Amanda Lelis, Tarik, Angeliane, Bárbara, Carol Bonfá e Cíntia. Ao grupo de Pesquisa de Biologia Molecular, Ana Carolina, Nayara, Aline e Jorge, e a Profa. Dra. Ana Paula Vanzela, pela disponibilidade e valoroso apoio neste período. Além da Kelly do Departamento de Farmácia.

Agradeço aos colegas e amigos do Instituto de Ciência e Tecnologia da UFVJM, em especial aos Técnicos, pelo carinho e descontração; aos professores Lucas Franco, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis; Amanda Chaves, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho; além de Arlete Barbosa e José Alberto. Saibam que o apoio e parceria de vocês foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

Aos meus amigos Keyla Carvalho, Ramon, Cris, Alexandre Silva, Maraísa Fernandes, Juscilene Neves, Tiago Guedes, Thiago Coimbra, Eduardo Fernandes, Janaína Melo, Anderson Matos, João Vítor, Sérgio Wilson, Sylvania, Neia, Creuza, Gabriel, Luiz Felipe, Wellington, Tatiana, Vandinha e D. Ilca, anjos enviados por Deus para me ajudar a superar todas dificuldades e obstáculos de minha vida.

Aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado contribuir com este trabalho, meu muito obrigado!





*“Não alimentem preocupações seja pelo que for; antes apresentem os vossos cuidados em oração perante Deus, exponham-lhe todas as vossas necessidades, sem esquecer de-lhe expressar o vosso agradecimento”. Filipenses 4:6*



## RESUMO

As enzimas celulolíticas e xilanolíticas de origem microbiana possuem muitas aplicações industriais. Nos últimos anos essas enzimas vêm sendo amplamente utilizadas na conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis destinados para a produção de bioetanol. Neste trabalho foram isolados micro-organismos naturalmente ocorrentes em biomassas lignocelulósicas e avaliados quanto à produção de enzimas holocelulolíticas. A microbiota estudada foi isolada a partir de cascas e sementes de angiospermas e gimnospermas. Das 112 colônias isoladas em meio sólido, contendo carboxi-metilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, 68 delas foram classificadas como fungos filamentosos, 02 como leveduras e 42 colônias como bactérias. As linhagens filamentosas foram submetidas a ensaios de fermentação submersa para investigação do potencial para a produção das atividades CMCásica, FPásica,  $\beta$ -glucosidásica e xilanásica. Os resultados revelaram que todas as linhagens filamentosas foram capazes de secretar pelo menos três das quatro atividades enzimáticas pesquisadas. Os maiores valores de atividade enzimática encontrados foram de 4.870,38 U L<sup>-1</sup> para CMCase; 1.586,00 U L<sup>-1</sup> para FPase; 1.531,95 U L<sup>-1</sup> para  $\beta$ -glicosidase e 15.152,86 U L<sup>-1</sup> para as xilanases. Entre os gêneros de fungos filamentosos identificados estavam *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Mucor*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

**Palavras-chaves:** Celulases, Xilanases, Fungos filamentosos, Bioetanol



## ABSTRACT

The cellulolytic and xylan-degrading enzymes from microorganisms are targets of industrial applications. In recent years, these have been widely used for converting lignocellulosic materials into sugars to bioethanol production. This study aimed to evaluate the potential of isolated wild microorganisms from lignocellulosic biomass for the production of cellulases and xylanases. The microorganisms focused in this study was isolated from barks and seeds of angiosperms and gymnosperms. From 112 isolated colonies, 68 were classified as filamentous fungi, 02 others as yeasts and 42 colonies as bacteria. The isolated filamentous strains were submitted to the submerged fermentation process to investigate the potential for production of CMC<sub>Case</sub>, FPase,  $\beta$ -glucosidase and xylanase enzyme activities. The results showed that all the isolated filamentous strains secreted at least three of the studied enzymes. The best enzymatic activities found were 4,870.38 UL<sup>-1</sup> for CMC<sub>Case</sub>; 1,586.00-UL<sup>-1</sup> to FPase; 1,531.95 UL<sup>-1</sup> to  $\beta$ -glucosidase, and 15,152.86 UL<sup>-1</sup> for xylanases. Among the identified filamentous fungi at genus level were *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Mucor*, *Penicillium* and *Trichoderma*.

**Key words:** Cellulases, Xylanases, Filamentous fungi, Bioethanol.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Aspecto microscópico de <i>Aspergillus</i> sp. ....	30
<b>Figura 2</b> - Padrão de ramificação dos conidióforos observados em <i>Penicillium</i> . ....	32
<b>Figura 3</b> - Aspecto morfológico de algumas espécies de <i>Trichoderma</i> . ....	33
<b>Figura 4</b> - Espécies de <i>Acremonium</i> . ....	34
<b>Figura 5</b> - Aspectos morfológicos de alguns gêneros de <i>Fusarium</i> . ....	35
<b>Figura 6</b> - Aspecto morfológico dos gêneros <i>Mucor</i> , <i>Absidia</i> e <i>Rhizopus</i> . ....	36
<b>Figura 7</b> - Esquema representativo da ação das enzimas do complexo celulolíticos na hidrólise da fibra celulósica.....	38
<b>Figura 8.</b> Estrutura da molécula de xilana e ação das enzimas xilanolíticas (endo-xilanases, exo-xilanases e $\beta$ -xilanases). ....	41
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática da molécula de celulose.....	42
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática da molécula de celulose.....	43
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática da molécula de hemicelulose.....	44
<b>Figura 12</b> - Fluxograma demonstrando as etapas de isolamento, identificação, seleção e investigação do potencial enzimático a partir de micro-organismos naturalmente ocorrentes em biomassas lignocelulósicas. ....	46
<b>Figura 13.</b> Biomassas lignocelulósicas utilizadas como fonte de isolamento dos micro-organismos estudados. ....	47
<b>Figura 14</b> - Aspectos macroscópicos da linhagem <i>Acremonium</i> sp., cultivado em diferentes meios de crescimento, incubados a 28°C.....	64
<b>Figura 15</b> - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Acremonium</i> sp. M137 cultivado em meio ágar aveia (AO). ....	65
<b>Figura 16</b> - Aspectos macroscópicos da linhagem M159, <i>Penicillium</i> sp.....	66
<b>Figura 17</b> - Visualização do aspecto macroscópico e microscópio do gênero <i>Penicillium</i> sp. M159, em meio ágar CYA com 10 dias de crescimento a 28°C. ....	67
<b>Figura 18</b> - Aspectos macroscópicos da linhagem <i>Aspergillus</i> sp. M16.....	68
<b>Figura 19</b> - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Aspergillus</i> sp. M16, em meio MEA. ....	69
<b>Figura 20</b> - Aspectos macroscópicos da linhagem <i>Trichoderma</i> sp. M164. ....	70
<b>Figura 21</b> - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Trichoderma</i> sp. M164, em meio ágar BDA. ....	71
<b>Figura 22</b> - Aspectos macroscópicos da linhagem <i>Mucor</i> sp. M11 .....	72



<b>Figura 23-</b> Aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Mucor</i> sp. M11, cultivada em meio BDA a 28°C com dois dias de crescimento. ....	73
<b>Figura 24 -</b> Aspectos macroscópicos do gênero <i>Absidia</i> sp. (M186) .....	74
<b>Figura 25 -</b> Visualização macroscópica e microscópica do gênero <i>Absidia</i> sp., M186, cultivada em meio BDA com dois dias de crescimento.....	75
<b>Figura 26 –</b> Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas.....	90
<b>Figura 27 –</b> Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas.....	91
<b>Figura 28 –</b> Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas.....	92
<b>Figura 29 –</b> Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas.....	93
<b>Figura 30 –</b> Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas.....	94
<b>Figura 31 –</b> Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas.....	95
<b>Figura 32 –</b> Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas.....	96
<b>Figura 33 –</b> Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas.....	97
<b>Figura 34 -</b> Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Trichoderma</i> sp. ....	98
<b>Figura 35 -</b> Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Trichoderma</i> sp. ....	99
<b>Figura 36 -</b> Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Aspergillus</i> em meio Ágar Dextrose Batata (BDA) com 10 dias de crescimento a 28°C.....	100
<b>Figura 37 -</b> Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Penicillium</i> sp. ....	101
<b>Figura 38 -</b> Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Penicillium</i> sp. ....	102
<b>Figura 39 -</b> Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Penicillium</i> sp. ....	103

<b>Figura 40</b> - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero <i>Mucor</i> sp. em meio Ágar Dextrose Batata (BDA) com 10 dias de crescimento a 28°C. ....	104
<b>Figura 41</b> - Aspecto macro e microscópico das linhagens de <i>Curvularia</i> sp. M44 e <i>Fusarium</i> sp. M133 cultivada em meio BDA a 28°C com cinco dias de crescimento. ....	105



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Linhagens de fungos filamentosos isolados a partir de biomassas lignocelulósicas e produtores de celulasas e xilanases. ....	28
<b>Tabela 2</b> - Componentes químicos utilizados no preparo do meio de cultivo (meio de Manachini) para o isolamento dos micro-organismos estudados. ....	48
<b>Tabela 3.</b> Sistema utilizado para codificar os micro-organismos isolados de biomassas lignocelulósicas. ....	49
<b>Tabela 4</b> - Composição química da solução de Manachini, pH 5,0, tendo carboximetilcelulose como substrato. ....	50
<b>Tabela 5</b> - Quantidade de isolados a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas em meio sintético de Manachini utilizando carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. ....	54
<b>Tabela 6</b> - Tipo e origem dos microrganismos isolados a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas. (a) casca do coco indaiá; (b) semente de mafumeira; (c) fruto de mafumeira; (d) estróbilo de araucária; (e) casca do tronco de acerola; (f) casca de eucalipto e (g) casca da pitangueira. ....	55



## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- AO – Ágar Aveia  
BDA – Ágar Batata Dextrose  
BG –  $\beta$ -glucosidase  
CBHI – Celobiohidrolases que hidrolisam terminais redutores (R)  
CBHII – Celobiohidrolases que hidrolisam terminais não redutores  
CMC – Carboximetilcelulose  
CMCase – Carboximetilcelulase  
CYA – Czapek Extrato de Levedura  
EC – Ezyme Comission  
EnG - Endoglucanases  
ExG – Exoglucanase  
FES - Fermentação em Estado Sólido  
FSb - Fermentação Submersa  
FPases – Enzimas com atividade hidrolítica sobre a celulose de papel de filtro  
GH – Glucano Hidrolases  
GP – Grau de Polimerização  
IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*  
MEA – Ágar Extrato de Malte  
NR – Não Redutores



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA.....	22
2. OBJETIVOS .....	24
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	26
3.1 Micro-organismos com potencial para produção de enzimas.....	26
3.2 Características morfológicas de espécies de fungos filamentosos produtores de enzimas holocelulolíticas .....	29
3.3 Hidrolases Holocelulolíticas .....	36
3.3.1 Enzimas celulolíticas.....	37
3.3.1.1 Endoglucanases.....	38
3.3.1.2 Exoglucanases.....	38
3.3.1.3 $\beta$ -Glucosidase.....	39
3.3.2 Enzimas hemicelulolíticas.....	39
3.3.2.1 Xilanases .....	40
3.3.3 Aplicação e uso de enzimas holocelulolíticas para produção de bioetanol de segunda geração .....	41
4. METODOLOGIA .....	46
4.1. Aquisição e isolamento de micro-organismos degradadores de celulose .....	47
4.2. Identificação dos fungos filamentosos em nível de gênero .....	49
4.2.1. Identificação macroscópica.....	49
4.3. Avaliação de produção de enzimas holocelulolíticas por fungos filamentosos.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
5.1. Isolamento.....	54
5.2. Avaliação das atividades enzimáticas de interesse .....	57
5.3. Identificação dos fungos filamentosos isolados.....	63



5.3.1. Análises morfológicas .....	64
5.3.1.1. <i>Acremonium</i> sp. ....	64
5.3.1.2 <i>Penicillium</i> sp .....	66
5.3.1.3 <i>Aspergillus</i> sp. ....	68
Fonte: O autor.....	69
5.3.1.4. <i>Trichoderma</i> sp.....	69
5.3.1.5. <i>Mucor</i> sp.....	71
5.3.1.6. <i>Absidia</i> sp. ....	74
6. CONCLUSÃO.....	76
7 REFERÊNCIAS .....	78
ANEXO A .....	90
ANEXO B.....	98

## 1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

As enzimas holocelulolíticas de origem microbiana consistem em importantes catalisadores utilizados amplamente no desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos. O interesse especial por estes complexos enzimáticos se justificam por sua capacidade de decompor biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

Os materiais lignocelulósicos encontrados em abundância na natureza ou que constituem resíduos agroindustriais são matérias-primas que, associadas às enzimas microbianas, vêm sendo utilizados especialmente em processos de produção de combustíveis de segunda geração (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010; FARINAS, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, em virtude da crescente preocupação com o uso de fontes energéticas renováveis que permitam avançar na superação da atual problemática baseado em combustíveis fósseis, se intensificou o interesse na descoberta de novos micro-organismos, bem como na melhoria do seu potencial enzimático para aplicação na indústria de biocombustíveis (DELABONA *et al.*, 2012; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Um aspecto relevante no uso de materiais lignocelulósicos para este fim é a possibilidade de agregar valor a estes materiais, além de reduzir significativamente a competição com as culturas alimentares. Um dos gargalos no uso desses materiais diz respeito a diversidade e complexidade da estrutura da celulose e hemicelulose que requer uma variedade equivalente de enzimas para a sacarificação dos polissacarídeos, que finda por onerar os custos de produção (SANTOS *et al.*, 2012; HANSEN *et al.*, 2015).

A sacarificação da celulose é favorecida por ação de um conjunto de enzimas, as celulasas, capazes de atuar sinergicamente sobre materiais celulósicos, promovendo sua completa desconstrução em unidades de glicose (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010). De acordo com Farinas (2011), outro grupo de enzimas, as hemicelulasas, possui um papel fundamental na hidrólise da celulose, pois sua presença no complexo enzimático é importante para desestruturar o entrelaçamento entre celulose e hemicelulose presentes na parede celular vegetal, proporcionando desimpedimento estérico para ação das celulasas. Diante disso, um dos focos das pesquisas atuais para o desenvolvimento da indústria de base biotecnológica continua sendo a busca por micro-organismos produtores de enzimas e, entre essas, novas enzimas ou enzimas com propriedades catalíticas e físico-químicas de interesse para hidrólise de celulose e hemicelulose. Do ponto de vista industrial, as enzimas microbianas têm por

vantagens os custos de produção, que são relativamente baixos; a facilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, a possível manipulação genética dos microorganismos produtores e, ainda, o fato de caracterizarem-se como um recurso renovável (PANDEY *et al.*, 2005; BARATTO *et al.*, 2011).

Neste contexto, o presente estudo teve como foco principal isolamento de microorganismos naturalmente ocorrente em biomassas lignocelulósicas que apresentassem capacidade para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de fungos filamentosos naturalmente ocorrentes em biomassa lignocelulósica quanto à produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- I. Isolar micro-organismos a partir de biomassas lignocelulósicas;
- II. A partir dos micro-organismos isolados selecionar os fungos filamentosos com potencial para produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas;
- III. Analisar quantitativamente o potencial de fungos filamentosos quanto a produção de enzimas do complexo celulolítico (endoglucase, FPase e  $\beta$ -glucosidase) e xilanolítico.
- IV. Identificar os principais fungos filamentosos produtores das enzimas alvo em nível de gênero.



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Micro-organismos com potencial para produção de enzimas

Os micro-organismos ocorrem em populações isoladas ou mistas em toda biota onde há acúmulo de nutrientes em condições ambientais adequadas para seu crescimento. Os ecossistemas microbianos possuem uma vasta variedade de organismos de interesse industrial na produção de enzimas hidrolíticas, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes (SINGHANIA *et al.*, 2010). Entre estes micro-organismos, os fungos filamentosos receberam uma abordagem especial por ser alvo deste estudo.

Bactérias são organismos procariotos que possuem grande diversidade metabólica e morfológica. Sua parede celular possui estruturas complexas, semirrígida e circundam a membrana plasmática protegendo o interior da célula das adversidades do meio ambiente. Esta parede é composta de uma rede macromolecular denominada peptidoglicana, bem como várias outras moléculas com múltiplas funções que se apresentam de forma diferenciada caracterizando-as em dois grupos, Gram-positivas e Gram-negativas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2013; BROCK; MADIGAN, 2012). Entre as bactérias, algumas são capazes de produzir enzimas celulolíticas tendo como exemplo os gêneros *Pseudomonas*, *Actinomicetos*, *Bacillus*, *Cellulomonas* e *Clostridium* (FARINAS, 2011).

Os fungos são organismos eucarióticos, pertencente ao reino Fungi, que compreende os filos Ascomycotas, Basidiomycota, Chytridiomycota e Glomeromycota (RICHARDSON, 2009; STAJICH *et al.*, 2009; BLACKWELL, 2011). Estes micro-organismos podem se apresentar na forma leveduriforme (unicelulares) e/ou filamentosos.

As leveduras são classificadas nos filos Ascomycota ou Basidiomycota. Estes organismos apresentam reprodução assexuada por brotamento ou por fissão, o que os caracteriza como fungos unicelulares verdadeiros (Eumycota) (KURTZMAN *et al.*, 2011). Algumas espécies apresentam dimorfismo sexual e podem produzir pseudo-hifas e hifas verdadeiras durante seu crescimento (DIAS; SCHWAN, 2010). As linhagens de leveduras a seguir listadas são relatadas como produtoras de xilanases e celulases: *Trichosporium* sp, *Cryptococcus* sp, *Candida intermedia*, *Candida tropicalis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Scheffersomyces shehatae*, *Sugiyamaella smithiae*, *Cryptococcus diffluens*, *Cryptococcus heveanensis*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporon mycotoxinivorans* (SANTOS *et al.*, 2012; LARA *et al.*, 2014).

Os fungos filamentosos são organismos fascinantes com interessante biologia, e de relevante importância econômica e biotecnológica (STEINBERG; SCHUSTER, 2011). Estes organismos são dotados por hifas, que formam revestimentos esbranquiçados ou coloridos sobre o substrato onde crescem, e seu emaranhado constitui o micélio (MENEZES, 2006). O micélio, no entanto, não deve ser considerado apenas uma estrutura de caráter homogêneo com capacidade de crescimento, visto que exibe considerável plasticidade de desenvolvimento. A partir de diferentes regiões interconectadas das hifas podem crescer ramificações com idade e diferentes atividades fisiológicas e bioquímicas, que podem morrer e esporular em diferentes momentos ou até mesmo, simultaneamente, dependendo das condições microambientais (WALKER; WHITE, 2005). Estes micro-organismos são encontrados em grande variedade na natureza, são versáteis, de crescimento rápido, baixo custo de cultivo, além de apresentar várias possibilidades de manipulação genética, característica que os tornam importantes nas pesquisas que visam à hidrólise enzimática da celulose em escala industrial (SIMÕES; TAU-K-TORNISIELO, 2005; OLIVEIRA, 2007; CASTRO; PEREIRA Jr., 2010; HANSEN, 2015).

A seleção e isolamento de fungos filamentosos de materiais lignocelulósicos em decomposição possibilitam a obtenção de novas linhagens com potencial para produção de celulases e hemicelulases (JUTURU *et al.*, 2014). Mahmood *et al.* (2013) relataram que a produção de celulase e xilanases podem ser aumentada a partir de estudo de linhagens destes organismos, bem como da composição do meio e de outros fatores que influenciam seu crescimento e produção de metabólitos.

Os micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas e xilanolíticas são principalmente consumidores de carboidratos e geralmente são incapazes de utilizar proteínas ou lipídeos como fontes de energia para o seu crescimento. Tais micro-organismos podem realizar a degradação de compostos a base de celulose o que resulta na geração de derivados simples de açúcar (SOARES Jr., 2013). Entretanto, apenas alguns desses organismos são conhecidos como verdadeiramente celulolíticos, isto é, como sendo capazes realmente de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, diversos substratos são utilizados com o objetivo de se induzir e/ou medir a atividade do complexo lignocelulolítico total, tais como: algodão, papel de filtro, carboximetilcelulose (CMC) e resíduos agrícolas (AGUIAR & MENEZES, 2000). Na literatura são relatados vários fungos filamentosos como potenciais produtores de celulases e xilanases. Segundo Santos *et al.* (2012), os principais fungos filamentosos produtores de celulases e xilanases são aqueles pertencentes aos dos gêneros

*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Sporotrichum*. Algumas linhagens relatadas como produtoras de hidrolases holocelulolíticas são mencionadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Linhagens de fungos filamentosos isolados a partir de biomassas lignocelulósicas e produtores de celulases e xilanases.

Linhagens	Enzimas Estudadas	Biomassa	Tipo de Fermentação	Valor
<i>Acremonium strictum</i> <sup>a</sup>	β-glucosidase	Bagaço de cana	FSb	3,8 U L <sup>-1</sup>
<i>Acremonium zeae</i> <sup>b</sup>	Fpase	Palha de milho	FSb	0,14 U L <sup>-1</sup>
<i>Aspergillus awamori</i> 2B.361 <sup>c</sup>	β-glucosidase	Bagaço de cana	FES	45,6 U L <sup>-1</sup>
<i>Aspergillus awamori</i> 2B.361 <sup>c</sup>	Endoglucanase	Bagaço de cana	FES	4,9 U L <sup>-1</sup>
<i>Aspergillus candidus</i> <sup>d</sup>	Endoglucanase	Farelo Mamona	FSb	0,53 U L <sup>-1</sup>
<i>Aspergillus niger</i> <sup>e</sup>	Xilanase	Farelo de cacau	FES	11,86 U L <sup>-1</sup>
<i>Aspergillus niger</i> <sup>e</sup>	Fpase	Farelo de cacau	FES	7,51 U L <sup>-1</sup>
<i>Aspergillus oryzae</i> <sup>f</sup>	Endoglucanase	Resíduos de algodão	FSb	0,223 U L <sup>-1</sup>
<i>Aspergillus terreus</i> <sup>f</sup>	Xilanase	Resíduos de algodão	FSb	2,467 U L <sup>-1</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i> (F3) <sup>g</sup>	CMCase	Palha de trigo	FES	26,2 U L <sup>-1</sup>
<i>Fusarium verticillioides</i> <sup>f</sup>	Endoglucanase	Resíduos de algodão	FES	0,03 U L <sup>-1</sup>
<i>Mucor sp.</i> (Blu 33) <sup>f</sup>	Xilanase	Resíduos de algodão	FES	1,418 U L <sup>-1</sup>
<i>Neosartorya spinosa</i> P2D19 <sup>h</sup>	Xilanase	Farelo de trigo	FSb	15,1 U L <sup>-1</sup>
<i>Neosartorya spinosa</i> P2D19 <sup>h</sup>	CMCase	Farelo de trigo	FSb	3,60 U L <sup>-1</sup>
<i>Penicillium echinulatum</i> <sup>i</sup>	CMCase	CMC	FES	1,53 U L <sup>-1</sup>

FSb- Fermentação Submersa; FES: Fermentação em Estado Sólido

Fonte: a) Goldbeck *et al.*, 2012; b) Almeida *et al.*, 2011; c) Gottschalk *et al.*, 2010; d) Herculano *et al.* 2011; e) Santos *et al.*, 2012 e f) Siqueira *et al.*, 2010; g) Hansen *et al.*, 2015; h) Prado *et al.*, 2010 e i) Martins *et al.*, 2008.

O gênero *Aspergillus* é amplamente reportado na literatura como produtor de enzimas lignocelulolíticas e ainda, que as formas mutantes, que sejam mais resistentes à repressão catabólica e que sintetizem maiores quantidades de enzima sem a presença de um indutor são de grande interesse nos processos enzimáticos (SANTOS *et al.*, 2012; MENEZES, 2006). Algumas espécies do gênero *Penicillium sp.* são conhecidas por sua produção de ácidos orgânicos e diversas enzimas hidrolíticas que degradam uma grande variedade de biomoléculas complexas (GEISER *et al.*, 2006, PITT; HOCKING, 2009; SAMSOM *et al.* 2011).

O potencial para produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma*, tais como *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei* são alvos de pesquisas e tem sido utilizados mundialmente pela indústria na produção destes complexos enzimáticos para degradação da biomassa lignocelulósica (GUSAKOV, 2011; CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).



Espécies do gênero *Acremonium*, com destaque para *A. cellulolyticus*, encontrado em 1982 do solo no nordeste do Japão, apresentam potencial de segregar quantidades suficientes de enzimas celulolíticas capazes de converter completamente materiais de celulose em glicose (GOLDBECK *et al.*, 2012; KISHISHITA *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2008 e DWIARTI *et al.*, 2012).

*Mucor circinelloides* também é citado pelo potencial na produção de complexos enzimáticos que atuam na degradação de celulose (HUANG *et al.*, 2014; BABA *et al.*, 2005, SAHA *et al.*, 2004)

### **3.2 Características morfológicas de espécies de fungos filamentosos produtores de enzimas holocelulolíticas**

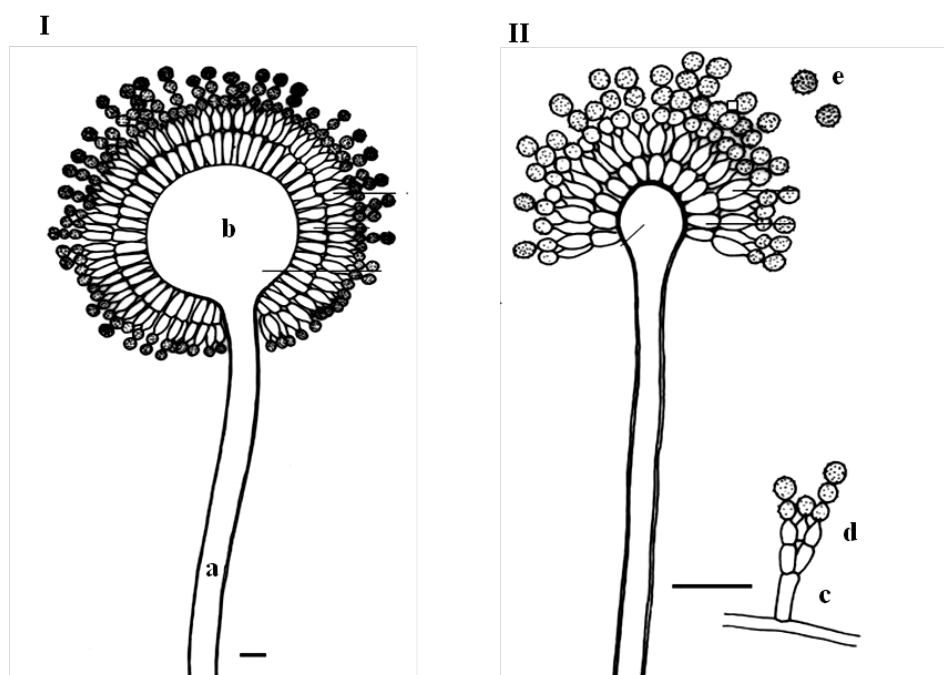
As características morfológicas da colônia fúngica se constituem em importantes informações na descrição do organismo. Alguns parâmetros são relevantes neste processo, dentre os quais se têm: aspecto e forma da colônia, reverso da colônia, cor e textura do micélio, forma e quantidade dos conídios, presença de pigmentos solúveis e exsudato, características dos conidióforos, presença de estruturas reprodutivas, tempo de crescimento e produção de metabólitos (VISAGE *et al.*, 2014; SAMSON *et al.*, 2014). Tais aspectos são intimamente influenciados pelas condições ambientais e nutricionais que se revelam de forma particular para diferentes grupos de organismos.

As características morfológicas dos principais gêneros de fungos filamentosos que são citados pela literatura como produtores de enzimas hidrolíticas serão abordadas a fim de proporcionar maior amplitude de informações sobre os mesmos neste documento.

O gênero *Aspergillus*, é um fungo pertencente à família *Aspergillaceae* da ordem Eurotiales, classe dos eurotiomycetes e filo Ascomycota (LEE; YAMAMOTO, 2015). Segundo Peterson (2015), este foi reconhecido pela primeira vez em 1729, na Florência, onde foi notada a sua semelhança estrutural com o hissope, objeto utilizado para aspergir água benta. Também relata que o gênero compreende um grupo diversificado que comporta cerca de 340 espécies. Sua classificação e identificação foram baseadas em caracteres fenotípicos, mas nas últimas décadas a maior influência se deu pela caracterização molecular e quimiotaxonômica (SAMSON *et al.*, 2014). Os avanços na genômica contribuíram para compreensão dos estágios sexuais deste gênero, até então, desconhecidos (BENNETT, 2010). Estes organismos se caracterizam pela produção de esporos assexuais sobre estruturas especializadas denominada “aspergillum” ou “cabeça aspergillar” (PETERSON, 2015). Tal

estrutura consiste em uma haste (estipe) asseptada, que termina em uma vesícula sobre as quais nascem às células conidiogênicas (fiálides e métulas), que geram conídeos com pigmentação e formas diferentes (FASANELA, 2008). Para sua identificação, SAMSON *et al.* (2014) reportam que devem ser observadas suas característica específicas como: forma das cabeças conidiais, presença ou ausência de metulas entre as vesículas e fiálides, cor, dimensão, textura e forma das estipes. Bem como presença, tamanho, forma e arranjo de estruturas especializadas na reprodução, como, cleistotecio, ascos e ascosporos. Na Figura 1 encontra-se ilustrado aspecto morfológico do gênero *Aspergillus*.

**Figura 1** - Aspecto microscópico de *Aspergillus* sp.



*A. niger*; II. *A. versicolor*. a) estipe; b) vesícula; c) métula; d) fiálides e, e) conídios.

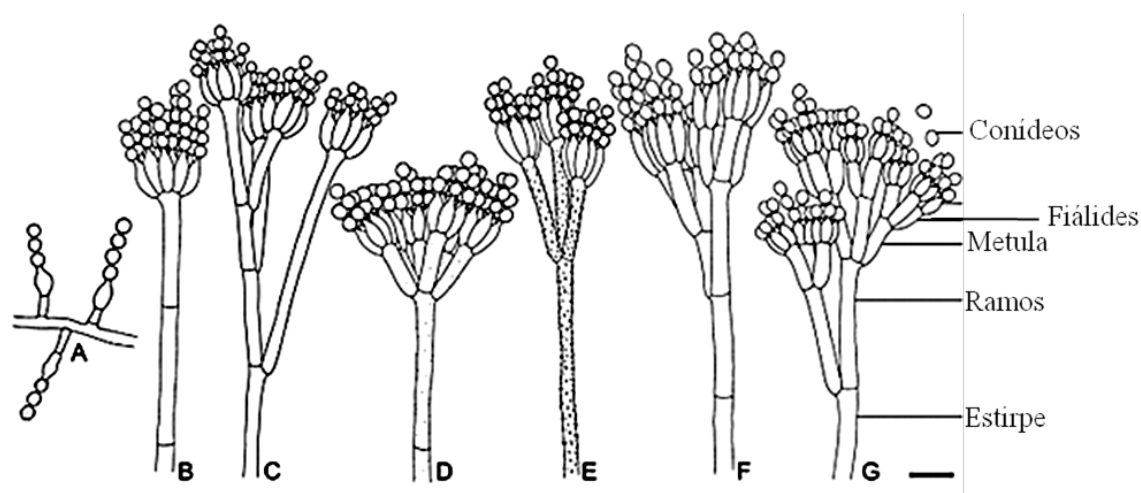
Fonte: GERFOR JUNIOR (2011).

O gênero *Penicillium* inclui fungos filamentosos anamorfos pertencente à família *Trichocomaceae* da ordem Eurotiales, classe dos eurotiomycetes e filo Ascomycota que comporta atualmente 225 espécies (SAMSON; HOUBRAKEN, 2011; ROPARS *et al.*, 2012; VISAGIE *et al.*, 2014). As espécies deste gênero possuem como características macroscópicas colônias densas de crescimento rápido e coloração variada em tons de verde e, às vezes, branca. Quanto ao aspecto microscópico, este grupo apresentam hifas septadas,

conídios hialinos unicelulares ou em cadeias de formas variadas (globosos, elipsoidal, cilíndrico ou fusiforme), os quais são produzidos a partir de uma célula especializada chamada de conidióforos ou fiálides (VISAGIE *et al.*, 2014). As fiálides podem ser produzidas individualmente ou em grupos de métulas ramificadas, dando a aparência de pincel. O nome *Penicillium* é derivado da palavra *penicillus* que significa “pequena escova”. Esse organismo foi citado pela primeira vez em 1809 pelo pesquisador Link, sendo criado, somente em 1901, um sistema de classificação secundário para este gênero por Dierckx (SAMSON; HOUBRAKEN, 2011, VISAGIE *et al.*, 2014).

Os diferentes padrões de ramificações dos conidióforos são tradicionalmente utilizados na classificação de *Penicillium*. Na Figura 2, estão apresentados alguns padrões de ramificações de acordo com Visagie *et al.*, (2014). Na Figura 2A encontra-se um esquema dos conidióforos simples (fiálidessolitários); na Figura 2B, estão os conidióforos monoverticilados, onde a parte terminal dos conidióforos é ligeiramente dilatada ou vesiculada; na Figura 2C observam-se conidióforos divergentes, que são descritos como irregulares, por apresentar um padrão de ramificação complexo com formação de numerosos ramos subterminal. Nas Figuras 2D e 2E os conidióforos são bivercicilados, pois possuem um verticilo de três ou mais métulas entre a extremidade da estipe. Nestes as fiálides e as métulas podem ser de comprimento igual ou desigual, podem variar no grau de divergência e normalmente se apresentam mais ou menos cilíndricos, mas podem também, ser ligeiramente vesiculadas. Na Figura 2F, os conidióforos são chamados de terverticilados, pois apresentam diferentes níveis de ramificações entre as estipes e métulas. Muitas vezes os conidióforos são apenas uma continuação do eixo, outras vezes, um ramo lateral ou ainda, um verdadeiro espiral de três ou mais ramos. Na Figura G, os conidióforos são quaterverticilados e são produzidos por apenas algumas espécies. Esse tipo possui um nível extra de ramificação, além do padrão terverticilado.

**Figura 2** - Padrão de ramificação dos conidióforos observados em *Penicillium*.



A) conidióforos com fiáldes solitárias; B) conidióforos monoverticilados; C) conidióforos divaricatos; D) e E) conidióforos biverticilados, F) conidióforos terverticilados e G) conidióforos quaterverticilados.

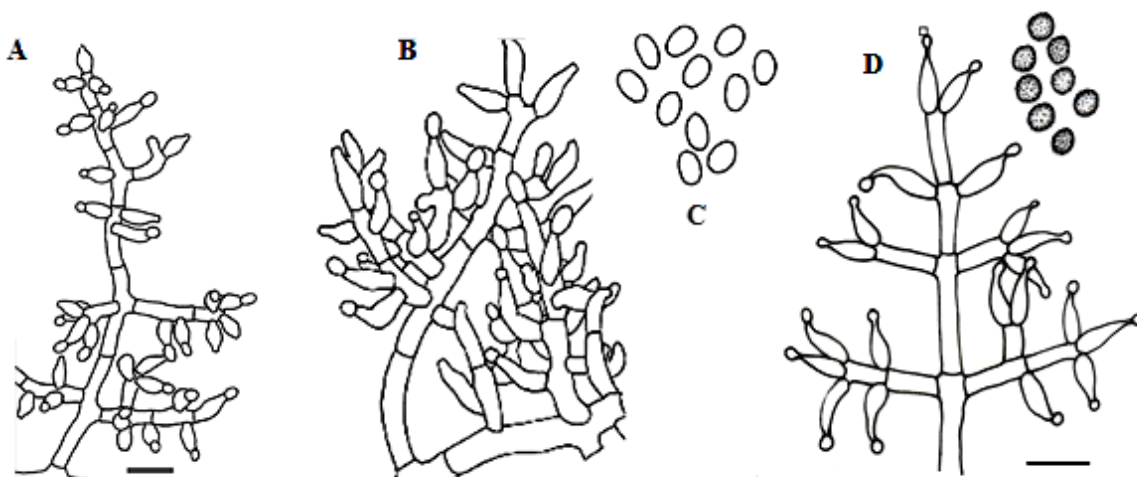
Fonte: VISAGIE *et al.*, (2014).

O gênero *Trichoderma* pertence a ordem Hypocrales, família *Hypocraceae* filo Ascomycota. Atualmente cerca de 200 espécies foram catalogadas para os gêneros *Trichodermae* e *Hypocrea*. Estes gêneros foram tratados como sinônimos, onde a forma sexual das espécies *Trichoderma* era classificada como *Hypocrea*. Atualmente têm sido tratados como distintos, pois estudos recentes indicam a existência de formas sexuais para o gênero *Trichoderma*, sendo este, agora, considerado um gênero holomorfo (JAKLITSCH; VOGLMAYR, 2014; ZHU; ZHUANG, 2015;).

O *Trichoderma* é um fungo filamentosos, de vida livre, caracterizado pela produção de conídeos formados a partir de células conidiogênicas, contidas ou não, em estruturas especializadas, ou ainda, por fragmentação do talo micelial (MACHADO *et al.*, 2012). A identificação e caracterização de *Trichodermas* são baseadas em observações morfológicas, fenotípica, bioquímica e através de análises moleculares (YABUKI; MIYAZAKI, OKUDA, 2015). Este gênero apresenta características diversificadas que variam de acordo com as espécies. Algumas espécies de *Trichoderma* como *T. catoptron*, *T. ceramicum*, *T. chromospermum* e *T. cremeum* possuem coloração castanho avermelhado, esporos verdes e peritécio imperceptível. Outras como *T. viride*, *T. tsugarensense* e *T. rosulatum* são caracterizados pela presença de conídios verdes com aspecto liso e formas variando de ovoidal a elipsoidal (YABUKI; MIYAZAKI; OKUDA, 2015, JAKLITSCH; VOGLMAYR,

2015; ZHU; ZHUANG, 2015;). Na Figura 3 encontra-se ilustrado aspecto morfológico de algumas espécies de *Trichoderma*.

**Figura 3** - Aspecto morfológico de algumas espécies de *Trichoderma*.



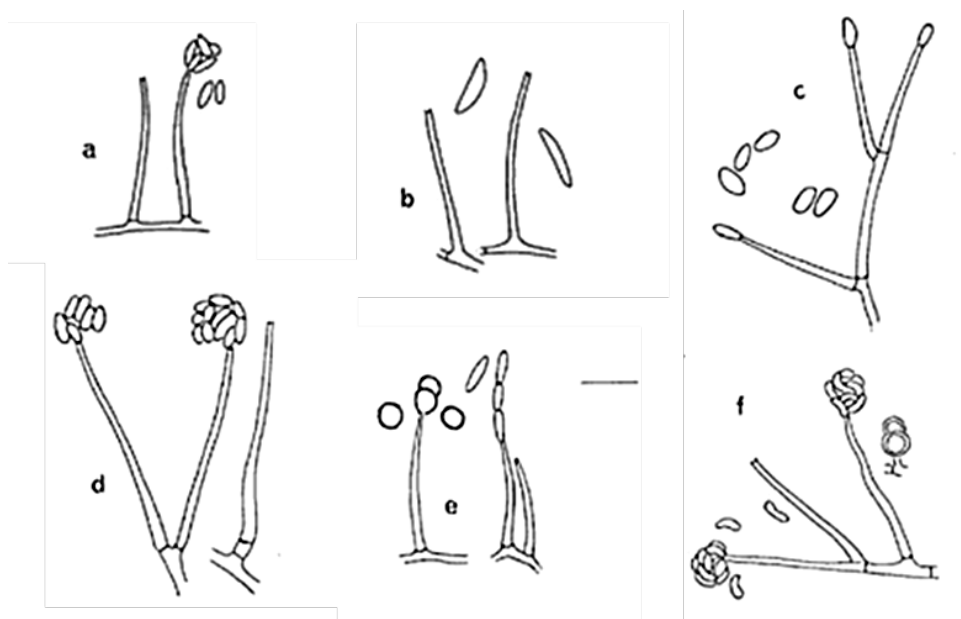
A) Estrutura ramificada de *Trichoderma tsugarense*; B e C). *Trichoderma kunigamense* e, D) conídios elipsoidais de *T. kunigamense*

Fonte: YABUKI; KAZUHIRO; OKUDA (2014).

O gênero *Acremonium* inclui um dos mais estruturados gêneros de todos os fungos filamentosos anamorfos. Pertence ao filo Ascomycota e comporta atualmente cerca de 95 espécies (GRÄFENHAN *et al.*, 2011; SUMMERBELL *et al.*, 2011). Guarro (2012) menciona que a taxonomia deste gênero é muito complexo, confusa, e claramente polifilético, agrupando espécies pertencentes a diferentes famílias e ordens. A maioria das espécies deste gênero pertence à ordem Hypocreales, porém um pequeno grupo de espécies, como *A. chaetomioidea* pertence à ordem Sordariales e *A. furcatum*, pertence a uma ordem de identidade ainda incerta (SUMMERBELL *et al.*, 2011).

Morfológicamente consistem de hifas hialinas septadas, dando origem a finas e longas fiálides produzidas individualmente ou em pequenos grupos. Os conídios são relativamente grandes, ovalados, possuem hilo e podem ter ápice truncado. Tendem a ser unicelulares e são produzidos em uma cabeça mucóide, ou formando cadeias não conectadas. Os conídios podem ser hialinos ou pigmentados (GRÄFENHAN *et al.*, 2011; KIYUANA *et al.*, 2011; SUMMERBELL *et al.*, 2011). Na Figura 4 encontra-se ilustrado aspecto morfológico de algumas espécies de *Acremonium*.

**Figura 4** - Espécies de *Acremonium*.



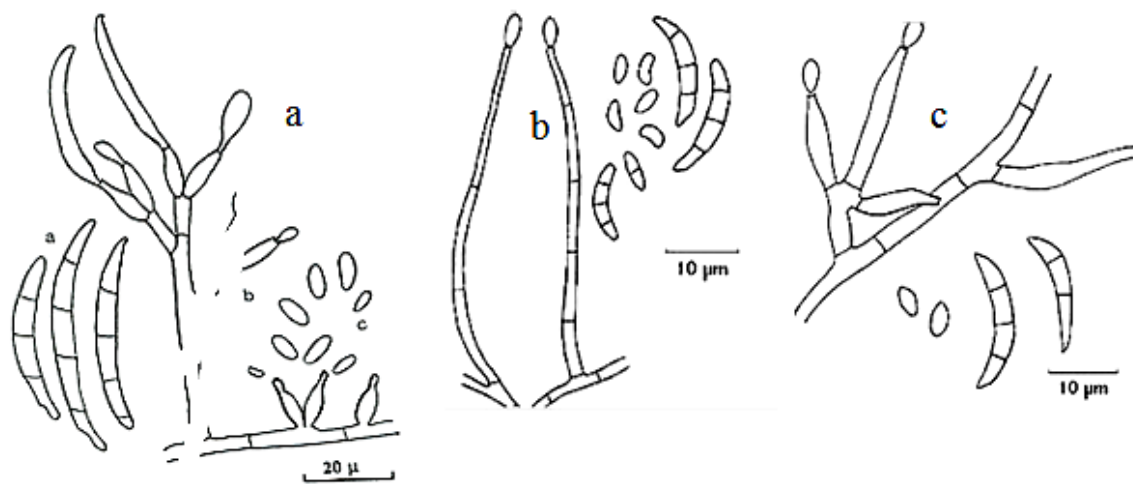
a) *A. strictum*; b) *A. conophialum*; c) *A. chrysogenum*; d) *A. crotocinigenum*; e) *A. fusidioides* e f) *A. recifei*

Fonte: ONIUNS; BRADY (1987).

O gênero *Fusarium* pertence ao filo Ascomycota e agrupa espécies de fungos filamentosos anamórficos da ordem Hipocreales (HERMANN *et al.*, 2014). Gräfenham *et al.* (2011) reportam que a descrição do gênero *Fusarium* se torna complexa em função da existência de 22 nomes genéricos que são considerados sinônimos.

As colônias deste grupo são geralmente de crescimento rápido, com presença ou não de hifas aéreas e aspecto opaco, brilhante ou colorido. Espécies de *Fusarium* produzem macro e microconídios que variam na forma de acordo com as espécies. Os macroconídios podem ser hialinos uni ou multicelular, aéreos, com formas variadas, como fusiformes (formato de uma foice) e cilíndricos, e geralmente com uma célula apical alongada. Os microconídios podem ser hialinos e se apresentar, sem ou com um ou dois septos unicelulares nas formas piriforme, fusiforme a ovoides, retos ou curvos. Outras estruturas como clamidoconídio pode ou não estar presente em espécies de *Fusarium* (HARROWS *et al.*, 2010; GRÄFENHAM *et al.*, 2011; SECOR *et al.*, 2014). Na Figura 5 encontra-se ilustrado o aspecto morfológico de espécies de *Fusarium*.

**Figura 5** - Aspectos morfológicos de alguns gêneros de *Fusarium*.



a) *F. dimerum*; b) *F. solani*; c) *F. oxysporum*.

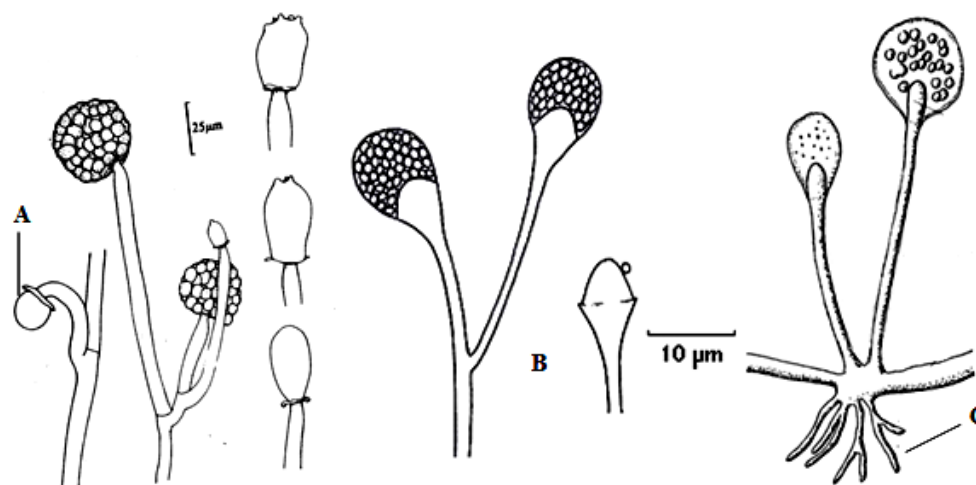
Fonte: Centre de Recherche Sur La Conservation des Collections-CRCC (2015).

Os gêneros *Mucor* e *Absidia* são fungos filamentosos pertencentes à família Mucoraceae, da ordem Mucolares. Em função das evidências de análises moleculares a classificação tradicional, as espécies do gênero Zygomycota nos últimos anos têm passado por uma revisão (HERMET *et al.*, 2012). Vários autores reportam que tem sido feita uma nova distribuição em um novo Filo e quatro subfilos. De acordo com a classificação atual estes gêneros pertencem ao filo Glomeromycota e distribuídos nos subfilos: Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Zoopagomycotina e Kickxellomycotina (RICHARDSON, 2009; STAJICH *et al.*, 2009; BLACKWELL, 2011; HERMET *et al.*, 2012).

Geralmente as espécies destes gêneros apresentam colônias com hifas hialinas de crescimento rápido (HERMET *et al.*, 2012; RICHARDSON, 2009). Os esporos assexuais incluem clamidoconídios, conídios e esporangiósporos contidos em uma estrutura denominada esporângios, os quais são suportados em esporangióforos simples ou ramificados. Hoffmann *et al.* (2007) citam que a identificação dos gêneros deste filo é baseada principalmente na morfologia dos esporângios, sendo observadas, sobretudo, disposição e número de esporangiósporos, forma, cor, presença ou ausência de columelas e apófises, bem como a presença ou ausência de rizoides. O gênero *Mucor* pode ser diferenciado dos gêneros de *Absidias*, *Rhizomucor* e *Rhizopus* pela presença do colarete e ausência de rizoides e estolão

(HOFFMANN, DISCHER E VOIGT, 2007). No gênero *Absidia* os rizoides estão distribuídos de forma irregular, diferente do gênero *Rhizopus*, que apresenta rizoides inseridos na base do esporangióforo. Outra característica que distingue os gêneros *Rhizopus* e *Absidia* está relacionada à forma do esporângio, que nesta última se apresenta piriforme e apofisada com parede deliquescente (HOFFMANN, 2010). Na Figura 6 encontra-se ilustrado aspecto morfológico de algumas espécies de *Mucor*, *Absidia* e *Rhizopus*.

**Figura 6** - Aspecto morfológico dos gêneros *Mucor*, *Absidia* e *Rhizopus*.



A) colarete em *Mucor* sp.; B) ausência de colarete em *Absidia* sp e C) rizoides de *Rhizopus* sp.

Fonte: GERFOR JUNIOR (2011).

### 3.3 Hidrolases Holocelulolíticas

Enzimas são moléculas que possuem um extraordinário poder catalítico, alto grau de especificidade para com seus substratos e aceleram as reações químicas sem afetar o equilíbrio químico (LEHNINGER, 2006). Tais moléculas, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular - IUBMB (2015), são classificadas de acordo com as reações que catalisam, em oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

Várias enzimas estão envolvidas em processos de degradação de compostos lignocelulósicos, dentre estas estão lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, pectina metil esterase, pectatoliase, poligalacturonase, pectina liase ramnogalacturona, ácido ferúlico esterase,  $\alpha$ -galactosidase, ácido p-cumárico esterase, endomannanases e  $\beta$ -manosidase. Além



destas, têm aquelas envolvidas diretamente na bioconversão de celulose, tais como as celulases (exo-1,4- $\beta$  glucanases, endo-1,4-glucanases e  $\beta$ -glucosidase) e de hemicelulose (xilanases, endo-xilanases,  $\alpha$ -glucosidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, acetil xilano esterases e  $\beta$ -xilosidases) (VAN DYK; PLETSCHE, 2012; KHELIL; CHEBA, 2014).

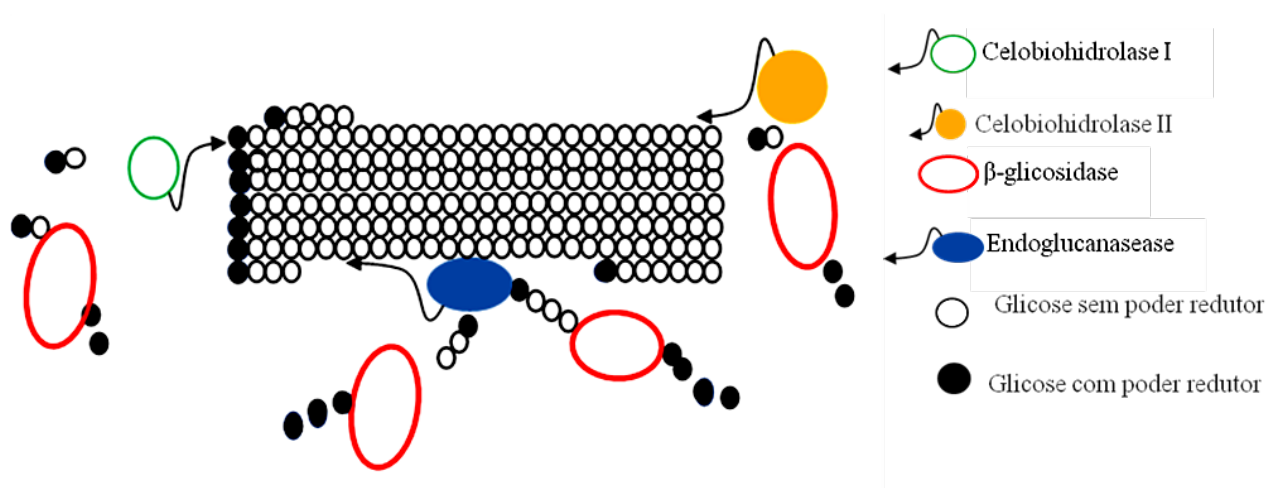
Neste contexto será dada ênfase as enzimas celulases e hemicelulases por serem alvos da presente pesquisa.

### 3.3.1 Enzimas celulolíticas

As celulases são um grupo de enzimas que são constituídas por um conjunto de hidrolases glicosídicas, que envolvem três tipos de enzimas: as endo-1,4  $\beta$ -glucanases (EG I, EG II, EG III E EG IV; EC. 3.2.1.4); as exo-1,4  $\beta$ -glucanases ou celobiohidrolases ou ainda as exoglucanases (CBH I, CBH II; EC e CBH II; EC 3.2.1.91) e as 1,4- $\beta$ -glucosidases (BG I e BG II; EC 3.2.1.21). A enzima 1,4- $\beta$ -glucosidase não é considerada uma celulase legítima por degradar substratos solúveis (DILLON; PIETRO, 2004; ZHANG *et al.*, 2007).

As enzimas celulolíticas constituem um complexo capaz de atuar sinergicamente sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise (ARANTES; SADDLER, 2010), pois quando atuam em conjunto apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010). São conhecidas três formas de sinergia entre as celulases (FIG 7): a) sinergia EnG-ExG: a endoglucanase, atuando nas regiões amorfas da fibra celulósica, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; b) sinergia ExG-ExG: as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase; c) sinergias ExG-BG e EnG-BG: a celobiohidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a  $\beta$ -glucosidase. A ação hidrolítica das celulases sobre a celulose libera monossacarídeos interessantes tanto para produção de bioetanol de segunda geração, como para produção de alguns produtos químicos que são potenciais substitutos para derivados de petróleo (BOZELL; PETERSEN, 2010).

**Figura 7** - Esquema representativo da ação das enzimas do complexo celulolítico na hidrólise da fibra celulósica



Fonte: Adaptado de CASTRO E PEREIRA JR. (2010).

### 3.3.1.1 Endoglucanases

A Endoglucanase (EC 3.2.1.4) possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 1,4-β-D-glucana-4-glucano-hidrolase. Estas enzimas são responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose, a qual ocorre randomicamente nas regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica. Neste processo são liberados oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (LYND *et al.*, 2002). Estas enzimas, portanto, são fundamentais para a rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (ZHANG; LYND, 2004) que são substratos para atuação das Exo-1,4-glucanases (IBARRA; KÖPCKE; EK, 2010).

### 3.3.1.2 Exoglucanases

As exoglucanases (ExG) são constituídas pelas celobiohidrolases (CBH) e glucanohidrolases (GH) (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010). A GH (EC 3.2.1.74), também são denominadas de 1,4-β-D-glucana-glucano-hidrolases e possuem elevada importância na estratégia de hidrólise da fibra celulósica, pois são capazes de liberar glicose diretamente do

polímero (LYND *et al.*, 2002;CASTRO; PEREIRA Jr., 2010). A CBH (EC 3.2.1.91), denominada de 1,4- $\beta$ -D-glucana-celobiohidrolase se divide em dois tipos: CBH I, que hidrolisa terminais redutores (R) e a CBH II, que hidrolisa terminais não redutores (NR) (LYND *et al.*, 2002). Neste processo ocorre liberação de unidades de celobiose e celotriose que consistem em moléculas com duas ou três unidades de glicose, respectivamente (MAHMOOD *et al.*, 2013). De acordo com Castro e Pereira Jr. (2010) essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo produto de hidrólise (celobiose). Essas enzimas participam da hidrólise primária da fibra, sendo ainda, responsáveis pela ruptura física do substrato que promove o aumento da taxa de hidrólise da celulose por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases (ZHANG; LYND, 2004).

### 3.3.1.3 $\beta$ -Glucosidase

As  $\beta$ -glucosidases ou  $\beta$ -D-glucosideo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21) são enzimas que tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis, em glicose. Assim como a CBH, estas enzimas, também podem sofrer inibição por seu produto de hidrólise (LYND *et al.*, 2002). A deficiência desta enzima diminui a taxa de hidrólise resultando no acúmulo de celobiose e outros açúcares (JAVED *et al.*, 2011; ALFTRÉN; HOBLEY, 2013). A função da  $\beta$ -glucosidase, portanto, não é só hidrolisar celobiose à glicose, mas, também, reduzir a inibição da celobiose, resultando em um eficiente funcionamento da endo-glucanases e exo-glucanases (JAVED *et al.*, 2016).

Segundo Juha'sz *et al.* (2005) e Zhang; Lynd (2004), o processo de liberação da enzima  $\beta$ -glucosidase (BG) por micro-organismos é altamente dependente do meio de cultivo, sendo que em pH alto sua produção pode ser aumentada. De acordo com Ghose (1987) a atividade desta enzima pode ser determinada usando celobiose, uma vez que esta não é hidrolisada por endoglucanases e exoglucanases.

A alta concentração de glicose obtida nos processos de hidrólise celulolítica da biomassa é uma tarefa desafiadora devido à baixa concentração de  $\beta$ -glucosidase em microrganismos naturais (JAVED *et al.*, 2016).

### 3.3.2 Enzimas hemicelulolíticas

As hemicelulases são glicosidases responsáveis pela hidrólise da xilana a monômeros de xilose, mannose, glicose, galactose, arabinose, pequenas quantidades de

ramnose, ácido glicurônico, ácido metil glicurônico e ácido galacturônico (KHANDEPARKER; NUMAN, 2008). Dentro do grupo das hemicelulases, as xilanases microbianas (1,4- $\beta$ -D-xilana xilanohidrolases) são os catalisadores preferidos pelas indústrias para a hidrólise da xilana. Essa preferência se dá devido à sua alta especificidade, baixa perda de substrato e baixa geração de resíduos (MICHELIN *et al.*, 2008).

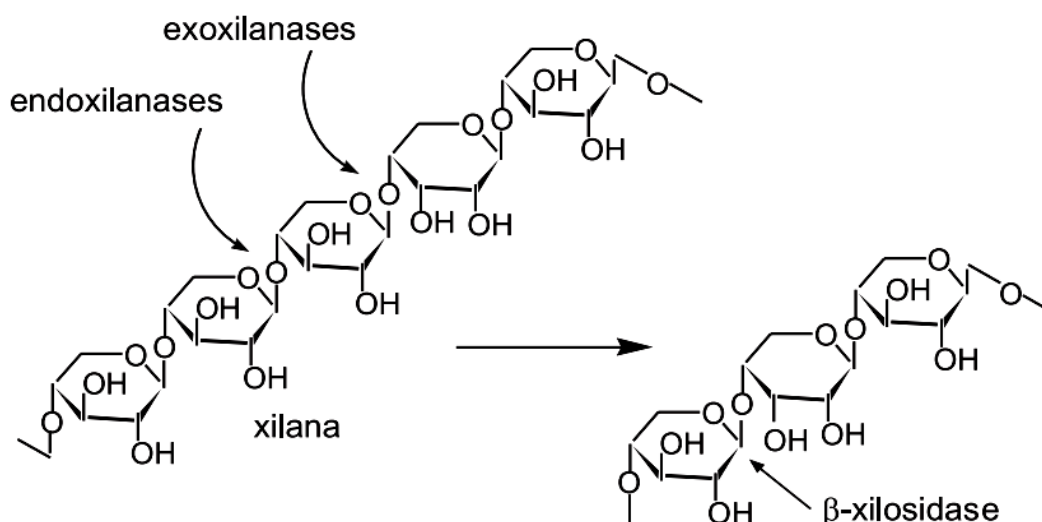
A heterogeneidade e complexidade da xilana requer uma variedade de enzimas que atuem de forma cooperativa, para promover a sua completa hidrólise. Dentre estas enzimas, tem-se: endo- $\beta$ -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidase (xilana-1,4- $\beta$ -xilosidase, EC 3.2.1.37),  $\alpha$ -glucuronidase ( $\alpha$ -glucosiduronase, EC. 3.2.1.55), acetilxilano esterase (EC 3.1.1.72)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidases - EC 3.2.1.55). Deste complexo as endo-xilanase e  $\beta$ -xilosidases são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana (JUTURU e WU, 2014).

### 3.3.2.1 Xilanases

A xilanase (EC 3.2.1.8) é a principal enzima do complexo das hemicelulases, cujos produtos de sua ação são xilo-oligossacarídeos, que uma vez degradados originam a xilotrioses e xilobioses (WONG; TAN; SADDLER, 1988; GIRIO *et al.*, 2010). Dentre as enzimas deste complexo, as endo- $\beta$ -1,4-xilanases e  $\beta$ -xilosidases são importantes para a degradação da xilana. Estas enzimas pertencem a classe de glicosídeo hidrolases (GH), classificadas em famílias. As quais são agrupadas em clãs (JUTURU; WU, 2012). As exo-xilanases (exo-1,4- $\beta$ -xilanase, EC 3.2.1.37), também pertencem à classe de enzimas GH e possuem atuação importante na despolimerização da xilana, no entanto seus estudos são incipientes (JUTURU; WU, 2014).

As xilanases são responsáveis pela hidrólise das moléculas de xilanas, o qual acontece por meio do mecanismo de ação das endo-xilanases e exo-xilanases (POLIZELI *et al.*, 2005), Figura 8. As endo-xilanases agem na cadeia principal de homopolímeros  $\beta$  1,4-D-xilopiranosose produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos à xilose pela ação das  $\beta$ -xilosidases (AHMED; RIAZ; JAMIL, 2009; KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). Em contrapartida, as exo-1,4- $\beta$ -xilanases degradam pequenos oligossacarídeos liberando xilose (DELICHEVA; DOBREV; PISHTIYSKI, 2008).

**Figura 8** - Estrutura da molécula de xilana e ação das enzimas xilanolíticas (endo-xilanases, exo-xilanases e  $\beta$ -xilanases).



Fonte: GOMES (2007).

### 3.3.3 Aplicação e uso de enzimas holocelulolíticas para produção de bioetanol de segunda geração

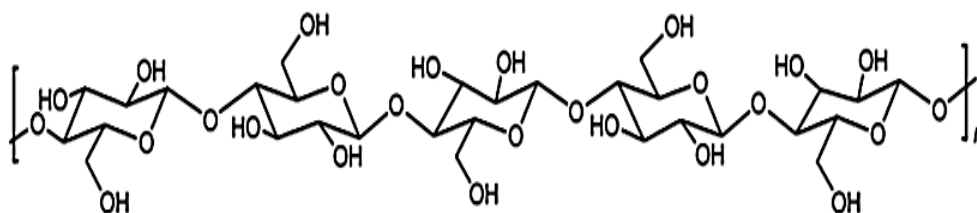
A produção de celulasas e hemicelulasas têm sido amplamente estudadas nos últimos anos devido às suas várias aplicações industriais, tais como produção de cerveja e vinhos, clarificação de suco, na indústria têxtil, na alimentação animal e branqueamento da polpa de papel (FARINAS, 2011; MAHMOOD *et al.*, 2013). Outra importante aplicação diz respeito a sua utilização como biocatalisadores na liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

Nos últimos anos a aplicação das enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico tem sido um dos mais emergentes procedimentos utilizados nos processos de hidrólise de biomassas lignocelulósicas. Pois estas biomassas contêm quantidades expressivas de celulose e hemiceluloses, que podem ser totalmente convertida, por ação enzimática, respectivamente, em glicose e xilose. No processo de hidrólise, as hemicelulasas, possuem papel fundamental, pois aumentam a eficiência das celulasas na hidrólise desta biomassa, uma vez que atuam na desestruturação do entrelaçamento entre hemicelulose e celulose presente na parede celular (FARINAS, 2011; CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

O aproveitamento total e integrado da biomassa lignocelulósica de modo a agregar valor à mesma torna-se uma fonte rentável, além de reduzir significativamente a competição com as culturas alimentares (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010; ROSA; GARCIA, 2009).

As matérias-primas lignocelulósicas são formadas basicamente de materiais fibrosos de matrizes complexas constituídas por três principais frações de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, unidas entre si por ligações covalentes formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010). Destas frações a celulose é considerada como o principal componente, sendo estas constituídas por um polímero linear formado de unidades de glicose unidas por ligações glicosídica do tipo  $\beta$ -D (1-4) sendo o polissacarídeo natural de maior ocorrência na natureza (FIG. 9). As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam ligações de hidrogênio, o que resulta em uma estrutura cristalina altamente ordenada conhecida como regiões amorfas (DING; HIMMEL, 2006). Esta formação confere maior resistência à tensão tornando a celulose insolúvel em água e em um grande número de outros solventes (BASSO; GALO; BASSO, 2010; SANTOS *et al.*, 2012).

**Figura 9** - Representação esquemática da molécula de celulose.



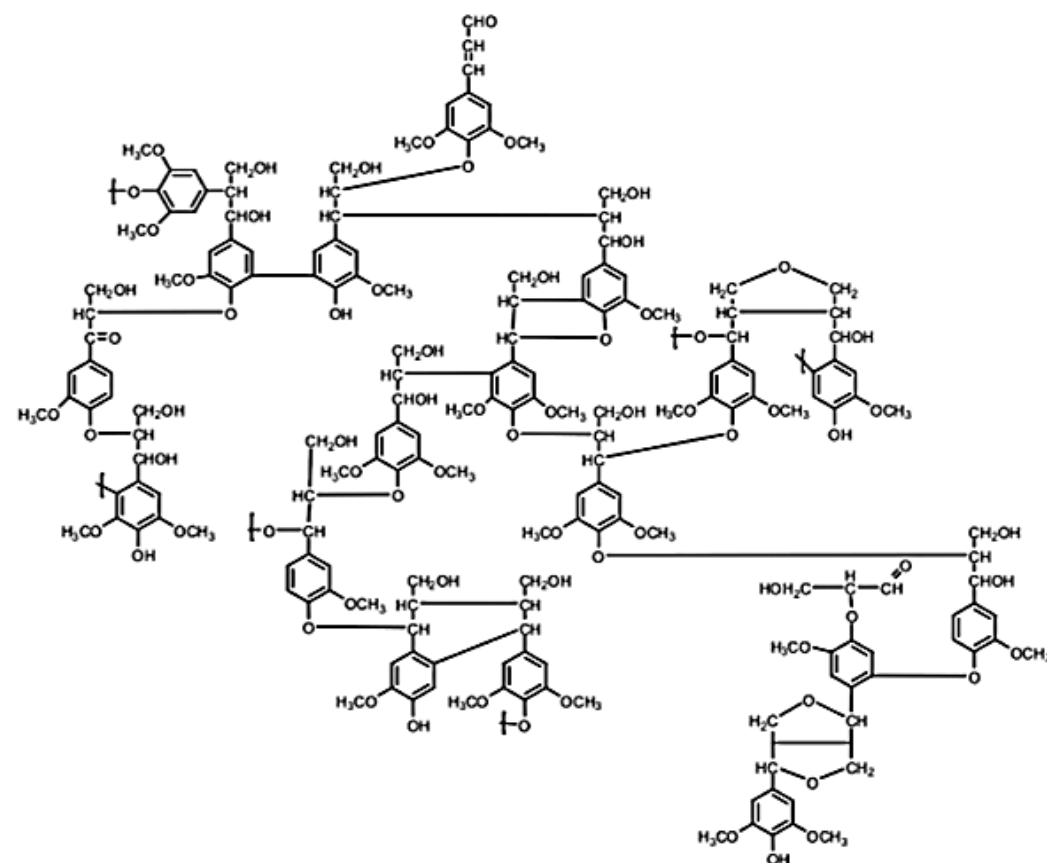
Fonte: SANTOS *et al.* (2012).

A segunda fração mais abundante da biomassa lignocelulósica é a lignina, a qual consiste em um heteropolímero amorfo constituído por três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico (FIG. 10). Esse heteropolímero tem como função aumentar a resistência da estrutura da parede celular a ataques químicos e enzimáticos (YANG *et al.*, 2002) e aumentar a eficiência da condução de água em plantas vasculares (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

A lignina, por apresentar natureza fenólica, não pode ser diretamente convertida em etanol (LARSEN *et al.*, 2008). Sendo assim à necessidade de novas tecnologias que possam decompor este polímero de forma prática e eficiente, além de baixo custo. Alguns

fungos, bactérias e insetos são capazes de produzir enzimas como as peroxidases de lignina e lacases, que são capazes de digerir a lignina (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

**Figura 10** - Representação esquemática da molécula de celulose.



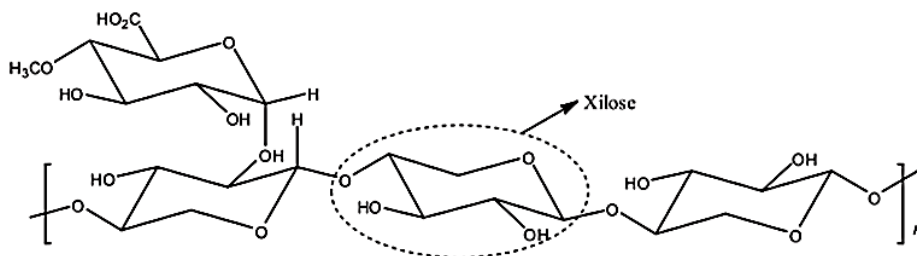
Fonte: SANTOS *et al.* (2012).

A hemicelulose (FIG. 11), considerada a terceira dentre as principais frações de materiais lignocelulolósicos, apresenta natureza heteropolissacarídica ramificada compostas por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico, ácido 4-O-metil-glucurônico e radicais acetila. Este polímero atua como um elo químico entre a celulose e a lignina (RAMOS, 2003; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2011) e sua estrutura, composição e localização variam de acordo com os gêneros de plantas (VIAKARI; VEHEMAANPERA; KOIVULA, 2012).

Nas hemiceluloses uma das porções mais abundante são as xilanas, as quais são constituídas por heteropolissacarídeos formados por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosse unidas através de ligações do tipo  $\beta$ -1,4 e, ocasionalmente, por ligações do tipo  $\beta$ -1,3 (SAHA, 2005). A bioconversão deste heteropolissacarídeo em açúcares, como a xilose, é essencial para o

processo de conversão de biomassa em energia renovável (JUTURU *et al.*, 2012; JUTURU 2014; DODD; CANN, 2009). Papon *et al.* (2014) reportam que em hidrolisados de hemicelulose, a xilose é o açúcar mais abundante, e que sua bioconversão em etanol se constitui em uma valorosa fonte alternativa de combustível.

**Figura 11** - Representação esquemática da molécula de hemicelulose.



**Fonte:** SANTOS *et al.* (2012).

O Brasil possui um interessante potencial para a produção de etanol de segunda geração, pois ostenta uma abundância de resíduos agroindustriais e florestais que são fontes ricas em celulose e hemicelulose. No cenário nacional de energia renovável há um especial interesse na diversidade microbiana, no que diz respeito à identificação de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial. Neste contexto a busca por novas linhagens microbianas produtoras de enzimas que degradam celulose e hemicelulose é imprescindível no aproveitamento desta biomassa.

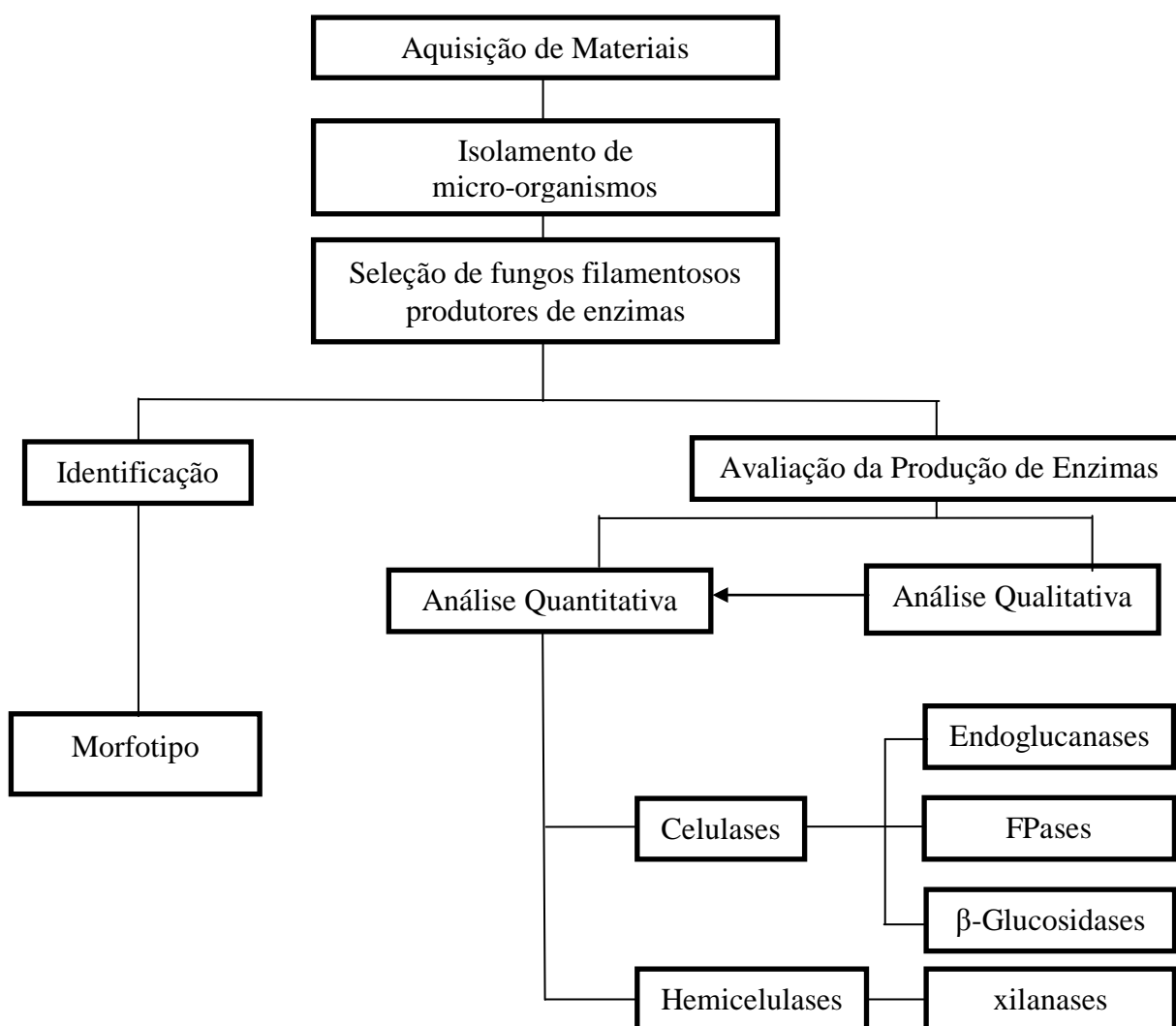




#### 4. METODOLOGIA

O desenvolvimento do presente estudo se deu através da aquisição da matéria-prima no campo e experimentos laboratoriais, realizados em etapas de isolamento, identificação, seleção e averiguação do potencial enzimático de micro-organismos isolados da biomassa lignocelulósica. As etapas de desenvolvimento deste trabalho poderão ser visualizadas no fluxograma da Figura 12.

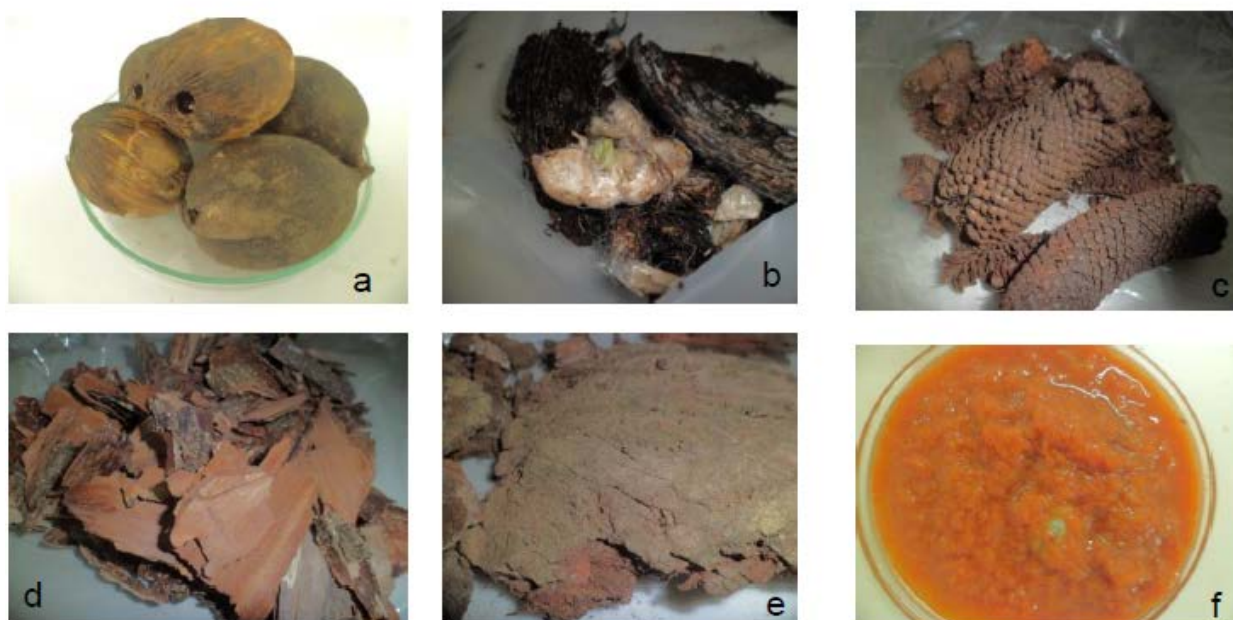
**Figura 12** - Fluxograma demonstrando as etapas de isolamento, identificação, seleção e investigação do potencial enzimático a partir de micro-organismos naturalmente ocorrentes em biomassas lignocelulósicas.



#### 4.1. Aquisição e isolamento de micro-organismos degradadores de celulose

A microbiota estudada foi isolada a partir de diferentes amostras de frutos, cascas e sementes de angiospermas e gimnospermas em estado parcial de decomposição. As biomassas coletadas foram: coco Indaiá (*Attalea dubia*), semente de mafumeira (*Ceiba pentandra*), fruto de mafumeira (*Ceiba pentandra*), estróbilo de araucária (*Araucaria* sp.), casca do tronco de acerola (*Malpighia emarginata*), casca de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e fruto da pitangueira (*Eugenia uniflora*), todas procedentes da Região do Vale do Jequitinhonha-MG (FIG 13). As biomassas coletadas para fins de isolamento foram transportados para o Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação – LabBBio da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM/Diamantina-MG, onde foram realizados os procedimentos experimentais.

**Figura 13** - Biomassas lignocelulósicas utilizadas como fonte de isolamento dos micro-organismos estudados.



a) coco Indaiá (*Attalea dubia*), b) semente e fruto de mafumeira (*Ceiba pentandra*), c) estróbilo de araucária (*Araucaria* sp.), d) casca do tronco de acerola (*Malpighiaemarginata*), e) casca de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), f) fruto triturado da pitangueira (*Eugenia uniflora*).

Fonte: o autor

O isolamento foi realizado a partir de três gramas de amostra (biomassa) depositados em 50 mL de água destilada estéril, e submetidos à homogeneização em agitador orbital a 150 rpm por 30 minutos. Após esta etapa as amostras foram filtradas com auxílio de gaze estéril e o filtrado submetido a diluições sucessivas até  $10^{-6}$ . A partir das diluições procedeu-se a semeadura empregando a técnica de *spread-plate* em meio ágar Manachini (MANACHINI; FORTINA; PARINI, 1987) adicionado de carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono e, com pH ajustado para 5,0, conforme apresentado na Tabela 2. As culturas foram incubadas a 28 °C por até 15 dias, com monitoramento diário para fins de isolamento das colônias crescidas.

A solução de Manachini (MANACHINI *et al.*, 1987) foi preparada a partir da mistura dos componentes descritos na Tabela 2, com pH ajustado para 5,0, seguido de esterilização em autoclave a 120°C por 15 minutos, a 1 atm.

**Tabela 2** - Componentes químicos utilizados no preparo do meio de cultivo (meio de Manachini) para o isolamento dos micro-organismos estudados.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,9 g
CMC	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 MI

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>= Fosfato de potássio Monobásico; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>= Sulfato de amônio; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = Sulfato de magnésio hepta hidratado; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O = Fosfato de sódio di-hidratado; CMC= carboximetilcelulose.

As colônias crescidas foram coletadas e isoladas no meio ágar Manachini. Após crescimento e confirmação da pureza, pela ausência de micro-organismos indesejáveis, as colônias filamentosas isoladas foram conservados pela técnica de blocos de ágar em água destilada estéril (CASTELLANI, 1963) e mantidos sob-refrigeração a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . As colônias de aspectos cremosos foram conservadas em glicerol a 10% e mantidas sob congelamento a  $-18 \pm 1^\circ\text{C}$  para futuros estudos (SILVA; COSTA; RECHE, 2008). Os isolados foram codificados recebendo uma letra, escolhida aleatoriamente, seguida de um número associado à biomassa vegetal e a ordem de isolamento (TAB. 3), tendo como exemplo, M.1.1.1. (colônia isolada do coco indaiá, proveniente da 1º diluição ( $10^{-1}$ ) e representa a 1ª colônia isolada).

**Tabela 3** - Sistema utilizado para codificar os micro-organismos isolados de biomassas lignocelulósicas.

<b>Letra</b>	<b>Amostra (1º número)</b>	<b>Diluição (2º número)</b>	<b>Colônia isolada (3º número)</b>
M	1 – Casca do Coco Indaiá	1	1 – 1ª colônia isolada
	2 – Semente Mafumeira	2	2 – 2ª colônia isolada
	3 – Fruto Mafumeira	3	3 – 3ª colônia isolada
	4 – Estróbilo de Araucaria	4	4 – 4ª colônia isolada
	5 – Pitanga	5	5 – 5ª colônia isolada
	6 – Casca do tronco Acerola	6	6 – 6ª colônia isolada
	7 – Casca do tronco do Eucalipto		7 – 7ª colônia isolada
			8 – 8ª colônia isolada
			9 – 9ª colônia isolada

#### 4.2. Identificação dos fungos filamentosos em nível de gênero

A microbiota proveniente das biomassas lignocelulósicas foi identificada quanto ao tipo de microrganismo presente, se bactérias ou fungos filamentosos ou leveduriformes, através de análises morfológicas. Os fungos filamentosos isolados foram avaliados quanto ao potencial para produção de enzimas holocelulolíticas. Os isolados que apresentaram resultados relevantes quanto a atividade enzimática foram submetidos à identificação em nível de gênero.

A identificação foi realizada por meio de estudos morfológicos, macro e microscópicos, utilizando como base a literatura científica e/ou chaves de identificação.

##### 4.2.1. Identificação macroscópica

Os estudos macroscópicos foram realizados a partir dos primeiros cultivos das colônias em meio de cultura específicos para identificação de fungos filamentosos citados em vários estudos. Neste sentido os meios recomendados foram: batata-dextrose ágar – PDA (marca Difco), Czapek extrato de levedura - CYA ( $K_2HPO_4$  0,1%,  $NaNO_3$  0,3%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5%, KCl 0,5%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01%, sacarose 20%, extrato de levedura 0,5% e ágar 1,5%); ágar aveia – AO (farinha de aveia 3,0% e ágar 1,5 %), e ágar extrato de malte – MEA (extrato de malte 2,0%, glicose 0,20%, peptona 0,1% e ágar 2,0%). Para tanto, foram observados, os seguintes aspectos: cor, textura, pigmentação do verso e anverso, forma da colônia, além da velocidade de crescimento pela medida do diâmetro da colônia, incubada a 28°C por até sete dias ou total crescimento na placa de Petri. As análises microscópicas foram

realizadas por meio da técnica de micro cultivo (RIDDELL, 1950) e lâminas a fresco coradas com azul de metileno. Os micro-organismos foram observados utilizando lentes objetivas de 40x e 100x em microscópio Bioval e Bel Photonic. As imagens foram capturadas com câmara digital Canon Bel Photonic de 5,0 Mpixel.

### 4.3. Avaliação de produção de enzimas holocelulolíticas por fungos filamentosos

Com intuito de selecionar apenas micro-organismos exímios produtores de enzimas holocelulolíticas (celulases e xilanases), as linhagens isoladas foram avaliadas quanto ao seu potencial de produção conforme descrito a seguir.

Somente os isolados identificados como fungos filamentosos foram submetidos aos processos de fermentação submersa para avaliação da produção das enzimas carboximetilcelulases (CMCases), FPases,  $\beta$ -glucosidases e xilanases. Para tanto, os isolados fúngicos foram inoculados, com alça de platina calibrada 10  $\mu$ L, em meio líquido Manachini conforme descrito na Tabela 4. O meio foi preparado utilizando CMC como única fonte de carbono e o inóculo incubado sob agitação a 150 rpm, incubado a 28°C.

Após a inoculação, a cada 24 horas foi coletado 1mL do meio reacional para averiguação das atividades enzimáticas. A alíquota coletada foi submetida à centrifugação a 15.338,96g (centrífuga marca MPW-350R) sob refrigeração a 4°C, por 5 minutos. Durante as análises as amostras foram mantidas em banho de gelo.

**Tabela 4** - Composição química da solução de Manachini, pH 5,0, tendo carboximetilcelulose como substrato.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade (g)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,9
CMC	10,0
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=Fosfato de potássio Monobásico; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=Sulfato de amônio; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O =Sulfato de magnésio hepta hidratado; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O=Fosfato de sódio dibásico; CMC= carboximetilcelulose.

As determinações das atividades enzimáticas foram realizadas com base nos métodos descritos por Ghose (1987); Wood e Bhat (1988); Bailey *et al.* (1992). Os métodos foram adaptados para ensaio em microplacas de 96 poços com fundo plano e transparente a

luz visível. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas (ASYS UVM 340) nos comprimentos de onda específicos para cada ensaio de atividade.

O ensaio para carboximetilcelulase (CMCase) foi realizado com volumes de suspensão do extrato enzimático variando de 10 a 40  $\mu\text{L}$  avolumado para 50  $\mu\text{L}$  com tampão acetato 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 5,0. Esta amostra foi acrescida de 50  $\mu\text{L}$  do substrato carboximetilcelulose (CMC) 1% diluído em tampão acetato 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 5,0, perfazendo um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . O meio reacional contido nas microplacas foi incubado por 30 minutos a 50°C em estufa. A determinação dos açúcares redutores provenientes da hidrólise enzimática foi realizada pelo método do DNS (MILLER, 1959) pela adição de 150  $\mu\text{L}$  do reagente ácido dinitrosalisílico (DNS) aos poços. A seguir, o ensaio foi incubado por cinco minutos em banho de água fervente, seguido de resfriamento em banho de gelo, e leitura espectrofotométrica a 540 nm em leitor de microplacas.

A atividade FPásica (celulases totais) foi determinada utilizando tiras de papel filtro N°1 (2,0 x 0,5 cm) como substrato, sendo estas depositadas sobre a parede dos poços das microplacas. Os volumes de extrato enzimático e tampão acetato foram os mesmos utilizados no ensaio para determinação de CMCase. Sendo a incubação realizada por 60 minutos de a 50° C. A determinação dos açúcares também foi realizada pelo método do DNS (MILLER, 1959) conforme já descrito e com leitura a 540 nm em leitor de microplacas.

A atividade  $\beta$ -glucosidásica foi determinada adicionando os mesmos volumes de extrato enzimáticos utilizados para dosagens anteriores. Ao extrato enzimático foram adicionados, como substrato, 50  $\mu\text{L}$  de solução de celobiose a 1% diluído em tampão acetato 50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 5,0. Transcorridos 30 minutos de incubação a 50° C, procedeu-se incubação em banho de água fervente por 1 minuto, seguido de resfriamento em gelo. Em seguida foi realizada a quantificação do teor de glicose pelo método enzimático-colorimétrico GOD-POD com adição de 200  $\mu\text{L}$  do reagente comercial (Glicose PAP marca LABTEST). O ensaio foi submetido de incubação por 10 minutos em banho-maria a 37°C. A quantificação foi realizada por espectrofotometria com leitura a 510 nm em leitor de microplaca.

A quantificação da atividade xilanásica seguiu o mesmo procedimento metodológico proposto para CMCase. Porém, os volumes dos meios fermentados variaram entre 5 e 35 $\mu\text{L}$  e uma solução de xilana de bétula a 3% foi usada como substrato. O tempo de incubação do ensaio foi de cinco minutos. Os produtos da reação foram quantificados pelo método do DNS como já descrito.

Os ensaios enzimáticos foram acompanhados de um branco preparado nas mesmas condições descritas para cada ensaio, substituindo-se o extrato enzimático por

tampão acetato. A curva analítica foi preparada utilizando glicose como padrão nas concentrações de 0 a 1 mg mL<sup>-1</sup> para as enzimas CMCase, FPase e  $\beta$ -glicosidase e, xilose para a enzima xilanase, na mesma concentração já descrita, 0 a 1 mg mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos como uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a quantidade de meio fermentado, livre de partículas, necessária para produzir a liberação de 1  $\mu$ mol de açúcar redutor, expresso em glicose, por minuto nas condições do ensaio.





## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento

No presente estudo, foram obtidos 112 isolados sendo destes, 68 linhagens filamentosas, 02 leveduriformes e 42 bactérias (Tabela 5). Dos fungos filamentosos 30,88% foram isolados de casca de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), seguidos de 27,94% isolados do coco indaiá (*Attalea geraensis*) e 26,47% isolados da casca do tronco de acerola (*Malpighia emarginata*). O maior número de bactérias isoladas foi procedente de semente de mafumeira (*Ceiba pentandra*) (23,80%) e do coco indaiá (21,42%). Em relação às leveduras, as linhagens isoladas, representaram apenas 1,78% do total de micro-organismos isolados, foram provenientes dos frutos da pitangueira triturados (*Eugenia uniflora*). Na Tabela 6 encontram-se relacionados os organismos isolados com seus respectivos códigos e origens.

**Tabela 5** - Quantidade de isolados a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas em meio sintético de Manachini utilizando carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono.

Biomassas Lignocelulósicas	Quantidade (n°)			Total de Isolados
	Bactérias	Fungos Filamentosos	Leveduras	
Coco Indaiá ( <i>Attalea geraensis</i> )	09	19	AC	28
Semente de mafumeira ( <i>Ceiba pentandra</i> )	10	01	AC	11
Fruto de mafumeira ( <i>Ceiba pentandra</i> )	05	AC	AC	05
Estróbilo de araucária ( <i>Araucariasp.</i> )	07	08	AC	15
Casca do tronco de acerola ( <i>Malpighia emarginata</i> )	03	17	AC	20
Casca da madeira de eucalipto ( <i>Eucalyptus</i> sp.)	05	21	AC	26
Fruto da Pitangueira ( <i>Eugenia uniflora</i> )	03	02	02	07
Total de Isolados	42	68	02	112

AC - Ausência de crescimento

**Tabela 6** - Tipo e origem dos microrganismos isolados a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas. (a) casca do coco indaiá; (b) semente de mafumeira; (c) fruto de mafumeira; (d) estróbilo de araucária; (e) casca do tronco de acerola; (f) casca de eucalipto e (g) casca da pitangueira.

Linhagens	Tipo de Microrganismo/Origem	Linhagens	Tipo de Microrganismo/Origem	Linhagens	Tipo de Microrganismo/origem
M02	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M62	Fungo filamentoso <sup>b</sup>	M128	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M03	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M64	Bactéria <sup>b</sup>	M129	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M04	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M66	Bactéria <sup>c</sup>	M131	Bactéria <sup>e</sup>
M05	Bactéria <sup>a</sup>	M67	Bactéria <sup>c</sup>	M133	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M06	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M71	Bactéria <sup>c</sup>	M135	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M07	Bactéria <sup>a</sup>	M72	Bactéria <sup>c</sup>	M136	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M08	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M73	Bactéria <sup>c</sup>	M137	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M10	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M74	Bactéria <sup>d</sup>	M139	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M11	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M75	Bactéria <sup>d</sup>	M140	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M13	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M76	Bactéria <sup>d</sup>	M142	Fungo filamentoso <sup>e</sup>
M14	Bactéria <sup>a</sup>	M77	Bactéria <sup>d</sup>	M150	Bactéria <sup>f</sup>
M15	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M78	Fungo filamentoso <sup>d</sup>	M151	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M16	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M79	Fungo filamentoso <sup>d</sup>	M153	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M19	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M80	Fungo filamentoso <sup>d</sup>	M154	Bactéria <sup>f</sup>
M20	Bactéria <sup>a</sup>	M82	Fungo filamentoso <sup>d</sup>	M155	Bactéria <sup>f</sup>
M22	Bactéria <sup>a</sup>	M85	Fungo filamentoso <sup>d</sup>	M156	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M24	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M86	Fungo filamentoso <sup>d</sup>	M158	Bactéria <sup>f</sup>
M25	Bactéria <sup>a</sup>	M87	Bactéria <sup>d</sup>	M159	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M27	Bactéria <sup>a</sup>	M88	Fungo filamentoso <sup>d</sup>	M160	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M28	Bactéria <sup>a</sup>	M89	Fungo filamentoso <sup>d</sup>	M161	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M35	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M91	Bactéria <sup>d</sup>	M162	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M36	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M92	Bactéria <sup>d</sup>	M163	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M38	Bactéria <sup>a</sup>	M95	Levedura <sup>g</sup>	M164	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M39	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M96	Bactéria <sup>g</sup>	M165	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M42	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M97	Fungo filamentoso <sup>g</sup>	M166	Bactéria <sup>f</sup>
M44	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M100	Fungo filamentoso <sup>g</sup>	M167	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M45	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M107	Bactéria <sup>g</sup>	M168	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M47	Fungo filamentoso <sup>a</sup>	M110	Bactéria <sup>g</sup>	M169	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M48	Bactéria <sup>a</sup>	M112	Levedura <sup>g</sup>	M171	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M49	Bactéria <sup>a</sup>	M116	Bactéria <sup>e</sup>	M172	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M51	Bactéria <sup>b</sup>	M117	Fungo filamentoso <sup>e</sup>	M173	Bactéria <sup>f</sup>

*Continuação*

<b>Linhagens</b>	<b>Tipo de Microrganismo/Origem</b>	<b>Linhagens</b>	<b>Tipo de Microrganismo/Origem</b>	<b>Linhagens</b>	<b>Tipo de Microrganismo/origem</b>
M53	Bactéria <sup>b</sup>	M118	Fungo filamentoso <sup>e</sup>	M178	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M54	Bactéria <sup>b</sup>	M120	Fungo filamentoso <sup>e</sup>	M184	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M55	Bactéria <sup>b</sup>	M121	Fungo filamentoso <sup>e</sup>	M186	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M56	Bactéria <sup>b</sup>	M122	Fungo filamentoso <sup>e</sup>	M187	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M57	Bactéria <sup>b</sup>	M124	Fungo filamentoso <sup>e</sup>	M188	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M58	Bactéria <sup>b</sup>	M125	Fungo filamentoso <sup>e</sup>	M175	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M59	Bactéria <sup>b</sup>	M126	Fungo filamentoso <sup>e</sup>	M177	Fungo filamentoso <sup>f</sup>
M60	Bactéria <sup>b</sup>	M127	Fungo filamentoso <sup>e</sup>		

## 5.2. Avaliação das atividades enzimáticas de interesse

Os microrganismos isolados neste estudo foram capazes de crescer em meio de cultivo contendo CMC como única fonte de carbono. Essa capacidade indica a habilidade de tais organismos em decompor o polissacarídeo ofertado como fonte de carbono e assimilar os produtos derivados.

O perfil de secreção das atividades enzimáticas pesquisadas para o experimento conduzido com os isolados oriundos de biomassas lignocelulósicas podem ser visto no anexo A (FIG.26 a FIG.33). Aparentemente, os melhores resultados de atividade endoglucanásica (CMCásica) foram alcançados em 120 horas com as linhagens M03, M10 e M19, enquanto a linhagem M47 alcançou um pico de produção em 192 horas. As melhores atividades  $\beta$ -glucosidásica tiveram máximo de produção em 144 horas para as linhagens M162 e M136. Outro pico máximo para  $\beta$ -glucosidásica observado foi com 72 horas para a linhagem M04. As linhagens M163, M122 e M160 demonstraram atividades FPásicas com picos de produção em 192 horas. As atividades xilanásicas tiveram os melhores resultados com picos de produção em 120 horas com a linhagem M82 e 144 horas com as linhagens M171 e M186. Um segundo pico de atividade xilanolítica foi observado com 96 horas.

Dos 68 microrganismos investigados quanto ao potencial enzimático, 76,47% das linhagens apresentaram atividade para todas as enzimas estudadas, CMCCase, FPase,  $\beta$ -glucosidase e xilanase, e ainda, que todas exibiram atividade para no mínimo três destas enzimas. Quanto a xilanase, todas as linhagens isoladas (100%) apresentaram atividade.

Na Tabela 8 encontram-se os valores das atividades para CMCCase, FPase,  $\beta$ -glucosidase e xilanase após 216 h de crescimento em fermentação submersa a 28 °C. A partir dos 68 fungos filamentosos estudados, para a atividade CMCásica (endoglucanases), foram observados valores de atividade entre 2,11 a 4.870,38 U L<sup>-1</sup>. Sete linhagem apresentaram atividade enzimática CMCásica superior a 1.000 U L<sup>-1</sup> e seis não demonstraram atividade alguma. O melhor resultado para a atividade CMCásica foi observado para a linhagem M47, isolada da casca do coco indaiá, com atividade de 4.870,38 U L<sup>-1</sup>, seguida da linhagem M124, proveniente da casca do tronco de acerola, com 2.202,00 U L<sup>-1</sup>.

A atividade enzimática FPásica foi registrada na faixa de 3,40 a 1.586,00 U L<sup>-1</sup>. Sendo que do total de isolados, sete linhagens não apresentaram atividade alguma. As maiores atividades de FPase foram observadas com 192 horas de fermentação para as linhagens de M137, M164, e para as linhagens M160 e M122, com valores correspondentes de 1.586,00  $\pm$  398,00 U L<sup>-1</sup>; 1.416,76  $\pm$  25,05; 1.119,00  $\pm$  142,52 U L<sup>-1</sup> e 1.025,41  $\pm$  166,00 U L<sup>-1</sup>. Estas

linhagens foram isoladas da casca de eucalipto e casca do tronco de acerola conforme apresentado na Tabela 7.

As atividades de  $\beta$ -glucosidases apresentaram valores variando de 10,75 a 1.531,95 U L<sup>-1</sup>, sendo que apenas três das linhagens isoladas (M129, M161 e M142) não apresentaram atividade alguma (TAB 7). Os maiores valores foram registrados para as linhagens de M162 e M136, nos tempos de 144 e 168 horas de fermentação, com atividades correspondentes de  $1.531,95 \pm 183,97$  e  $1.362,23 \pm 287,36$  U L<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos para as atividades xilanásicas encontradas nos meios fermentativos foram registrados na faixa de 130,92 a 15.152,86 U L<sup>-1</sup>. Os valores mais expressivos foram de  $6.358,26 \pm 668,63$  para a linhagem M163 e,  $8.205,33 \pm 669,70$  e  $9.245,00 \pm 621,00$  para as linhagens M164 e M167,  $9.333,84 \pm 742,95$  para a linhagem M137;  $10.502,15 \pm 1.544,28$ ;  $12.696,17 \pm 1.335,05$ ;  $12.826,00 \pm 505,00$  e  $15.152,86 \pm 1.335,05$  U L<sup>-1</sup>, para as linhagens codificadas como M160, M171, M82 e M186, respectivamente (Tabela 7). A melhor atividade registrada foi para a linhagem M186, proveniente da madeira de eucalipto.

Em relação ao tempo de fermentação, foi possível observar que dentre as linhagens que produziram valores expressivos de atividades enzimáticas, o menor tempo de fermentação foi de 96 horas para a linhagem M160, seguida da linhagem M167, com 120 horas. As demais apresentaram atividade, com tempo igual ou superior a 144 horas (Tabela 7).

**Tabela 7** - Atividades de celulases e xilanases de fungos filamentosos isolados de matérias-primas lignocelulósicas oriundos da região do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, por fermentação submersa em meio de cultura contendo CMC como única fonte de carbono, por até 216 horas, a 28°C.

Linhagens	Atividade Enzimática (U L <sup>-1</sup> ) e Tempo de Incubação							
	CMCase	Tempo	FPase	Tempo	$\beta$ -glucosidase		Xilanase	Tempo
M86 <sup>a</sup>	47,00±1,00	108h	112,00±10,00	144h	351,14±39,60	168h	658,92±51,14	72h
M167	140,83±19,58	48h	686,00±58,00	168h	544,12±59,37	96h	9.245,00±621,00	120h
M165	311,00±28,00	180h	285,00±32,52	144h	720,00±48,64	120h	4.796,13±679,00	120h
M124	2.202,00±247,00	192h	73,85±25,91	144h	297,20±80,00	144h	1.981,64±342,00	192h
M02 <sup>a</sup>	474,00±195,00	108h	738,00±63,41	168h	254,43±24,93	96h	2.333,00±254,45	120h
M128 <sup>a</sup>	71,30±9,00	168h	Nd	-	411,00±34,09	144h	417,63±49,74	48h
M162 <sup>a</sup>	283,81±29,00	168h	310,45±72,76	168h	1.531,95±183,97	144h	3.049,61±455,72	120h
M151	374,00±47,00	108h	305,62±66,38	192h	738,10±113,27	144h	5.147,33±1.120,00	120h
M44	14,00±4,00	168h	Nd	-	275,00±15,21	144h	988,84,00±72,97	192h
M82 <sup>a</sup>	189,77±21,03	180h	183,28±24,28	192h	379,45±25,41	144h	12.826,00±505,00	120h
M03 <sup>a</sup>	1.636,81±412,03	120h	427,76±215,78	192h	881,76±192,00	72h	1.487,78±167,75	192h
M04	728,00±258,00	96h	127,09±24,60	48h	1.105,00±95,91	72h	1.762,61±91,51	96h
M10	1.160,00±14,00	120h	192,26±84,96	192h	919,38±180,14	72h	701,00±46,00	120h
M16	731,00±60,00	192h	178,90±7,42	192h	124,28±8,82	144h	1.007,70±156,82	144h
M35 <sup>a</sup>	1.260,00±44,00	168h	32,51±9,57	96h	187,98±7,89	96h	413,00±23,00	120h
M45	Nd	-	32,51±19,73	192h	199,52±17,46	144h	336,38±57,43	192h
M88 <sup>a</sup>	141,00±56,00	96h	Nd	-	76,00±2,08	96h	218,99±39,44	96h
M89 <sup>a</sup>	1.633,00±253,00	192h	Nd	-	187,98±27,13	96h	132,54±70,18	192h
M19	1.560,00±169,00	120h	Nd	-	286,60±125,77	96h	1.972,00±161,78	96h
M06 <sup>a</sup>	1701,05±212,78	168h	508,10±100,02	192h	47,76±9,23	192h	252,78±51,97	144h

Continuação

Linhagens	Atividade Enzimática (U L <sup>-1</sup> ) e Tempo de Incubação							
	CMCase	Tempo	FPase	Tempo	$\beta$ -glucosidase		Xilanase	Tempo
M11 <sup>a</sup>	88,39±8,10	120h	462,81 ±45,23	192h	408,55±40,00	192h	1.523,18±95,61	168h
M15 <sup>a</sup>	52,70±10,93	120h	457,71±31,00	192h	442,45±47,00	120h	700,79±50,31	168h
M47 <sup>a</sup>	4.870,38±2.744,00	192h	484,31±65,75	192h	142,84±13,00	216h	381,79±40,38	192h
M117	72,57±8,00	72h	297,09±45,91	192h	125,45±12,63	216h	1.193,19±89,43	168h
M125	188,83±20,10	120h	415,60±46,50	192h	57,29±5,7	192h	989,73±97,70	168h
M135	16,90±0,02	120h	354,70±53,09	192h	70,31±3,30	192h	3.383,13±295,00	192h
M153 <sup>a</sup>	75,61±8,03	120h	520,62±134,00	192h	943,38±83,35,00	192h	1.001,88±120,83	168h
M169 <sup>a</sup>	112,29±18,00	120h	836,98±124,48	192h	84,75±8,86	216h	2.215,00±186,00	120h
M177 <sup>a</sup>	112,29±19,76	120h	575,55±51,58	192h	87,93± 7,16	192h	1.333,26±143,00	168h
M13 <sup>a</sup>	28,00±2,00	48h	133,13±34,02	168h	94,14±23,60	48h	12.696,17±477,96	168h
M118 <sup>a</sup>	20,00±2,00	48h	167,90±8,42	168h	93,90±15,76	96h	4.842,61±477,96	144h
M120 <sup>a</sup>	6,00±2,00	168h	127,49±55,95	168h	107,38±31,24	48h	4.376,66±383,83	144h
M121 <sup>a</sup>	16,60±2,00	48h	152,03±30,53	168h	976,75±58,01	144h	3.739,81±480,53	144h
M126 <sup>a</sup>	Nd	-	87,29±0,101	168h	415,75±58,34	168h	1.863,57±215,67	144h
M136 <sup>a</sup>	19,66±1,00	120h	159,69±36,35	168h	1.362,23±287,36	168h	2.025,69 ±486,32	144h
M159 <sup>a</sup>	Nd	-	106,09±4,70	168h	824,94± 131,00	168h	4.455,51±758,32	144h
M163 <sup>a</sup>	92,51±3,69	96h	167,92±41,61	168h	331,44±17,18	168h	6.358,26±668,63	144h
M171 <sup>a</sup>	138,19±58,21	96h	120,06±10,16	168h	327,97±39,50	168h	12.696,17±1.335,05	144h
M186 <sup>a</sup>	149,71±82,00	96h	152,20±22,90	168h	288,40±70,58	168h	15.152,86±1.427,30	144h
M122 <sup>a</sup>	57,00±4,08	120h	1.025,41±166,00	192h	56,06±6,24	192h	4.917,95±496,24	192h
M127 <sup>a</sup>	31,65±7,00	120h	727,74±86,01	192h	87,66±10,70	192h	2.118,40±221,18	192h
M129	105,36±14,98	120h	201,71±5,18	192h	Nd	-	2.022,77±355,29	192h



*Continuação*

Linhagens	Atividade Enzimática (U L <sup>-1</sup> ) e Tempo de Incubação							
	CMCase	Tempo	FPase	Tempo	β-glucosidase		Xilanase	Tempo
M139 <sup>a</sup>	59,18±1,01	120h	636,89±84,35	192h	105,33±24,93	192h	1.378,10±181,31	192h
M137	Nd	-	1.586,00±398,00	192h	48,20±25,72	192h	9.333,84±742,95	192h
M160 <sup>a</sup>	119,21±15,64	96h	1.119,00±142,52	192h	35,06±18,46	192h	10.502,15±1.544,28	96h
M175 <sup>a</sup>	Nd	-	104,44±34,00	192h	23,91±16,66	168h	960,89±49,46	192h
M164	229,96± 36,82	96h	1.416,76±25,05	192h	670,00±90,63	192h	8.205,33±669,70	192h
M172 <sup>a</sup>	100,71±48,00	96h	753,43±19,20	192h	16,16±3,66	168h	1.608,20±139,48	216h
M187 <sup>a</sup>	88,31±19,24	120h	195,13±26,19	192h	12,47±0,92	168h	1.304,20±173,16	216h
M24 <sup>a</sup>	80,38±7,00	120h	84,23±9,40	120h	37,17±5,22	168h	1.099,82±175,84	96h
M39 <sup>a</sup>	17,49±4,8	120h	105,21±11,99	120h	10,75±2,71	120h	1.146,41±202,69	96h
M42 <sup>a</sup>	28,94±7,03	96h	Nd	-	48,74±8,71	120h	909,56±185,47	96h
M62 <sup>a</sup>	53,39±30,54	120h	Nd	-	17,14±1,43	192h	734,48±73,77	96h
M79 <sup>a</sup>	79,49±5,50	96h	156,03±11,45	144h	39,59±3,71	144h	1.793,10±149,14	96h
M80 <sup>a</sup>	96,79±5,03	120h	270,20±45,81	168h	32,93±2,403	120h	1.908,02±293,15	168h
M85 <sup>a</sup>	76,74±9,04	120h	308,44±23,02	168h	54,58±13,24	120h	2.047,08±367,84	168h
M97 <sup>a</sup>	121,04±19,00	120h	185,64±16,56	144h	34,08±7,74	192h	2.529,26±327,46	168h
M140 <sup>a</sup>	110,00±6,00	120h	700,15±28,69	168h	32,72±4,86	168h	5.128,35±495,79	168h
M161 <sup>a</sup>	87,79±6,57	72h	286,53±27,78	144h	Nd	-	5.989,03±664,07	144h
M08 <sup>a</sup>	13,31±1,36	168h	364,41±31,20	192h	49,79±5,42	72h	2.214,68±575,33	216h
M28 <sup>a</sup>	17,93±1,50	120h	108,77±11,01	168h	134,33±17,38	120h	902,35±190,50	192h
M36 <sup>a</sup>	21,01±8,20	120h	404,47±45,78	192h	56,030± 9,50	120h	785,88±78,44	192h
M50 <sup>a</sup>	2,11±0,129	120h	27,39±0,81	144h	58,28±11,19	120h	530,21±118,12	72h
M133 <sup>a</sup>	8,12±0,71	168h	148,86±18,62	168h	28,08±13,70	120h	441,27±47,50	48h
M142 <sup>a</sup>	7,12±0,57	216h	291,20±27,61	192h	Nd	-	1.066,98±229,89	168h

*Continuação*

Linhagens	Atividade Enzimática (U L <sup>-1</sup> ) e Tempo de Incubação							
	CMCase	Tempo	FPase	Tempo	β-glucosidase	Tempo	Xilanase	Tempo
M168 <sup>a</sup>	215,10±19,84	120h	304,11±28,97	192h	48,53±9,07	120h	1.815,65±209,76	96h
M179 <sup>a</sup>	Nd	-	3,40±0,70	72h	110,00±9,70	120h	489,11±30,95	72h
M184 <sup>a</sup>	112,92±16,69	96h	163,27±11,11	192h	58,93±7,67	120h	4.112,92±658,43	216h

U =quantidade de enzima necessária para liberar 1μmol de açúcar redutor, expresso em glicose, por minuto, por volume (Litro). CMCase – Carboximetilcelulase (endoglucanases). FPase – Celulases Totais. <sup>a</sup> Fungos não identificados; Nd – Não detectado.

### 5.3. Identificação dos fungos filamentosos isolados

Dentre as linhagens filamentosas que demonstraram acentuada capacidade para a produção de celulasas e xilanases foram identificados os gêneros *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Tabela 8).

**Tabela 8** - Identificação em nível de gênero de alguns das linhagens filamentosas que se destacaram como produtoras de celulasas e xilanases.

<b>Código</b>	<b>Linhagens</b>	<b>Origem</b>
M04	<i>Aspergillus</i> sp.	
M02	<i>Trichoderma</i> sp.	
M10	<i>Aspergillus</i> sp.	
M11	<i>Mucor</i> sp.	
M13	<i>Penicillium</i> sp.	Casca do coco Indaiá ( <i>Attalea geraensis</i> )
M16	<i>Aspergillus</i> sp.	
M19	<i>Mucor</i> sp.	
M24	<i>Mucor</i> sp.	
M44	<i>Curvularia</i> sp.	
M45	<i>Mucor</i> sp.	
M79	<i>Acremonium</i> sp.	Estróbilo da <i>Araucaria</i> sp.
M97	<i>Penicillium</i> sp.	Fruto da Pitangueira
M117	<i>Penicillium</i> sp.	
M124	<i>Penicillium</i> sp.	
M125	<i>Penicillium</i> sp.	
M129	<i>Aspergillus</i> sp.	
M135	<i>Penicillium</i> sp.	
M136	<i>Absidia</i> sp.	Casca do tronco de acerola ( <i>Malpighia emarginata</i> )
M133	<i>Fusarium</i> sp.	
M137	<i>Acremonium</i> sp.	
M139	<i>Penicillium</i> sp.	
M142	<i>Penicillium</i> sp.	
M145	<i>Penicillium</i> sp.	
M151	<i>Trichoderma</i> sp.	
M 153	<i>Penicillium</i> sp.	
M159	<i>Penicillium</i> sp.	
M161	<i>Acremonium</i> sp.	
M162	<i>Trichoderma</i> sp.	Casca da madeira de eucalipto ( <i>Eucalyptus</i> sp.)
M163	<i>Acremonium</i> sp.	
M164	<i>Trichoderma</i> sp.	
M165	<i>Trichoderma</i> sp.	
M167	<i>Trichoderma</i> sp.	
M169	<i>Trichoderma</i> sp.	
M172	<i>Penicillium</i> sp.	
M175	<i>Penicillium</i> sp.	
M186	<i>Absidia</i> sp.	

### 5.3.1. Análises morfológicas

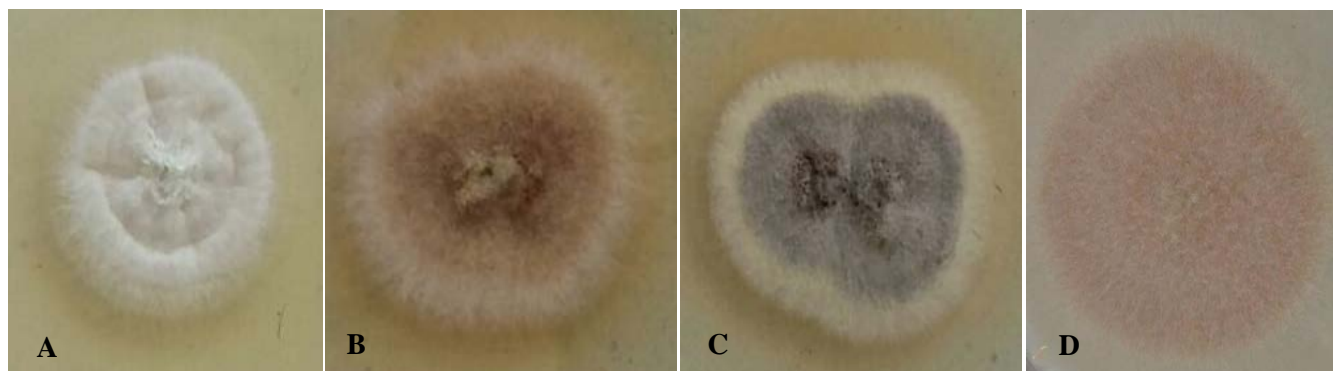
As características morfológicas das linhagens isoladas que permitiram a identificação em nível de gênero são descritas a seguir.

#### 5.3.1.1. *Acremonium* sp.

A identificação do gênero *Acremonium* foi realizada com base em observações macro e microscópicas apoiadas na literatura científica (GRÄFENHAN *et al.*, 2011, KIYUANA *et al.*; 2011; SUMMERBELL *et al.*, 2011).

A partir do crescimento da linhagem nos meios de cultura AO, CYA, MEA e BDA foi observado que esta apresentou coloração e aspecto topográfico distinto (FIG.14). A linhagem quando crescida em meio CZ, apresentou cor branca; no meio MEA, cor laranja pálido com bordas filamentosas brancas; no meio BDA, cor cinza com borda amarela claro, enquanto que no meio AO, a colônia exibiu cor rosa pálido com bordas brancas. Quanto a topografia foi observado que nos meios MEA e BDA a linhagem apresentou aspecto umbilicado com textura de camurça. No meio de cultura CZ a topografia também era umbilicada, porém com textura verrucosa, enquanto no meio AO, foi observada topografia plana com textura de camurça. A velocidade de crescimento da colônia foi semelhante nos quatro meios de cultura utilizado, apresentando uma média de 6,5 cm de diâmetro com sete dias, sugerindo ser uma linhagem de crescimento lento.

**Figura 14** - Aspectos macroscópicos da linhagem *Acremonium* sp., cultivado em diferentes meios de crescimento, incubados a 28°C.

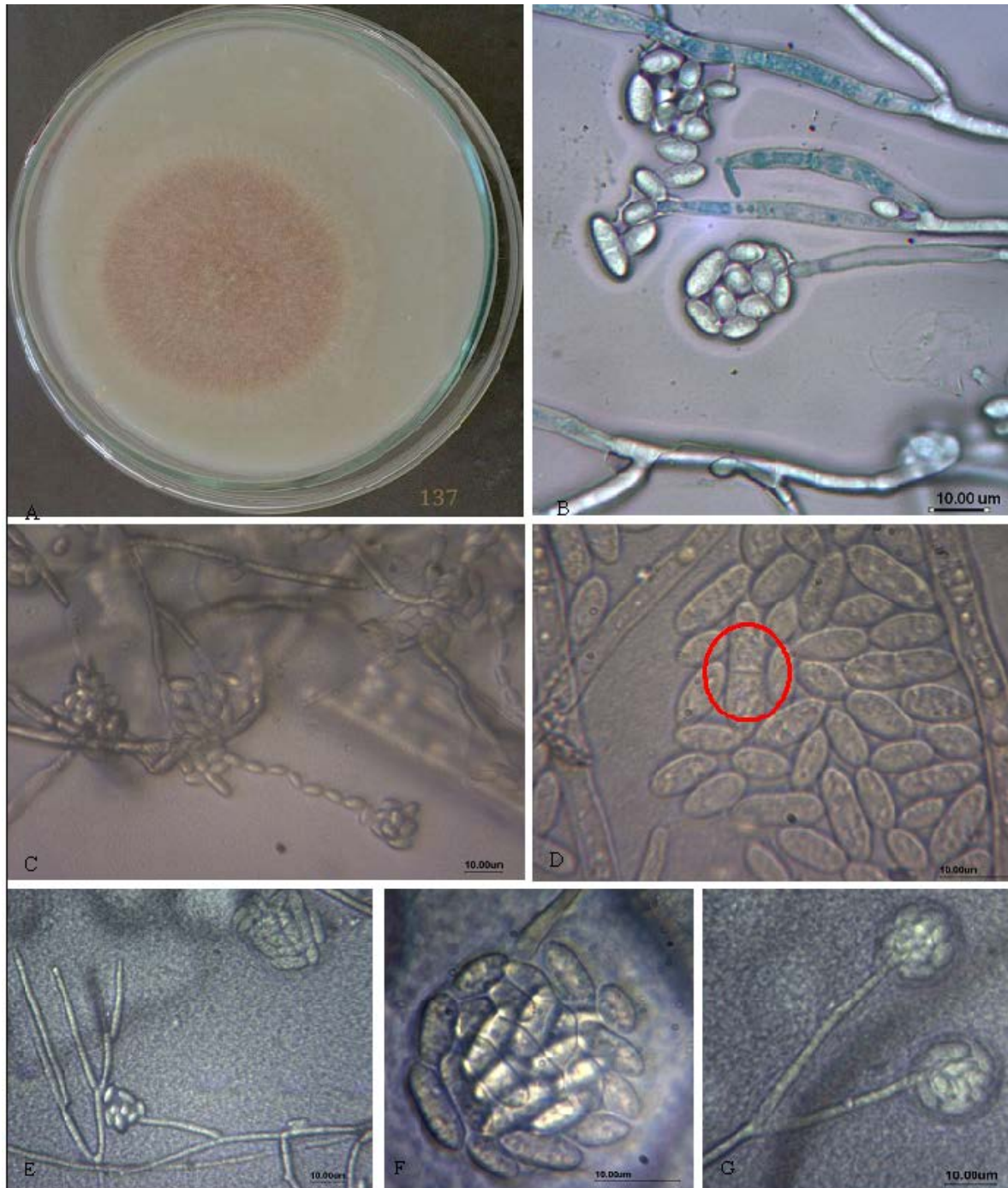


(A) meio CZ; (B) meio ágar malte; (C) meio BDA e (D) meio ágar aveia. Os cultivos representados por A, B e C apresentam sete dias de crescimento e em D, dez dias.

Fonte: o autor

Quanto às características microscópicas, foram visualizadas algumas estruturas simples, incluindo hifas hialinas septadas e ramificadas (FIG. 15D e 15E), além de conidióforos produzidos a partir das hifas (FIG 15E e 15F).

**Figura 15** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Acremonium* sp. M137 cultivado em meio ágar aveia (AO).



(A) Aspecto macroscópico; (B, E, F e G) Conídios reunidos em cabeças visosa; (C) Conídios produzidos em cadeias; (D) Conídios com e sem septo (0 - 1 septo) de forma obovoide e hifas hialinas; (F) Fiálide simples, raramente formando um ou dois ramos; (G) Células conidiogênicas. Barra = 10μm.

Fonte: o autor

Os conídios observados são hialinos, obovoide, na sua grande, ameroconídio sem septo, reunidos em cabeças conectados em uma mucilagem, dando aspecto viscoso. Mais raramente, foi observado conídios com um septo e em cadeias (FIG. 15B, C e D). De acordo com Kiyuna *et al.* (2011) as espécies do gênero, *Acremonium masseei*, *Acremonium murorum* e *Acremonium polychromum* tem como características a produção de conídios em cadeias.

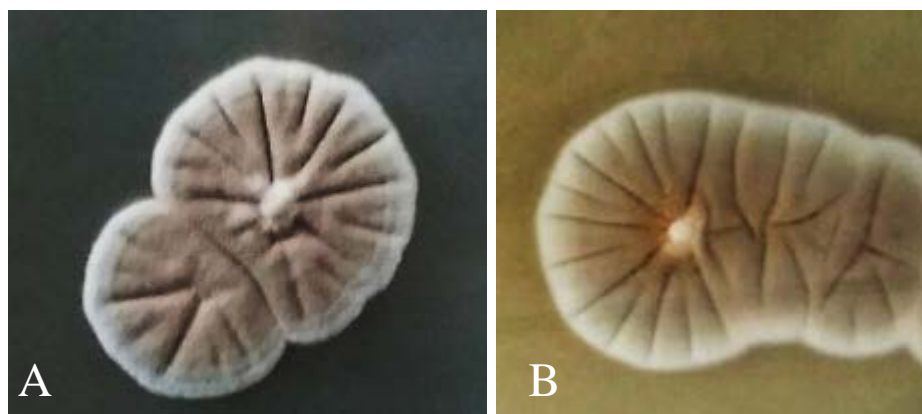
### 5.3.1.2 *Penicillium* sp

A identificação do gênero *Penicillium* (FIG. 16 e 17) foi realizada com base em observações macro e microscópicas apoiadas na literatura científica (SAMSOM; HOUBRAKEN, 2011; SAMSOM *et al.*, 2014; VISAGIE *et al.*, 2014).

As colônias quando cultivadas nos meios MEA, CYA e BDA apresentaram crescimento lento. No meio BDA apresentou crescimento de 3,2 cm de diâmetro; em CYA, 4,2 cm de diâmetro e em MEA 3,0 cm de diâmetro, todas com 10 dias de cultivo. A cultura, nos três meios, atingiu um máximo de 6 cm de diâmetro com 20 dias de cultivo a 28°C.

Quanto à coloração foi possível observar que as culturas MEA, e CYA, apresentaram micélio na cor marrom com bordas brancas. Enquanto que no meio BDA foi apresentou colônias na cor verde musgo com bordas brancas. Outra característica importante diz respeito ao aparecimento de exsudato (fluido orgânico secretado através da membrana) e pigmentos coloridos por toda colônia, quando cultivado em CYA (FIG 16B). Visagie *et al.* (2014) sugere que a presença de pigmentos e exsudato são características importantes para descrever esse gênero.

**Figura 16** - Aspectos macroscópicos da linhagem M159, *Penicillium* sp.



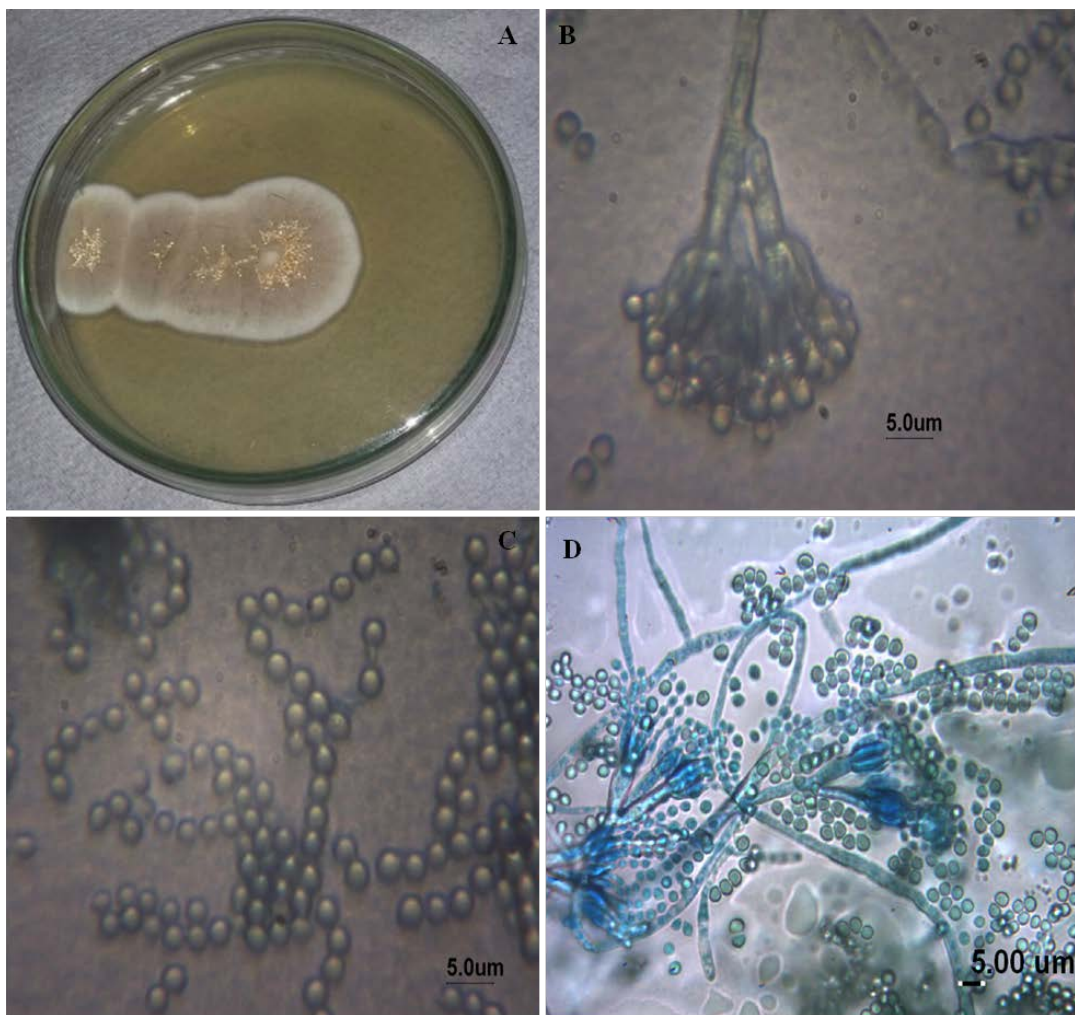
(A) cultivado no meio malte e (B) meio CYA. Ambos com dez dias de crescimento na temperatura de 28°C

Fonte: O autor

A colônia de *Penicillium* estudada (M159) exibiu algumas características similares quando cultivadas nos meios MEA, CYA e BDA, incluindo a topografia pregueada, textura pulverulenta, bordas irregulares, superfície rugosa e verso alterado na cor creme.

Em relação às características microscópicas foram observados que a linhagem M159 apresentou hifas septadas, conidióforos biverticilados, fiálides com grupos de métulas ramificadas (FIG 17B e D) e conídios esféricos, lisos e em cadeias (FIG 17C). De acordo com Visagie *et al.* (2014) o tipo de conidióforo se constitui em uma importante características no processo de descrição do gênero *Penicillium*.

**Figura 17** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Penicillium* sp. M159, em meio ágar CYA com 10 dias de crescimento a 28°C.



(A) Aspecto morfológico da cultura; (B) Conidióforos biverticilados; (C) Conídios esféricos e em cadeia; (D) Fiálides em grupos dando a aparência de pincel. A Figura representada em D, foi visualizada no aumento de 40x e as demais 100x. Barra de escala = 5μm.

Fonte: O autor

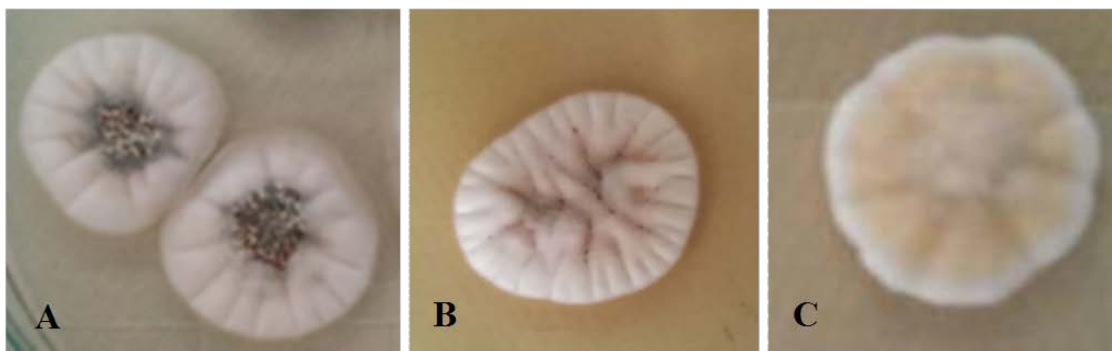
### 5.3.1.3 *Aspergillus* sp.

A identificação do gênero *Aspergillus* (FIG. 18 e 19) foi realizada com base em observações macro e microscópicas das linhagens, e apoiadas na literatura científica (SAMSOM; HOUBRAKEN, 2011; SAMSOM *et al.*, 2014).

A linhagem quando cultivada nos meios CYA, MEA e BDA a 28°C apresentaram crescimento lento com colônias atingindo o máximo de 4,0 cm de diâmetro. Ao atingir 10 dias de crescimento foi observado que a linhagem, quando cultivada, em meio CYA apresentou melhor desenvolvimento, atingindo 3,2 cm de diâmetro. A linhagem nos demais meios apresentou média de 2,35 cm de diâmetro.

Em se tratando do aspecto das colônias nos três meios de cultivo foi observado que: culturas crescidas em meio CYA apresentaram textura aveludada, com topografia crateriforme na parte central e pregueada nas bordas; cor rosa pálido, predominante, no centro da colônia e rosa intenso distribuído nos sulcos centrais, circundada por um anel de coloração amarelada, com bordas brancas. No anverso foi observada cor laranja pálido com pigmento difuso. Esta cultura apresentou exsudato em tons vermelho intenso e cor verde floresta. Em MEA, a colônia apresentou textura aveludada, com topografia pregueada, cor amarela areia e bordas esbranquiçadas. No meio de cultura BDA, a colônia exibiu textura aveludada e topografia pregueada. Quanto à coloração, foi observada cor verde floresta, que se desenvolve por toda colônia com o tempo, bordas brancas e exsudato de coloração esverdeada. Nos meios BDA e MEA foi observado no anverso cor amarelo pálido sem pigmento difuso.

**Figura 18** - Aspectos macroscópicos da linhagem *Aspergillus* sp. M16



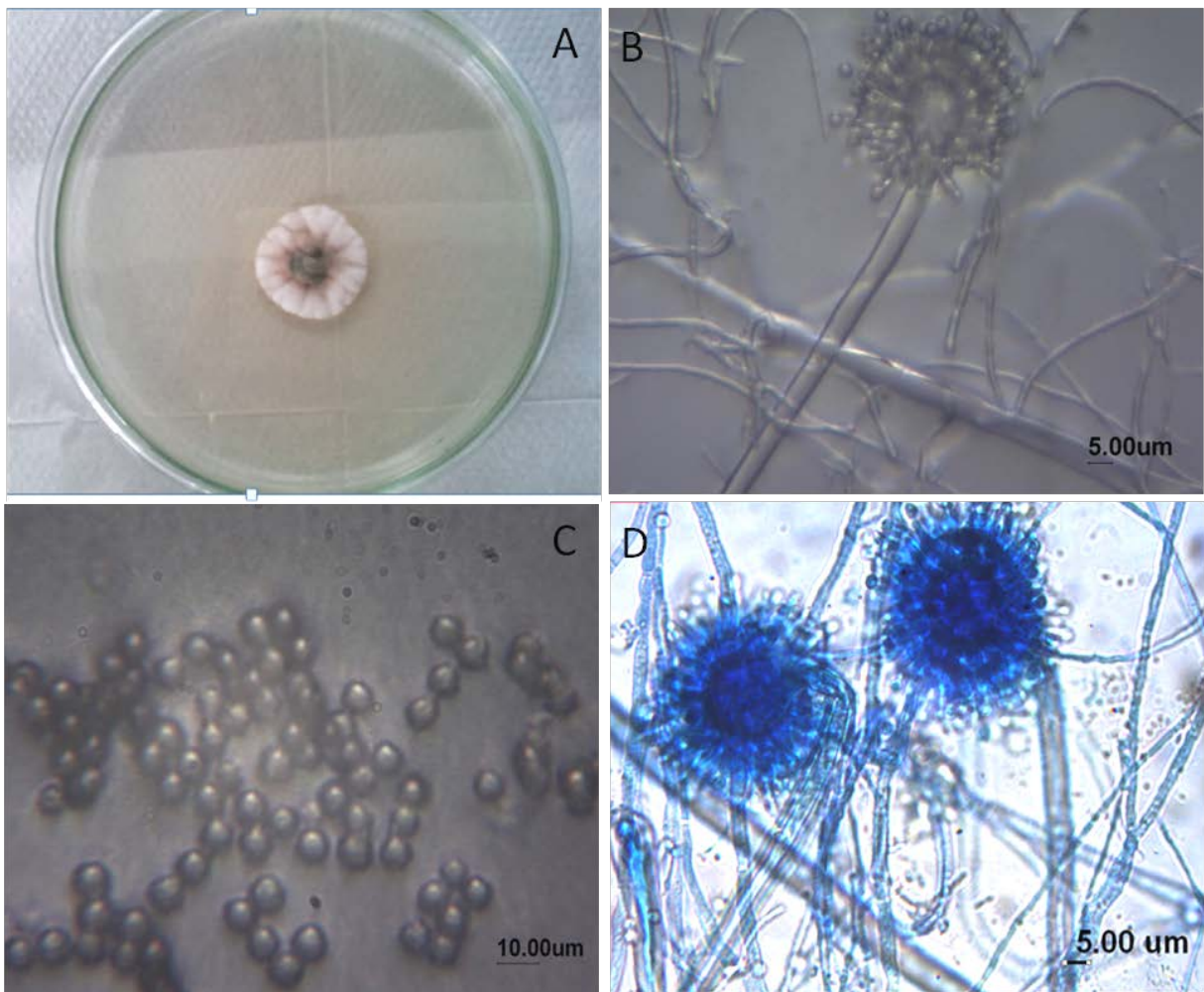
(A) meio BDA; (B) meio CYA e (C) meio Malte. Ambos com dez dias de crescimento na temperatura de 28°C.

Fonte: O autor.



Através da microscopia foi possível observar, nos três meios empregados, conidióforos simples sem ramificação, terminando em uma vesícula conidial com fiáldes, métulas e conídios em cadeia (FIG 19B, C e D). Apresentaram hifas hialinas, finas e septadas e conídios globosos e pigmentados (FIG 19C e D).

**Figura 19** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Aspergillus* sp. M16, em meio MEA.



(A) aspecto macroscópico; (B) conidióforos simples com formação de cabeça de conidial; (C) conídios globosos; (D) conidióforos e emaranhado de hifas septadas. Barra = 5.0µm.

Fonte: O autor

#### 5.3.1.4. *Trichoderma* sp.

A identificação do gênero *Trichoderma* (FIG 20 e 21) foi realizada com base em observações macro e microscópicas apoiadas na literatura científica (YABUKI; MIYAZAKI; OKUDA, 2014; JAKLITSCH; VOGLMAYR, 2015, ZHU; ZHUANG, 2015;).

A partir do cultivo da linhagem nos meios CYA, MEA e BDA, foi observado que estas atingiram 9,0 cm de diâmetro em dois dias de incubação a 28°C, indicando, se tratar de um fungo de crescimento invasor. As colônias apresentaram topografia plana, textura flocosa com hifas aéreas e densas. Após dez dias de crescimento foi observada uma compactação do micélio, apresentando aspecto arenoso. No meio BDA, a colônia apresentou cor branca, com formação de tufo verde ao fim de cinco dias. Em MEA e CYA a colônia exibiu tufo na cor amarela e verde após cinco dias de crescimento. Nos meios BDA e CYA foi possível observar coloração com distribuição radial, formando anéis verde floresta, verde limão e branco em torno do cultivo central (FIG. 20 A e C).

**Figura 20** - Aspectos macroscópicos da linhagem *Trichoderma* sp. M164.

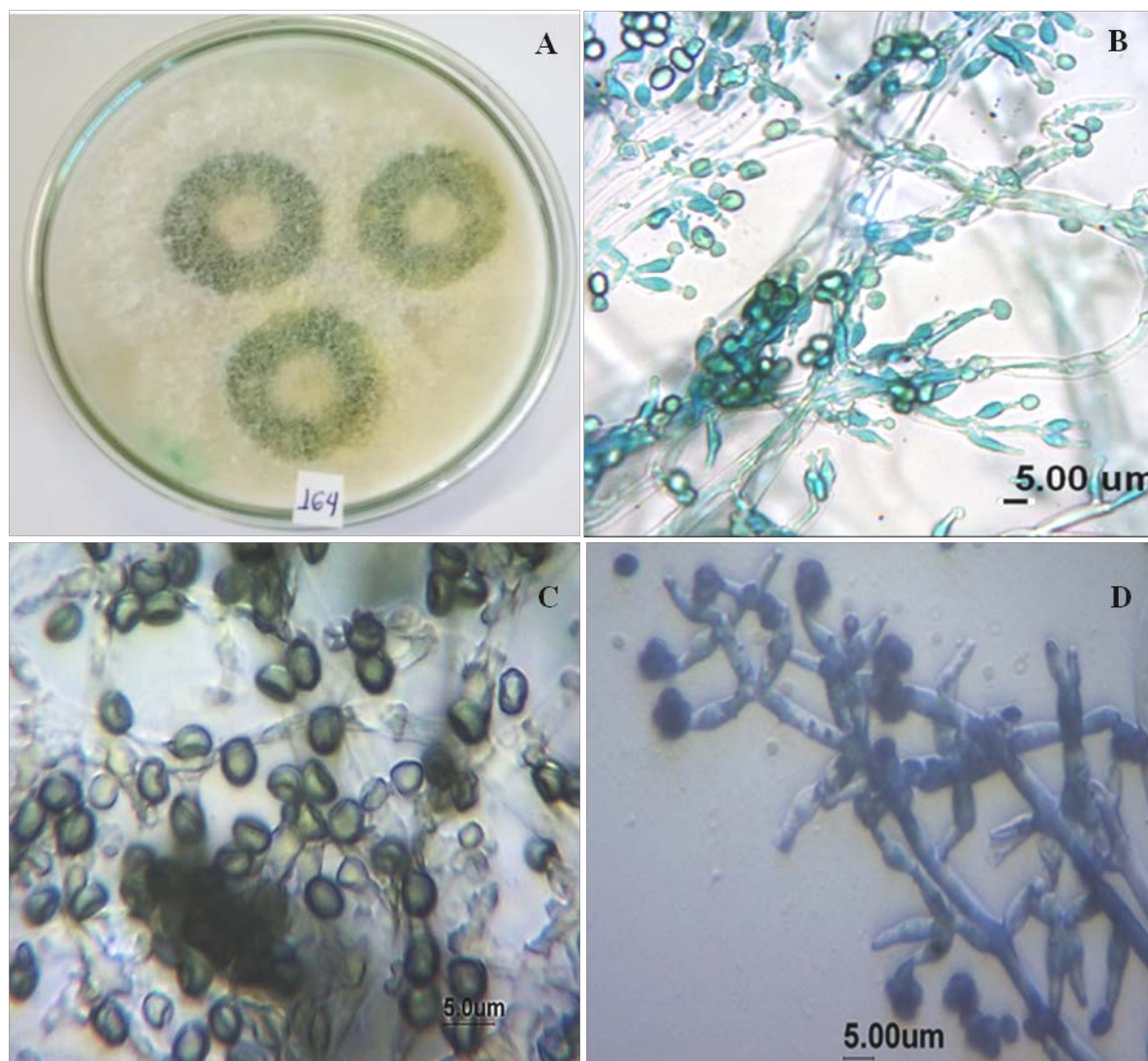


(A) meio BDA; (B) meio ágar Malte e (C) meio CYA. Colônias com cinco dias de crescimento na temperatura de 28°C.

Fonte: O autor

Nas características microscópicas da linhagem M164 foi observada a presença de conidióforos ramificados e verticilados, apresentando fiálides ampuliformes, com pequenos cachos terminais (FIG 21B e D) e conídios reniforme, de cor verde com paredes lisas (FIG. 21C).

**Figura 21** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Trichoderma* sp. M164, em meio ágar BDA.



(A) Aspecto macroscópico, (B) Conidióforos ramificados e verticilados, (C) Conídios unicelulares, lisos e ovoides, (D) Conidióforos e a formação de cabeças de conídios viscosas. Barra = 5 µm.

Fonte: O autor

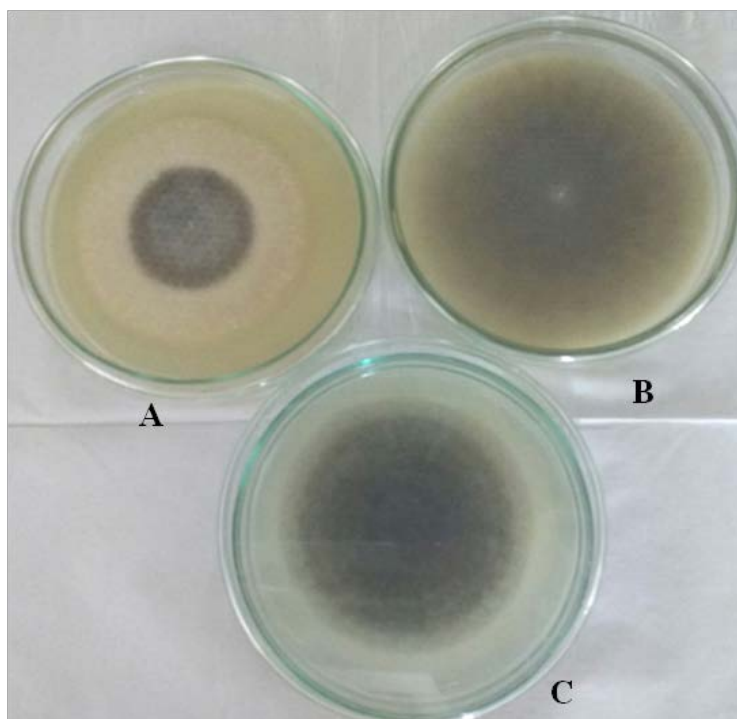
### 5.3.1.5. *Mucor* sp

A identificação do gênero *Mucor* foi realizada com base em observações macro e microscópicas apoiada na literatura científica (SILVEIRA, 1996; DISCHER E VOIGT, 2007; RICHARDSON, 2009; HOFFMANN, HOFFMANN, 2010; HERMET *et al.*, 2012;).

A partir do cultivo da linhagem M11, nos meios CYA, MEA e BDA foi observado rápido crescimento, atingindo 8,0 cm de diâmetro em 3 dias à 28°C. As colônias

apresentaram topografia plana, textura cotonosa no centro e pulverulento em direção a periferia. As colônias apresentaram micélio denso, na cor branca quando jovem (até 72 horas), transcendendo a cor branca à grafite, chegando a negra com a idade, após 120 horas (Figuras 22).

**Figura 22** - Aspectos macroscópicos da linhagem *Mucor* sp. M11

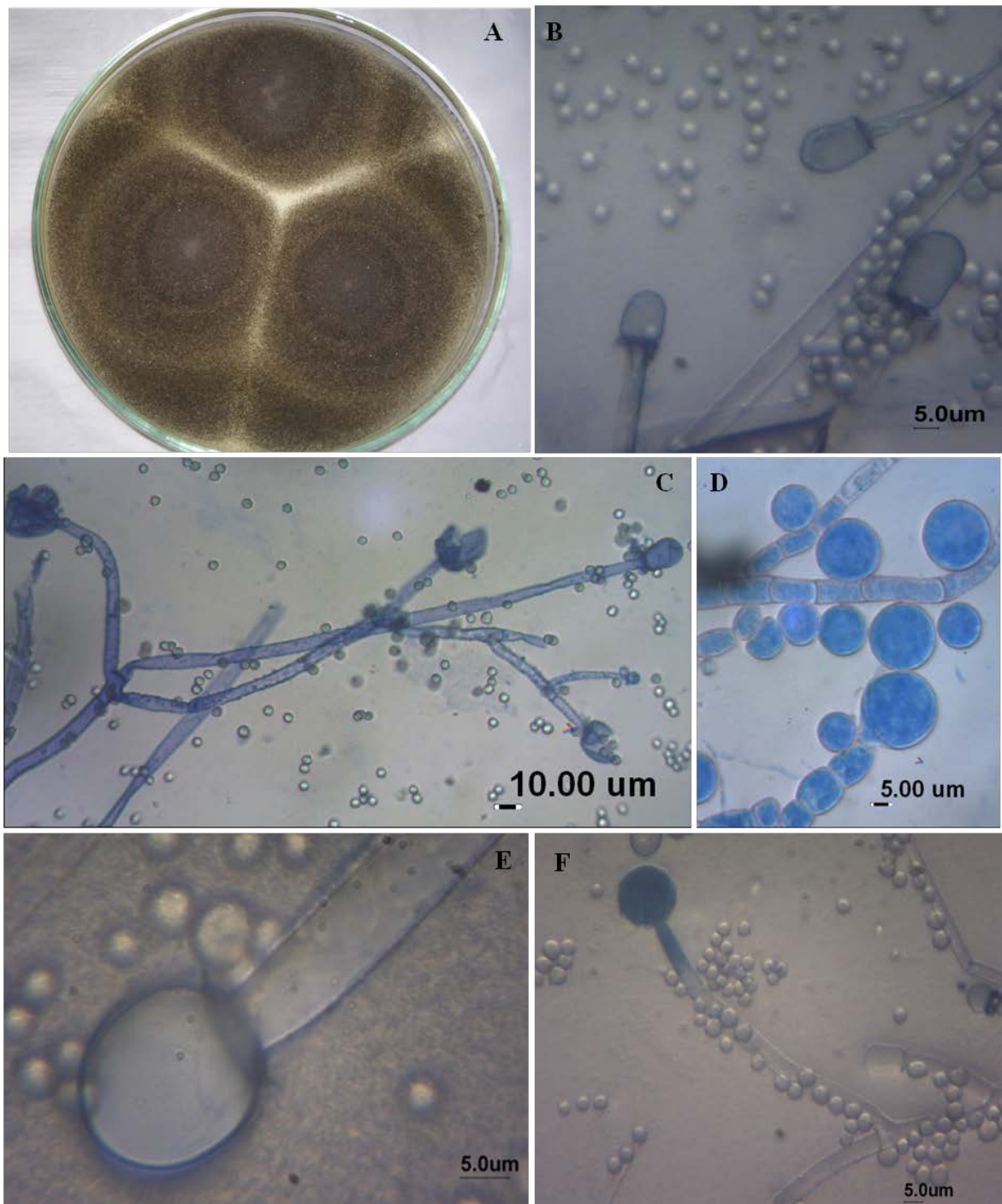


(A) Meio de cultivo MEA, (B) meio de cultivo CYA e (C) meio de cultivo BDA. Colônias com cinco dias de crescimento na temperatura de 28°C.

Fonte: O autor

Em relação ao aspecto microscópico da linhagem M11, cultivada nos meios BDA, CYA e MEA, foram observadas as características descritas a seguir: Ausência de rizoides e presença de artrosporo, esporangiosporos em esporângios sob esporangióforos. Os esporangiosporos são globosos hialinos com parede lisa, as hifas cenocíticas e hialinas com esporangióforos apresentando ramificações longas e curtas. A columela subglogosa apresentou colarete.

**Figura 23** - Aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Mucor* sp. M11, cultivada em meio BDA a 28°C com dois dias de crescimento.



(A) Aspecto macroscópico, (B) Columela obovoide com colarete, esporângios globosos e hifas hialinas cenotícas, (C) Esporangioforos com ramificações longas e curtas com esporângios em esporangioforos liberando esporangiosporos, (D) Clamidosporo, (E) Columela ovalada com colarete; (F) Esporangioforos com esporangio. Figuras 23C e F, aumento de 40x, as demais 100x. Barra = 5.0μm e 10 μm.

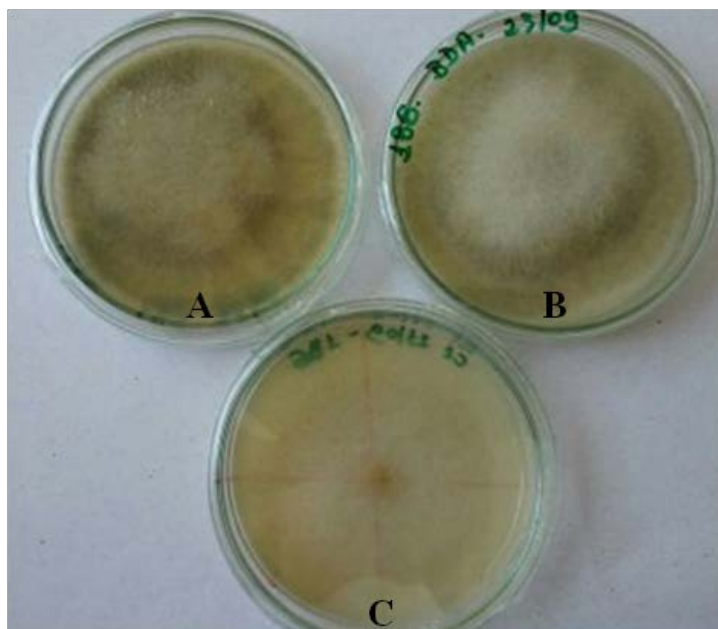
Fonte: O autor

### 5.3.1.6. *Absidia* sp.

A identificação do gênero *Absidia* foi realizada com base em observações macro e microscópicas apoiadas na literatura científica (SILVEIRA, 1996; HOFFAMAN; DISCHER; VOIGT, 2007; HOFFAMAN, 2010). A partir do cultivo da linhagem M186, nos meios CYA, MEA e BDA foi observado que a colônia atingiu 9,0 cm de diâmetro em dois dias (48 horas) de incubação a 28°C, indicando se tratar de uma cultura de rápido crescimento. As colônias apresentaram topografia elevada trapezoidal, textura algodonosa com numerosas hifas aéreas.

As colônias crescidas em BDA e MEA exibiram micélio denso, na cor branca transcendendo para amarelo até o segundo dia de crescimento, passando a cinza-escuro, após cinco dias de crescimento (FIG 24 A e B). A colônia crescida no meio CYA (FIG 24 C) também apresentou crescimento rápido, porém com micélio menos denso. Quanto à coloração, também apresentou cor amarela, todavia transcendendo para cinza-claro.

**Figura 24** - Aspectos macroscópicos do gênero *Absidia* sp. (M186)



(A) meio de cultivo MEA; (B) meio de cultivo BDA e (C) meio de cultivo CYA. Colônias com três dias de cultivo à temperatura de 28°C.

Fonte: O autor

Na microscopia da linhagem M186 foi possível visualizar, hifas hialinas e cenocíticas, com rizoides em estolão, que se apresentaram nas lâminas observadas, de forma rara. Foi

observado ainda, esporangióforos hialinos ramificados, columela piriforme, com apófise no final do esporângio e esporangiósporos globosos, hialinos e de paredes lisas.

**Figura 25** - Visualização macroscópica e microscópica do gênero *Absidia* sp., M186, cultivada em meio BDA com dois dias de crescimento.



(A) Aspecto macroscópico; (B) Esporângios em esporangióforos com liberação de esporângiosporos, esporangiósporos com septo logo abaixo da apófise e hifas hialinas cenocíticas em sua maioria, com rara presença de septos; (D) Esporangióforos em hifas hialinas; (E) Columela piriforme; (F) Hifas hialinas e cenocíticas, com rizoides em estolão em forma de arco; (G) Esporângios em esporangióforos liberando esporangiósporos. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Fonte: O autor.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou o isolamento de fungos filamentosos produtores de celulases e xilanases com ampla diversidade de classes e gêneros, originários de biomassas lignocelulósicas diversas.

Todos os fungos filamentosos isolados apresentaram atividade enzimática para pelo menos três das enzimas estudadas e mostraram ser melhores produtores de xilanases. Dentre estes, a linhagem *Absidia* sp. M186, isolada da casca da madeira de eucalipto, foi a que produziu o maior valor de atividade xilanolítica, 15.152,86 U L<sup>-1</sup>, em 144 horas de fermentação submersa. As linhagens de *Penicillium* sp. M124, *Acremonium* sp. M137 e *Trichoderma* sp. M162 se destacaram como melhor produtoras de enzimas celulolíticas na condição avaliada.

A maioria dos fungos filamentosos testados que apresentaram valores expressivos de atividade enzimática foi isolada da casca de eucalipto e da casca de acerola. Os valores de atividade enzimática obtidos são promissores se considerarmos que as condições de cultivo não foram otimizadas.





## 7 REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ, usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 11 p.57-70, 2000

AHMED S; RIAZ S; JAMIL A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Appl Microbiol Biotechnol**; v.84. n. 01, p. 19–35, 2009.

ALFTRÉN, J.; HOBLEY, T. J. ,Covalent immobilization of b-glucosidase on magnetic particles for lignocellulose hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Dinamarca, v. 169, n. 7 p. 2076–2087, 2013.

ALFTRÉN, J., OTTOW, K. E., & HOBLEY, T. J., In vivo biotinylation of recombinant beta-glucosidase enables simultaneous purification and immobilization on streptavidin coated magnetic particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Dinamarca, v. 94, p. 29–35, 2013.

ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; BISCHOFF, K. M.; FALKOSKI, D. L.; PEREIRA, O. L.; GONC, D. S.; Cellulases and hemicellulases from endophytic *Acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis, **Appl. Biochem. Biotechnol**, Viçosa, v. 165, p. 594-610, 2011

ARANTES, V. SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of a morphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, n.4, p.1-11, 2010.

BABA Y, SHIMONAKA A, KOGA J, KUBOTA H, KONO T. Alternative splicing produce two endoglucanases with one or two carbohydrate-binding modules in *Mucor circinelloides*. **J Bacteriol**, v. 187, p.3045–3051, 2005.

BAILEY, M. J., BIELY, P.; POUTANEN, K., Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol**. v.23, n.03 p. 257–270, 1992.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B. de; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, v. 11, n. 2, p. 15- 28, 2011.

BASSO, T.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C., Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição, **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 45, n.11, p. 1282-1289, 2010

BATTAGLIA E, BENOIT I, VAN DEN BRINK J, WIEBENGA A, COUTINHO PM, HENRISSAT B, *et al.* Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. **BMC Genomics**, v. 12, p.1471–2164, 2011.

BENNETT. J. E; DOLIN, R.; BLASER, M. J. Principles and Practice of Infectious Diseases. In: PETERSON T. F, *Aspergillus species*, Philadelphia: Elsevier, 2015, p. 2895-2908.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3,... 5.1 million species? **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BOZELL J.J.; PETERSEN G.R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates - **The US Department of Energy's "Top 10" revised. Green Chem**, v.12, p.539-554, 2010.

BROCK T. D.; MADIGAN, M.T; Brock: biology of microorganisms, 13 ed., **Boston Montréal Benjamin Cummings**, p.x, 2012.

BUSK P, LANGE L. Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders. **AMB Express**, v. 3, p. 47, 2013.

CASTELLANI, A., Further research on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathology Mycology Application**, v.20, n. 01 p. 1-2, 1963.

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

COUTURIER M, NAVARRO D, OLIVE C, CHEVRET D, HAON M, FAVEL A.. Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1471–2164, 2012.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S.; Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes, **Biomass and bioenergy**, São Paulo, v. 37, n. 03, p. 243-250

DELICHEVA, G.; DOBREV, G.; PISHTIYSKI, I. G., Performance of *Aspergillus Níger* B 03 xylosidase immobilized on polyamide membranes. **J Mol Catal B Enzym**, v. n 54, p. 109-115, 2008.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, p. 227-277, 2010.

DILLON, A. J. P. S.; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como Agentes Biotecnologicos. **In SAID**, Ribeirão Preto: Legis Summa, v. p.243-269, 2004.

DING S.Y., HIMMEL M.E., The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization, *J. Agric. Food Chem.* v. 54, p. 597–606, 2006

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**. USA, v. 01, n. 01, p. 2–17, 2009.

DWIARTI, L.; BOONCHIRD, C.; HARASHIMA, S.; PARK, E. Y., Simultaneous saccharification and fermentation of paper sludge without pretreatment using cellulose from *Acremonium cellulolyticus* and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 42, n. 0, p. 114-122, 2012.

FANG, X., YANO, S., INOUE, H., SAWAYAMA, S., Lactose Enhances Cellulase Production by the Filamentous Fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Journal of Bioscience and a Bioengineering**, v. 106, n. 2, p. 115-120, 2008.

FARINAS, C. S., A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação**, São Carlos, v. 54, 13p., 2011.

FASANELLA, C.C. A ação das enzimas ligocelulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em Bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. 2008. (Dissertação) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FAWZI E. M., Highly thermostable xylanase purified from *Rhizomucor miehei* NRL3169. **Acta Biol Hung**, v. 62, p. 84-94, 2011.

FILIPENSES. In: **BÍBLIA Sagrada**. 91. ed. São Paulo: Ave Maria, 1993.

GERFOR, Jr, Grupo de estudo para la formación y docência em enfermidades infecciosas y microbiologia clínica. Disponível em [www.gerfor.4t.com/hongos](http://www.gerfor.4t.com/hongos) Acesso em: 06 de Dez. 2015.

GEISER, D.M., Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. **Mycologia**, Lawrence, v. 98, n. 6, p. 1053-1064, 2006.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GHOSH B, RAY RR. Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: a review. **J Applied Sci**, v. 11, p. 2470-2486, 2011.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775- 4800, 2010.

GOLDBECK R., GONÇALO, M. M., PEREIRA, G. A.G.FILHO, F. M., Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates, **Bioresource Technology**, v 128, p. 797-803, 2013

GOMES, C. C.; PINTO, L. C. C.; VICTOR, F. L.; BORGES, E. A.; RIBEIRO, A. A.; SARQUIS, M. I. M; CAMÕES, I. C. G.; *Aspergillus* in endodontic infection near the maxillary sinus, **Braz J Otorhinolaryngol**. 2015.

GOMES. E; ANDRÉS, M; Guez U.; MARTIN, N.; e SILVA. R.; Enzimas Termopstáveis: Fontes, Produção e Aplicação Industrial, **Química Nova**, V. 30, N. 1, 136-145, 2007.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E.P.S.; Cellulases, xylanases, glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugar cane bagasse, **Biochemical Engineering Journal**, v.51, n1-2, p. 72-78, 2010.

GRÄFENHAM, T.; SCHROERS, H.J; NIRENBERG, H.I; SEIFERT, K.A, Na overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella* and *Volutella*, **Studies in Mycology**, v. 68, n. 68, p. 79-113, 2011.

GUARRO, J., Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the USA and their antifungal susceptibility profiles. **Journal Clinical Microbiology**, v. 50, p. 4061- 4066, 2012.

GUIMARAES, N. C.A.; CARVALHO, M. S.; NOGUEIRA, S. P. N., BETINI, J. H. A., ZANOELO, F. F, MARQUES, M.R.,POLIZELI, M. L. T. M; GIANNESI, G., Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp bio bleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **Springer Plus**, Campo Grande-MS, v. 2, n. 10 p. 380, 2013.

GUSAKOV, A. V., Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends Biotechnology**. V. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

HANSEN, G. H., LUBECK, M., FRISVAD, J. C., LUBECK, P. S., ANDERSEN, B.; Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation, **Process Biochemistry**, v.50, n. 09, p. 1327–1341, 2015.

HARCHAND, R.K.; SINGH, S..Catabolite repression of celulase biosynthesis in *Streptomyces albaduncus*. **Journal Basic. Microbiology**, v. 34, n.6, p.371-378, 1994.

HARCHAND, R.K.; SINGH, S..Characterization of cellulase complex of *Streptomyces albaduncus*. **J. Basic. Microbiol.**, v. 37. N. 02, p.93-103, 1997.

HARROW S. A.; FARROKHI-NEJAD, R.; PITMAN, A. R.; SCOTT, I. A. W.; BENTLEY, A.; HIDE, C.; CROMEY, M. G. Characterisation of New Zealand *Fusarium* population using a polyphasic approach differentiates the *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* species complex in cereal and grassland systems, **fungus biology**, v. 114, n.04, p. 293–311, 2010.

HERCULANO, P. N.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S.; NEVES, R. P.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. F. Isolation of Cellulolytic Fungi from Waste 57 of Castor (*Ricinus communis* L.). **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1416-1422, Mai 2011.

HERMANN, V. E.; GAUTHERON, N.; MOUNIER, A.; STEINBERG, C., *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach, **Journal of Microbiological methods**, v. 111, p. 64-71, 2015.

HERMET, A; M\_EHEUST, D.; MOUNIER, J.; BARBIER, J.; JANY, Jean-Luc Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese., **Fungal Biology**, v. 116, n. 06, p. 692-705, 2012.

HOFFMANN, K., Identification of the genus *Absidia* (Mucolales, Zygomycetes): A comprehensive taxonomic revision. Molecular Identification of Fungi. **Springer Verlag Berlin Heidelberg. New York**, V. 09, n. 02. p. 439-460, 2010

HOFFMANN, K; DISCHER, S.; VOIGTS, K.; Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, Mycocladiaceae fam. nov., **mycological research**, v. 111, n. 11, p. 1169-1183, 2007.

HUANG, Y.; BUSK, P.K.; LANGE, L.; Cellulose and hemicellulose-degrading enzymes in *Fusarium commune* transcriptome and functional characterization of three identified xylanases. **Enzyme and Microbial technology**, v. p. 73-79, 2015.

IBARRA, D.; KÖPCKE, V.; Ek, M. Behavior of different monocomponent endoglucanases on the accessibility and reactivity of dissolving-grade pulps for viscose process. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 7, p. 355–362, 2010.

JAKLITSCH, W. M; VOGLMAYR, H., Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia, **Studies in Mycology**, v. 80, n. 01, p.1–87, 2014.

JAVED, M. R., RASHID, M. H., MUKHTAR, Z., RIAZ, M., NADEEM, H., HUMA, T., Kinetics and thermodynamics of high level b-glucosidase production by mutant derivative of *Aspergillus niger* under submerged growth conditions, **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 2528-2538, 2011.

JAVED, M.R.; BUTHE, A.; RASHID, M.H.; WANG, P., Cost-efficient entrapment of  $\beta$ -glucosidase in nanoscale latex and silicone polymeric thin films for use as stable biocatalysts, **Food Chemistry**, v.190, p. 1078–1085, 2016.

JUHA'SZ, T.; SZENGYEL, Z.; RE'CZEY, SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produce by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, Londres, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

JUNG, Y.R.; PARK, J. M.; HEO, S.Y.; HONG, W.K.; LEE, S. M.; OH, B.R.; PARK, S.M.; SEO, J.W.;KIM, C.H., Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production, **Renewable Energy**, v. 76, p. 66 e 71, 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C, Microbial Exo-xylanases: A Mini Review, **Appl Biochem Biotechnol**, v.174, n. 01, p.81–92, 2014a.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulase: Engineering, production and industrial applications. **Renew and Sustainable Energy Reviews**, v.33, n. 63, p. 188-203, 2014b.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.30, n. 06, p. 1219-1227, 2012.

KHANDPARKER, R.; NUMAN, M.T. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35. n. p.635-644 2008

KHELIL, O.; CHEBA, B.; Thermophilic cellulolytic microorganisms from western Algerian sources: promising isolates for cellulosic biomass recycling. **Procedia Technology**., v. 12, p. 519-528, 2014.

KISHISHITA, S.; YOSHIMI, M.; FUJII, T.; TAYLOR, L. E.; DECKER, S. R.; ISHIKAWA, M.; INOUE, H., Cellulose-inducible xylanase Xyl10A from *Acremonium cellulolyticus*: Purification, cloning and homologous expression. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 1, p. 40-45, 2014.

KIYUNA, T.; DEUK, K.; KIGAWA, R.; SANO, C.; MIURA, S.; SUGIYAMA, J., Molecular assessment off fungi in “black spots” that deface murals in the Takamatsuzuka and kitora Tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp. nov. and *Acremonium felinum* comb. nov., **Mycoscience**, Japão, v.52, n. 06, p. 1–17, 2011.

KLUEPFEL, D.; SHARECK, F.; MONDAU, F.; MOROSOLI, R. (1986).Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyceslividans*. **Microbiol. Biotechnol Appl.**, v. 24, n. 01, p.230-234.

KNOB A.; TERRASAN C.; CARMONA E.,  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: na overview. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 389-407, 2010.

KURTZMAN, C. P.; FELL. J. W.; BOEKHOUT, T. The Yeast, a Taxonomic study **Elsevier Science Publieshers**, ed. Amsterdam, v. 2, n. 05, 1062p., 2011.

LARA, C. A.; SANTOS, R.O; CADETE, R.M; FERREIRA, C.; MARQUES, S.; GIRIO, F.; OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; FONSECA, C. Identification and characterization of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 06, p. 1107-1119, 2014

LARSEN, J.; PETERSEN, M. O.; THIRUP, L.; LI, H. W.; IVERSEN, F. K. The IBUS Process: Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. **Chemical Engineering &Technology**, Weinhein, v. 31, n. 5, p.765–772, 2008.

LEE, S.; YAMAMOTO N.; Accuracy of the high-throughput amplicon sequencing to identify species within the genus *Aspergillus*, **Fungal Biology**, v.119, n. 12, p. 1311-1321, 2015.

LEHNINGER, A. L. Lehninger princípios de bioquímica. Tradução de Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. In: **Enzimas**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. Cap. 6, p. 190-235.

LESLIE, J. F; SUMMERELL, B. A., The *Fusarium* Laboraory Manual, **Blackwell Publishing**, ed. 1, p. 15-42, 2006.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J; ZYL, W H; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.Microbiology And Molecular. **Biology Reviews**, v. 66, p. 506–577, 2002.



MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I., *Trichoderma* No Brasil: O fungo e o Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 26, p. 274-288, 2012.

MAHMOOD, R. T; ASAD, M. J.; MENHBOOB, N.; MUSHTAQ, M.; GULFRAZ, M.; ASGHER M.; MINHAS, N. M.; HADRI, S. H. Production, Purification, and Characterization of Exoglucanase by *Aspergillus fumigatus*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n.4 pp 895 a 908, 2013.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of na endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 3, p. 219-224, 1987.

MARTINS, L.F.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P., Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MENEZES, G.D.G. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna. 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006

MICHELIN, M.; POLIZELI, M.L.T.M.; RUZENE, D.S.; SILVA, D.P.; VICENTE, A.A.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F. & TEIXEIRA, J.A. 2008. A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. In: Ferreira, E.C. & Mota, M. (eds.) **Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference – CHEMPOR, 2008**. Braga, Portugal, p.9.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chemical.**, v. 31, n. 03, p. 426-428, 1959.

OLIVEIRA, G. S. Expressão Heteróloga do Gene de Celobiohidrolase (cbh1.2) do Fungo *Humicola grisea* var *thermoidea* em *Pichia pastoris*. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2007.

ONIUNIS, A. H. S.; BRADY, B. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: LPEBERDY, J.F. **Penicillium and Acremonium**, New York, Biotechnology Handbooks .v.1, 1987. 297p.

PAËS, G; BERRIN, J. G; BEAUGRAND, J, GH11 xylanases: structure / function/ properties relationships and applications, **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 03, p. 564-592, 2012.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M. Biotechnological potential of the fungal CTG clade species in the synthetic biology. **Biomolecules et Biotechnologies Vegetales, France**, v.32, n. 4, p. 167-168, 2013.

PANDEY, A.; WEBVB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology Ind., ed. New Delhi: asiotech Publishers. 760p, 2005.

PIROTA, R. D. P. B.; MIOTTOL, L. S.; DELABONA, L. P. S.; FARINA, C. S.. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Brasilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 117-123, 2013.

POLIZELI, M. L.; RIZZATTI A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. Review: Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v.67, p. 577-591, 2005.

PRADO, H. F.A.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA. V. M; SETTE, L.; SILVA, R., Screening and production study of microbial xylanase producers from brazilian cerrado, **Appl Biochem Biotechnol**, São Carlos, v. 161, n. 01, p. 333-346, 2010.

RAMOS, L. P, The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**, V. 26, N. 6, p. 863-871, 2003.

RICHARDSON, M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. **Clinical Microbiology and Infection**, Manchester, v. 15, n. 05, p. 2-9, 2009.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycology**, v.42, n. 2, p. 265-270, 1950.

ROPARS, J.; CRUAUD, C.; LACOSTE, S.; DUPONT, J., A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 03, p. 199-210, 2012.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, v. 32, p. 117-156, 2009.

SAHA B C., Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**; v. 39, p. 1871–1976, 2004.

SAHA, B. C. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to etanol. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3693-3700, 2005.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; Phylogenetic and taxonomic studies on the genera *Penicillium* and *Talaromyces* **Studies in Mycology**, v. 70, n. 1, p.1-51, 2011

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C., Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35 n. 5, p. 56-62, 2012.

SCHREMPF, H.; WALTER, S. The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n.6, p. 353-355, 1995.

SECOR, G. A.; VARAS, V. R.; CHRIST, D. S; MATHEW, F. M; KHAN, M. F. R.; VARRELMANN, M.; BOLTTON, M. D. Characterization of *Fusarium secorum*, a new species causing *Fusarium yellowing* decline of sugar beet in north central USA, **Fungal Biology**, v. 118, n. 9. p. 764-775, 2014.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P. RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a 20°C. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SILVA, V. F. N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. 2009. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2009.

SILVEIRA, D.S, **Micologia**, 5 ed, Rio de Janeiro, Ambito Cultural, 1995, p: 336

SIMÕES, M. L. G.; TAU-K-TORNISIELO, S. M., Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. *Holos Environment*, v.5, n.2, p.94-103, 2005.

SINDHU, R., BINOD, P.; PANDEY, A., Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – an overview. **Bioresource Technology**, India, v. 199, p.76–82, 2016.

SINGHANIA R. R; SUKUMARAN, R. K; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A., Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SIQUEIRA, F. G.; SIQUEIRA, E. G.; JARAMILLO, P. M.; D.; SILVEIRA, M. H. L.; ADREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FILHO, E. X. F., The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 11, p. 20-26, 2010.

SOARES Jr, F. L.; DIAS, A. C. F.; FASANELLA C.; TAKETANI R. G.; LIMA, A.O.S.; MELO, I. S.; ANDREOTE, F. D., Endo - and exoglucanase activities in bacteria from angrove sediment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 969-976, 2013.

STAJICH, J. E.; BERBEE, M.L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T.Y.; SPATAFORA, J.W; TAYLOR, J. W, Primer - The Fungi, **Curr Biol.**, EUA, v. 29; p. 19-18, 2009.

STEINBERG, G.; SCHUSTER, M.; The dynamic fungal cell. **Fungal Biology Reviews** v. 25, n. 18, p. 14 e 37, 2011.

SUMMERBELL, R.C GUEIDAN C; SCHROERS, H.J.; DE HOOG G.S. 3. STARINK; M.; ROSETE, Y. A.; GARRO, J. SCOTT J.A. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, EUA, v. 68, n. 10. p. 139–162, 2011.

TAKO M, TOTH ALGN, KRISCH J, VAGVOLGYI C, PAPP T. A new beta-glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 97, n. 01, p.1–10, 2010.

THORN, R. G.; MICHAEL, D. J.; LYNCH. Fungi and Eukaryotic Algae. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**, 3 ed, v. 11. p. 145-163, 2007

TIWARI, R., NAIN, P. S., SINGH, S., ADAK, A., SARITHA, M., RANA, S., SHARMA, NAIN, L, Cold active holocellulase cocktail from *Aspergillus niger* SH3: process optimization for production and biomass hydrolysis, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 56, p.57-66, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, p.964.

VAN DYK J. S.; PLETSCHKE B.I., A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**; v. 30, n. 01, p. 1458–1480, 2012.

VIIKARI, L.; VEHMAANPERA, J.; KOIVULA, A., Lignocellulosic ethanol: From science to industry, **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 13-24, 2012.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A.; Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, **Studies in Mycology**, v. 78; p.343–371, 2014.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2005, p. 1-34.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, Oxford, v. 52, p. 305-317, 1988.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities, **Methods Enzymology Journal**, v. 160, p. 87-112, 1988.

YABUKI, T.; MIYAZAKI, K.; OKUDA, T. Japanese species of the Longibrachiatum Clade of Trichoderma. **Mycoscience**, v. 55, n. 3, p. 196-212, 2014.

YANG B, LU, Y.; GREGG, D.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D.; Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnol.** v. 98, n. 1, p. 641, 2002.

ZHANG Y.H.P., DING S.Y., MIELENZ J.R., CUI J.B., ELANDER R.T., LASER M., HIMME, M.E., MCMILLAN J.R., LYND L.R., Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions, **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 97. p. 214-223, 2007.

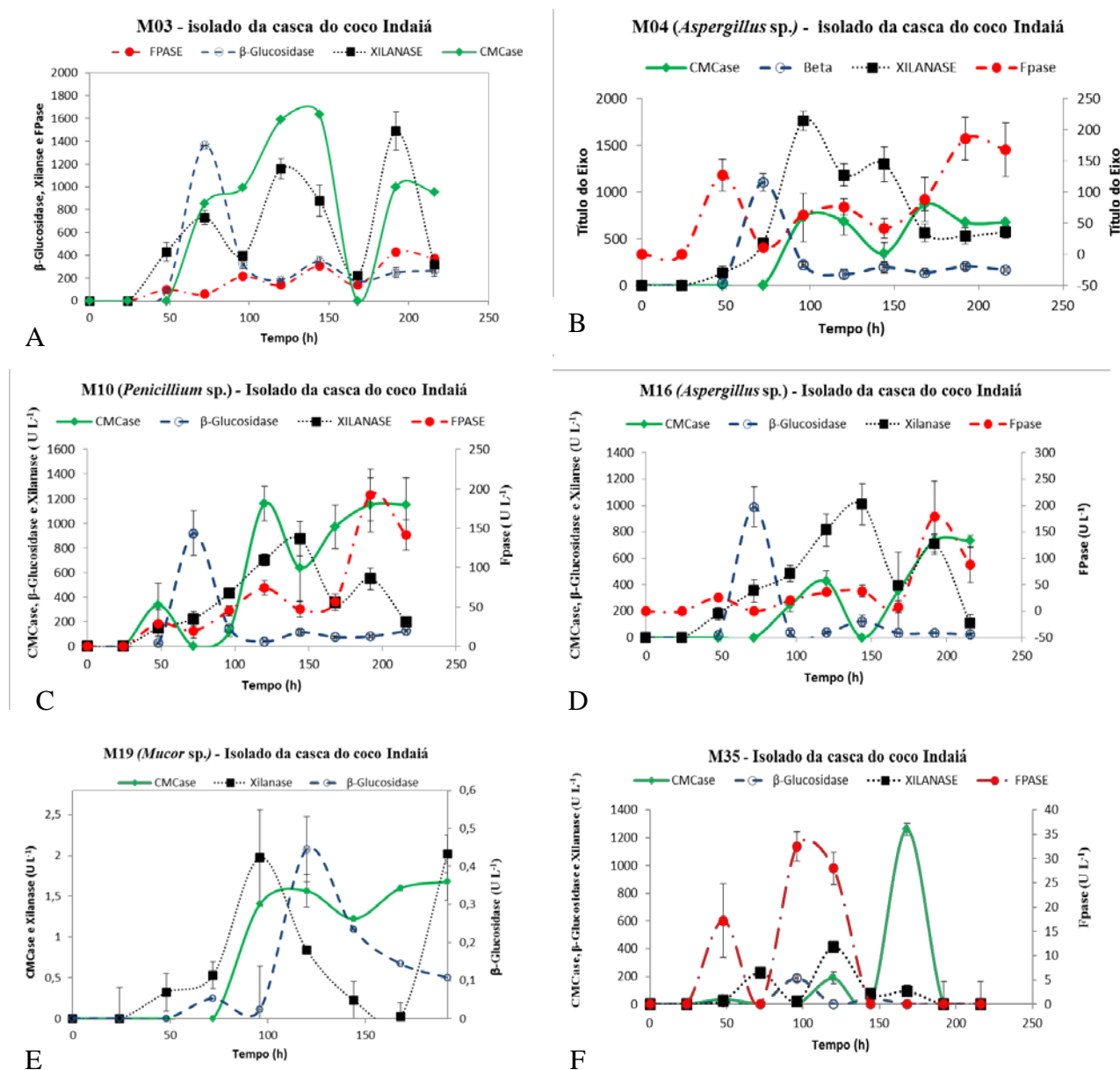
ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 88, n. 07, p. 797-824, 2004.

ZHU, Z. X; ZHUANG, W. Y, *Trichoderma (Hypocrea)* species with green ascospores from China. **Persoonia**, v. 34, p. 113-129, 2015.

## ANEXO A

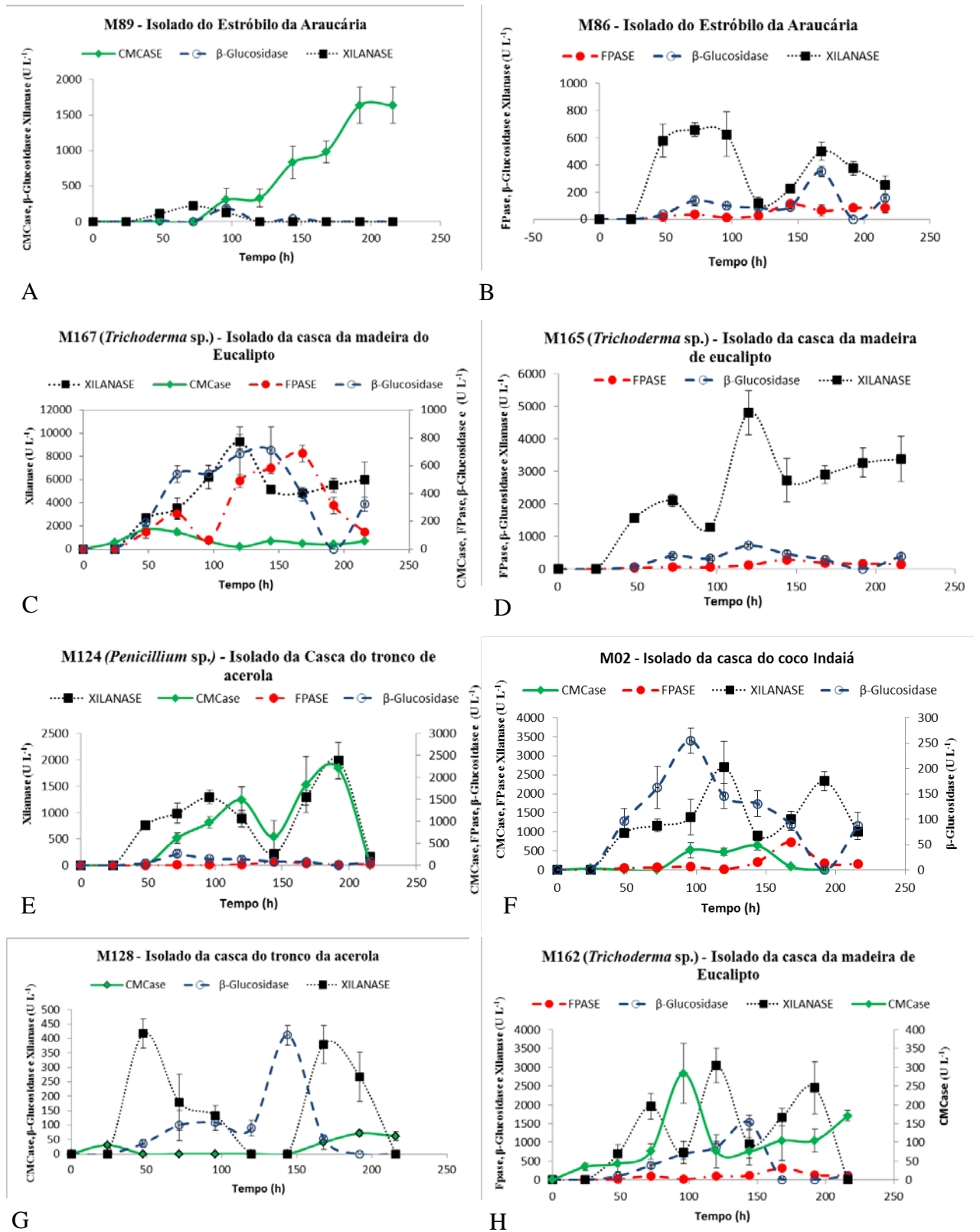
CURVAS DE PROGRESSO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA PARA AS ATIVIDADES CMCASE, FPASE, B-GLUCOSIDASE E XILANASE.

Figura 26 – Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas



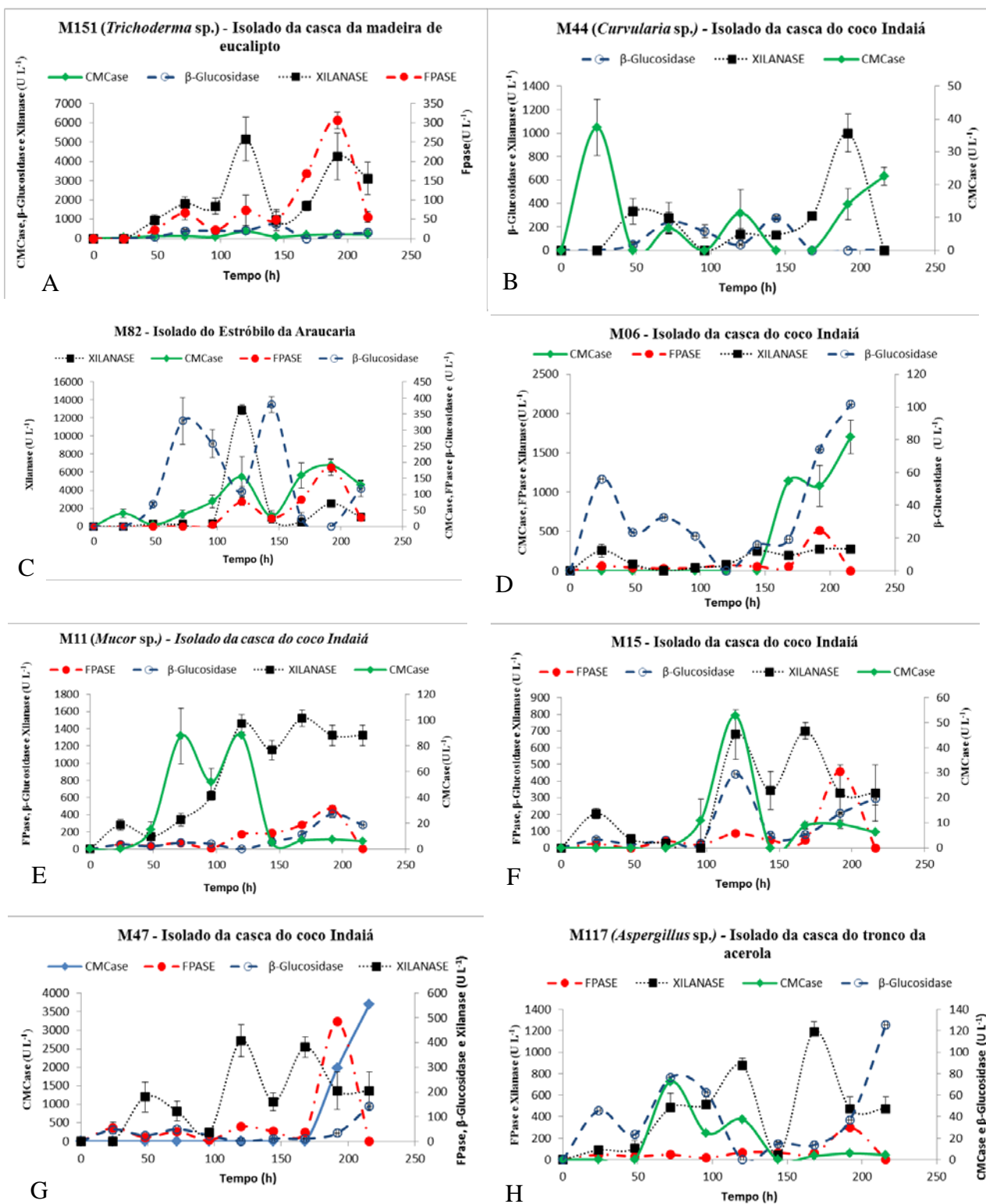
(A) M03; (B) *Penicillium* sp. M10; (C) *Aspergillus* sp. M16 ; (D) *Mucor* sp. M19; (E) M35;

**Figura 27** – Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas



(A)M89; (B) M86; (C) *Trichoderma* sp.M167; (D) *Trichoderma* sp.M165; (E) *Penicillium* sp. M124; (F)*Trichoderma* sp.M02; (G)M128; (H) *Trichoderma* sp.M162

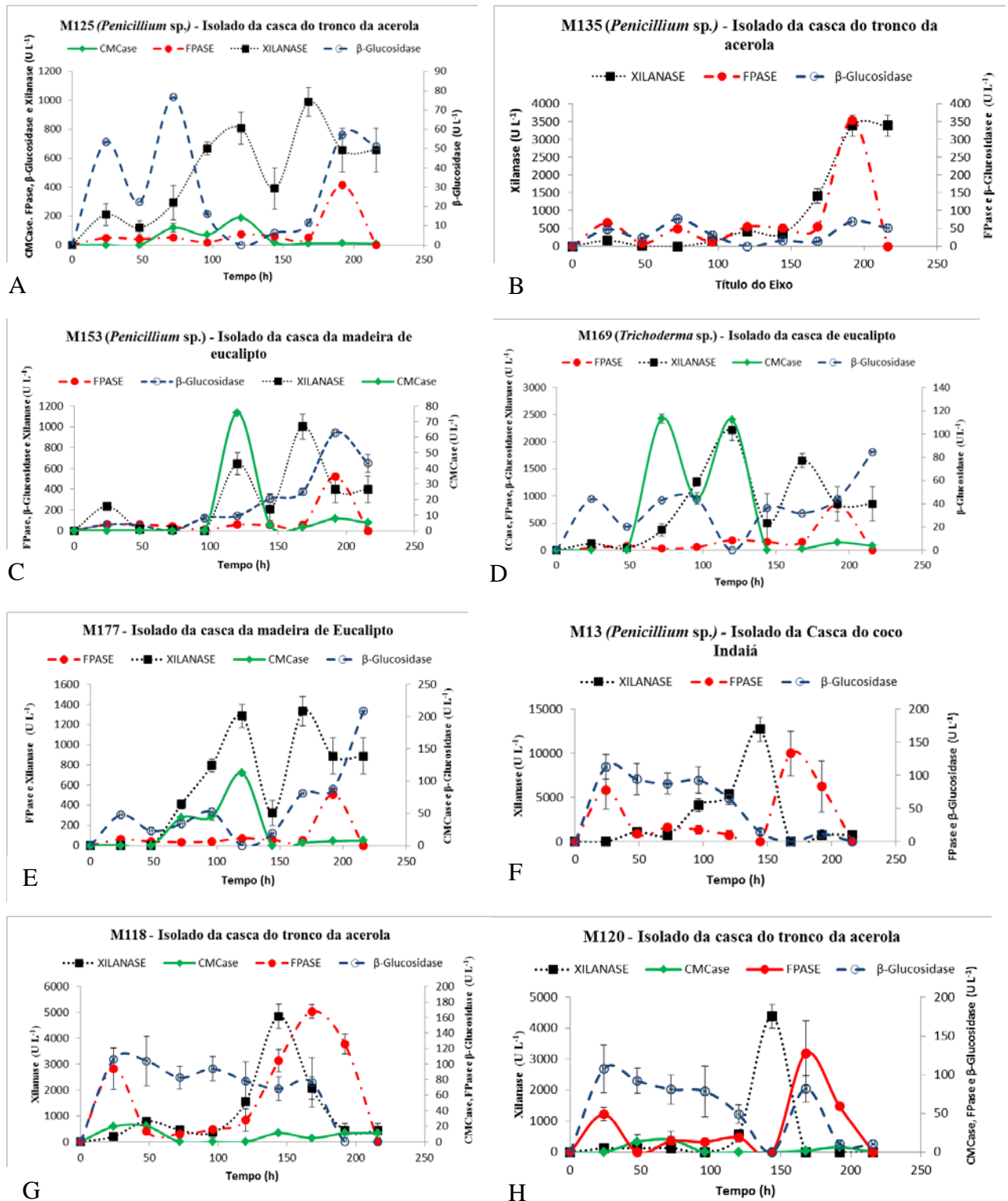
**Figura 28** – Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas



(A) *Trichoderma* sp. M151; *Curvularia* sp. M44; M82; M06; *Mucor* sp. M11; M15; M47; *Penicillium* sp. M117.

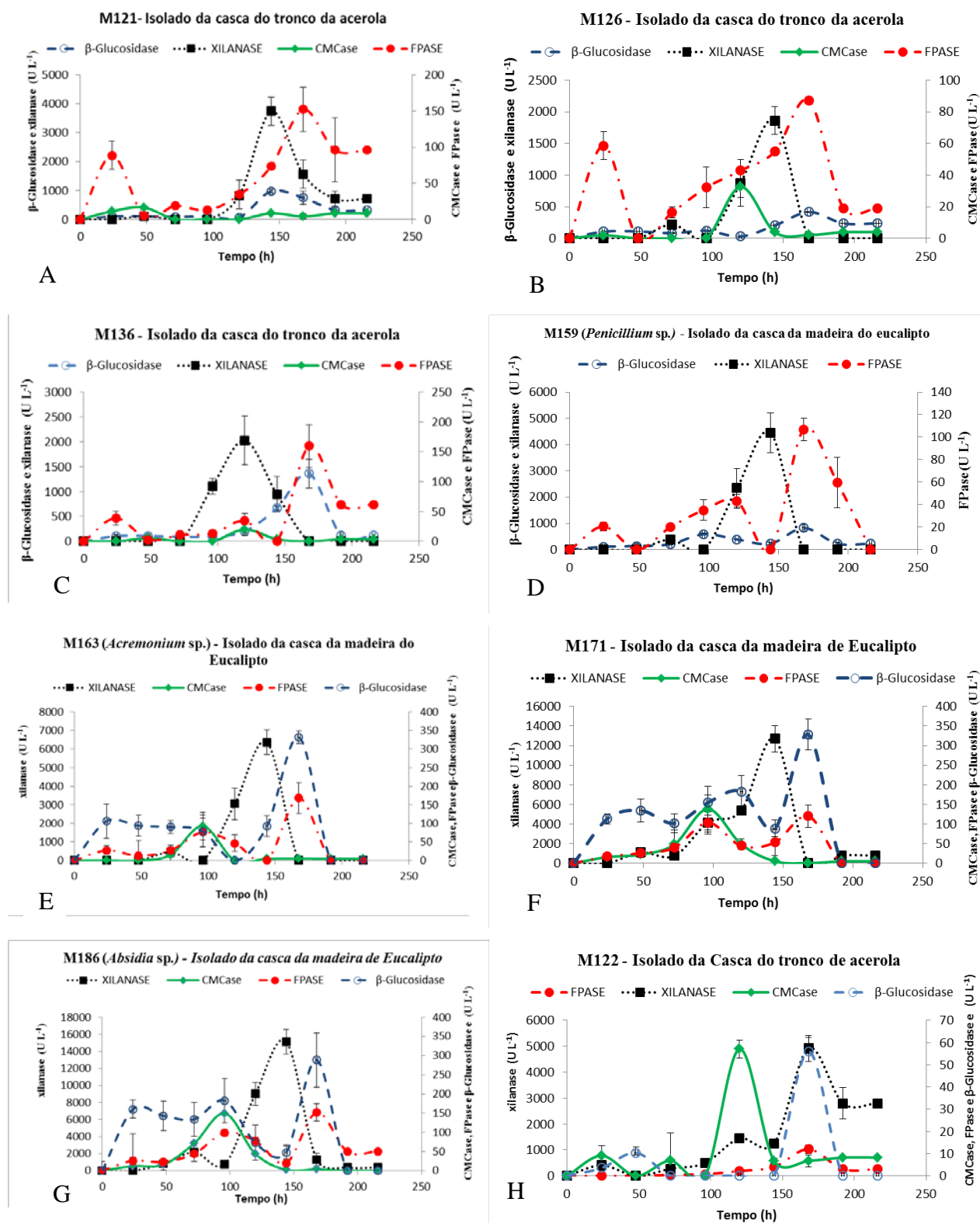


**Figura 29** – Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas



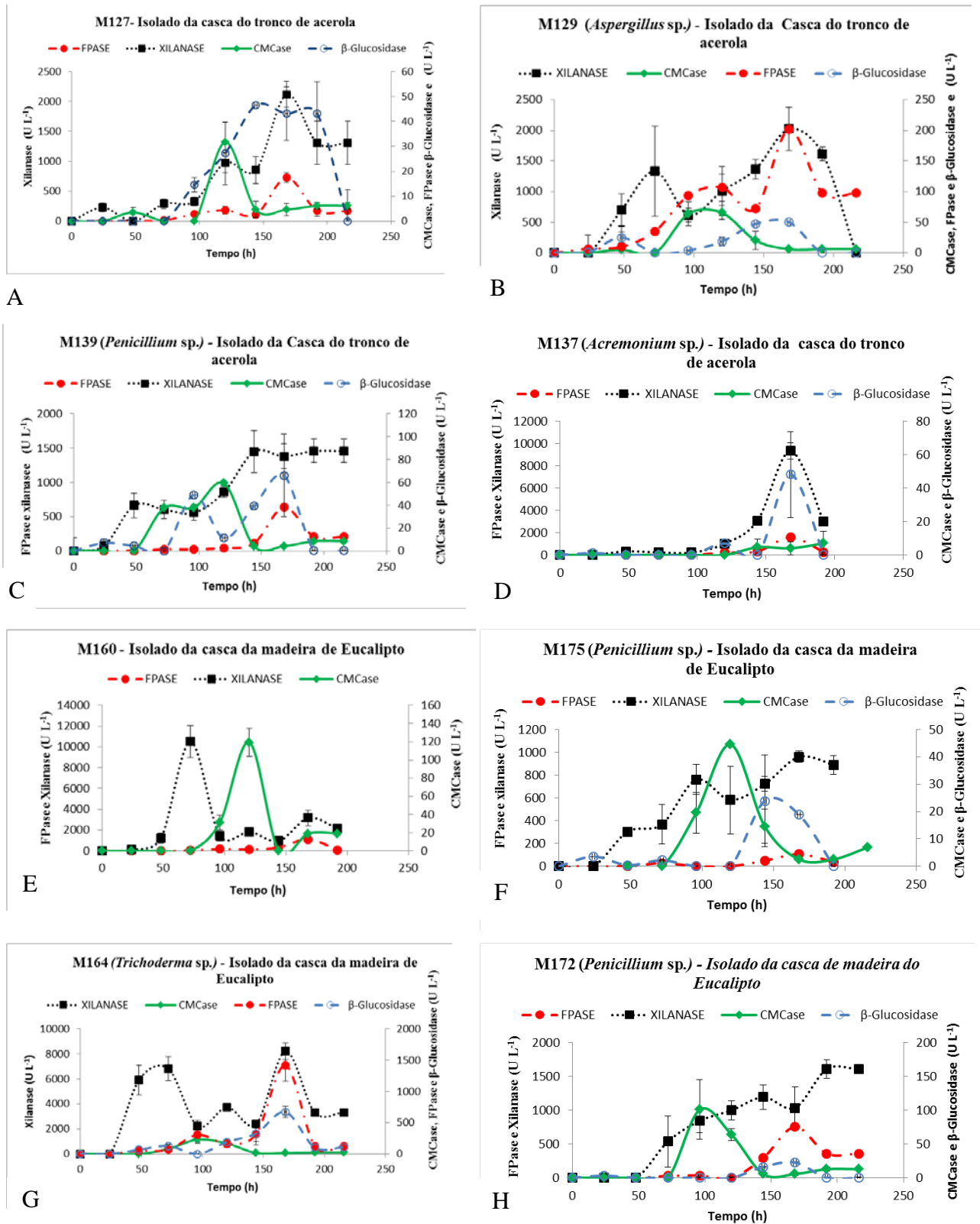
(A) *Penicillium* sp. M125; (B) *Penicillium* sp. M135; (C) *Penicillium* sp. M153; (D) *Trichoderma* sp. M169; (E) M177; (F) M13; (G) M118 e (H) M120

**Figura 30** – Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas



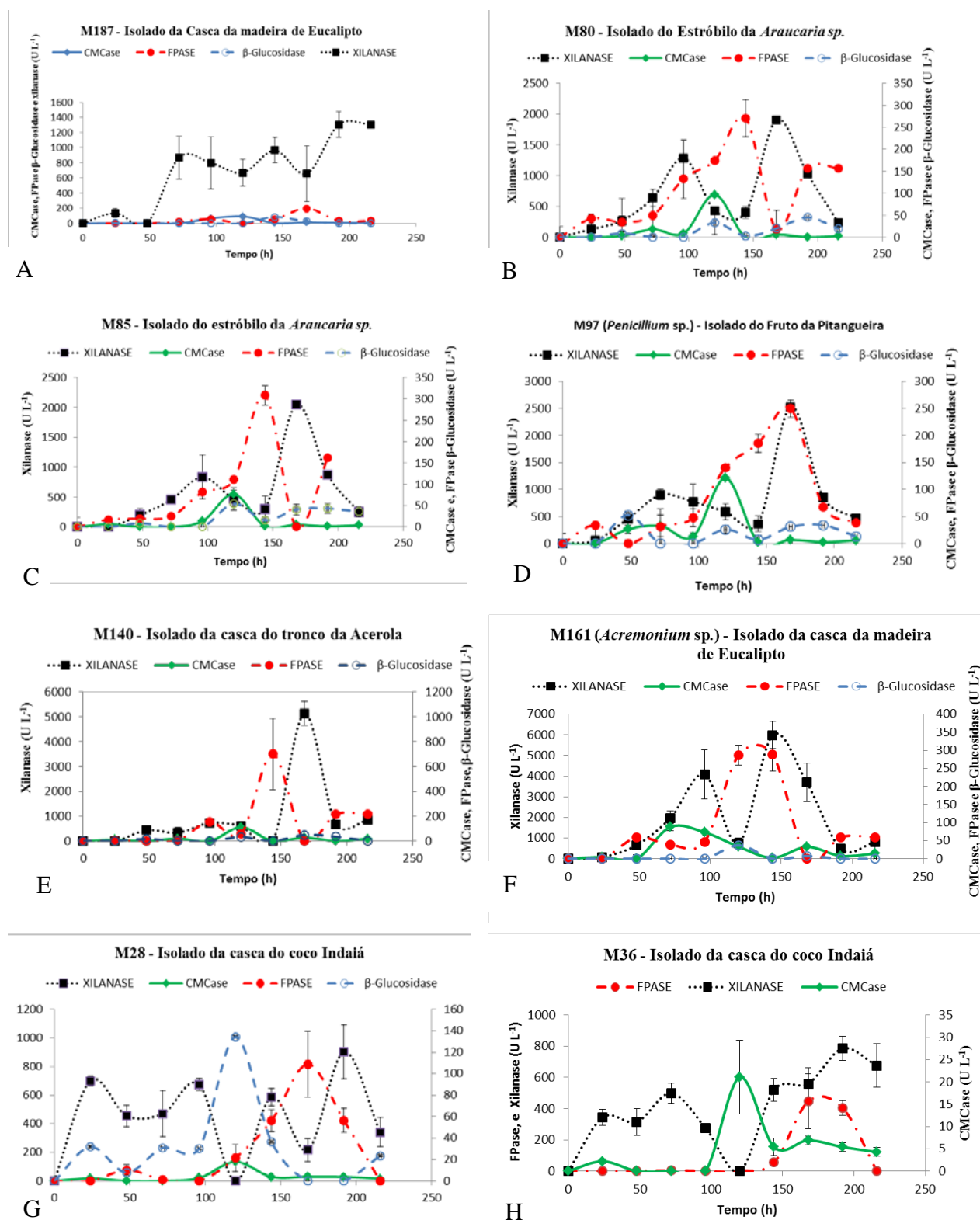
(A) M121; (B) M126; (C) *Absidia* sp. M136; *Penicillium* sp. M159; *Acremonium* sp. M163; M171; *Absidia* sp. M186; M122

**Figura 31** – Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas



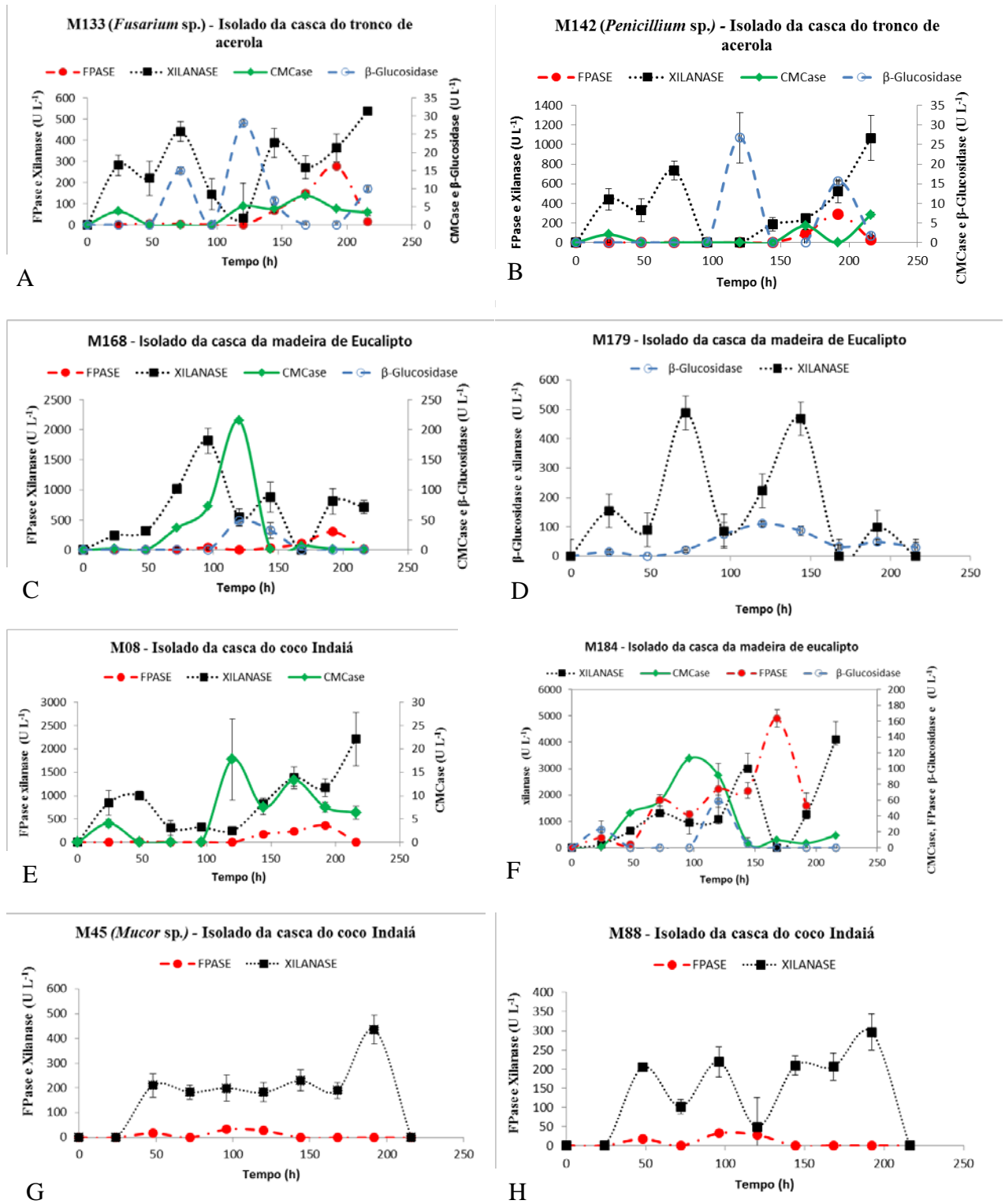
(A) 127; (B) *Aspergillus* sp. M129; (C) *Penicillium* sp. M139; (D) *Acremonium* sp. M137; (E) M160; (F) *Penicillium* sp. M175; (G) *Trichoderma* sp. M164 e (H) *Penicillium* sp. M172.

**Figura 32** – Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas



(A) M187; (B) M80; (C) M85; (D) *Penicillium* sp. M97; (E) M140; (F) *Acremonium* sp. M161; (G) M128 e (H) M36.

**Figura 33** – Perfil de atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de biomassa lignocelulósicas

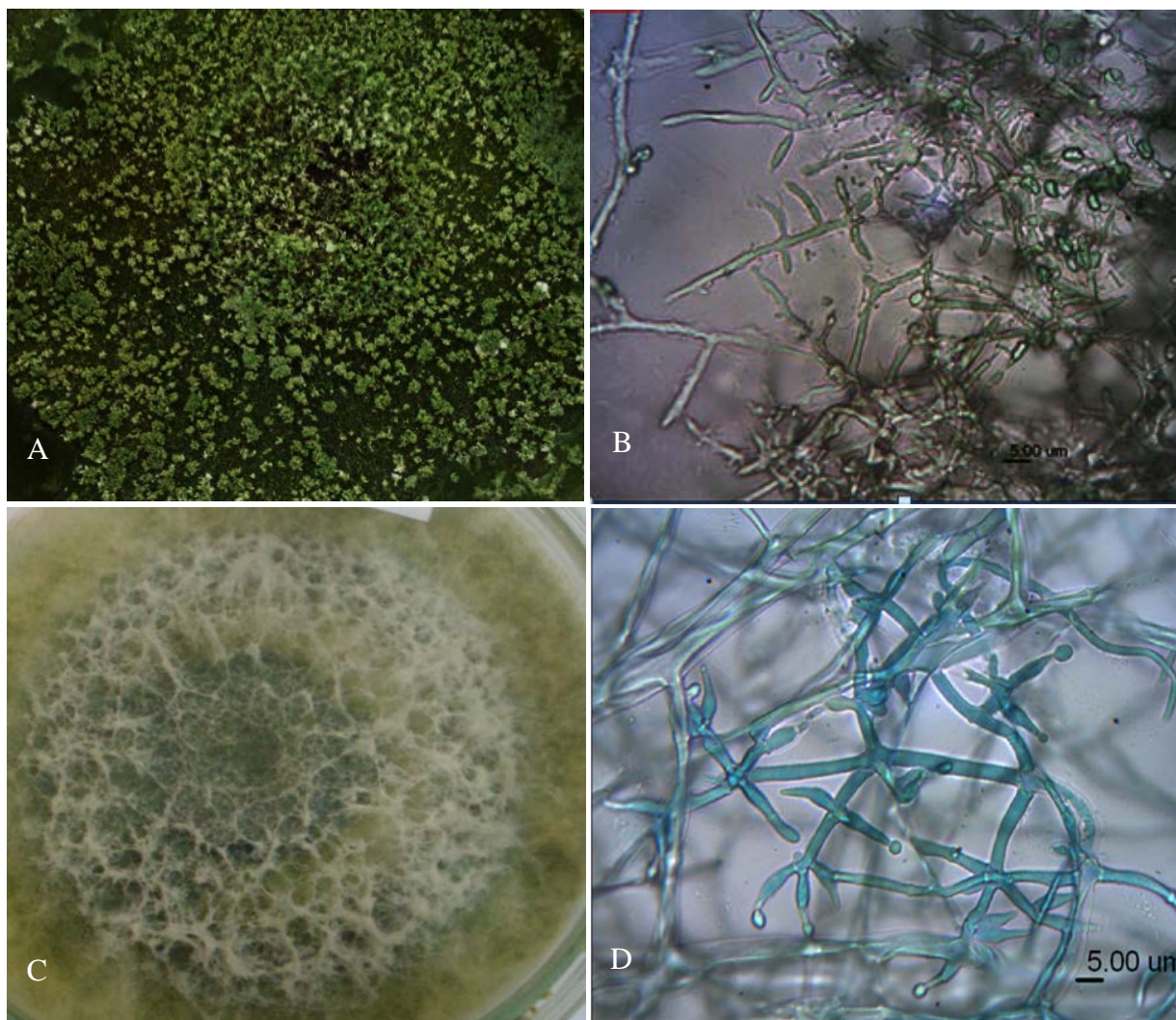


(A) *Fusarium* sp. M133; (B) *Penicillium* sp. M142; (C) M168; (D) M179; (E) M08, (F) M184, (G) *Mucor* sp. M45; (H) M88

## ANEXO B

IMAGENS MACRO E MICROSCÓPICAS DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS E IDENTIFICADO EM NÍVEL DE GÊNERO

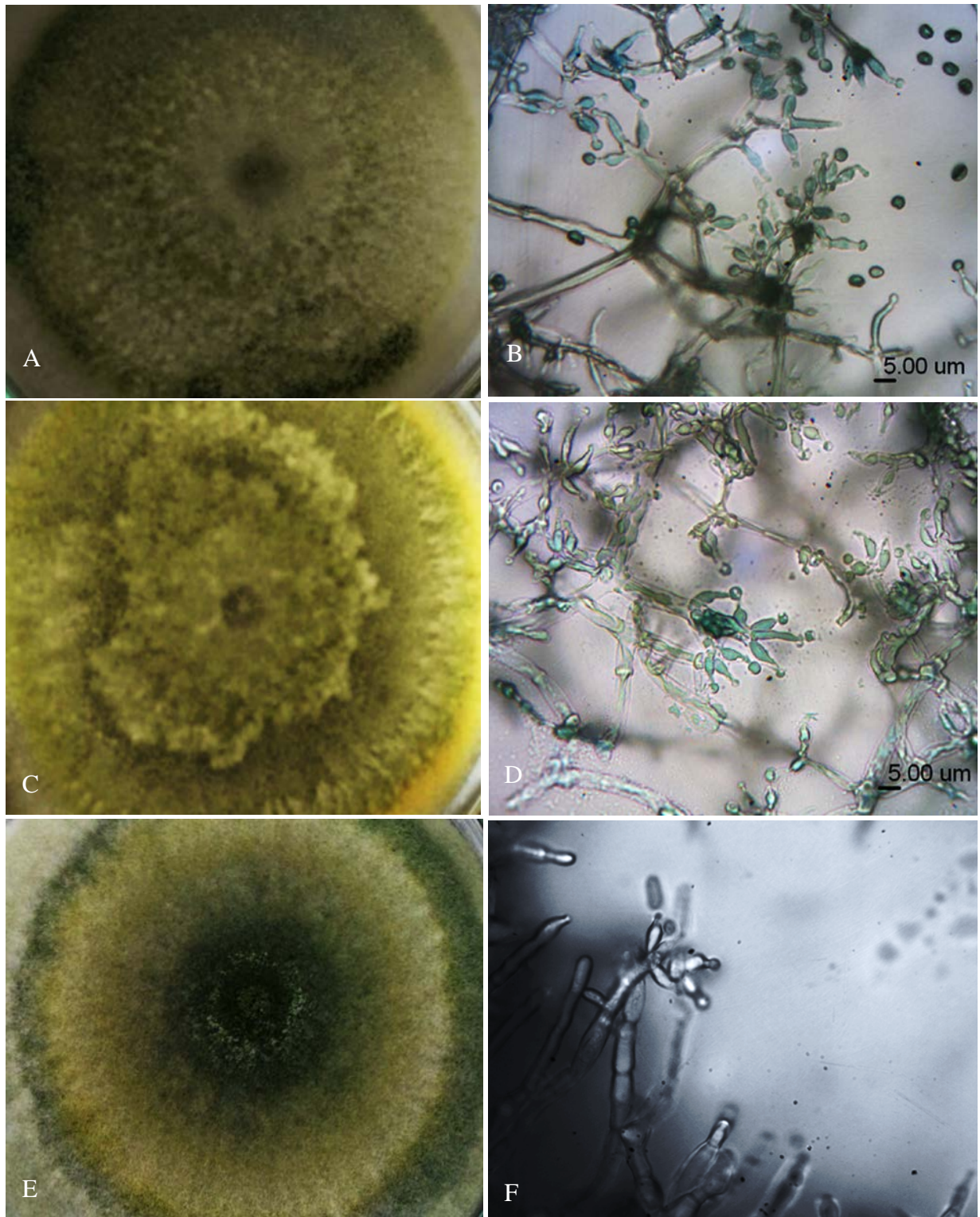
**Figura 34** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Trichoderma* sp.



(A e B) *Trichoderma* sp. M02, (C e D) *Trichoderma* sp. M151, M162. Observação em aumento de 100X, Barra = 5 μm.

Fonte: O autor

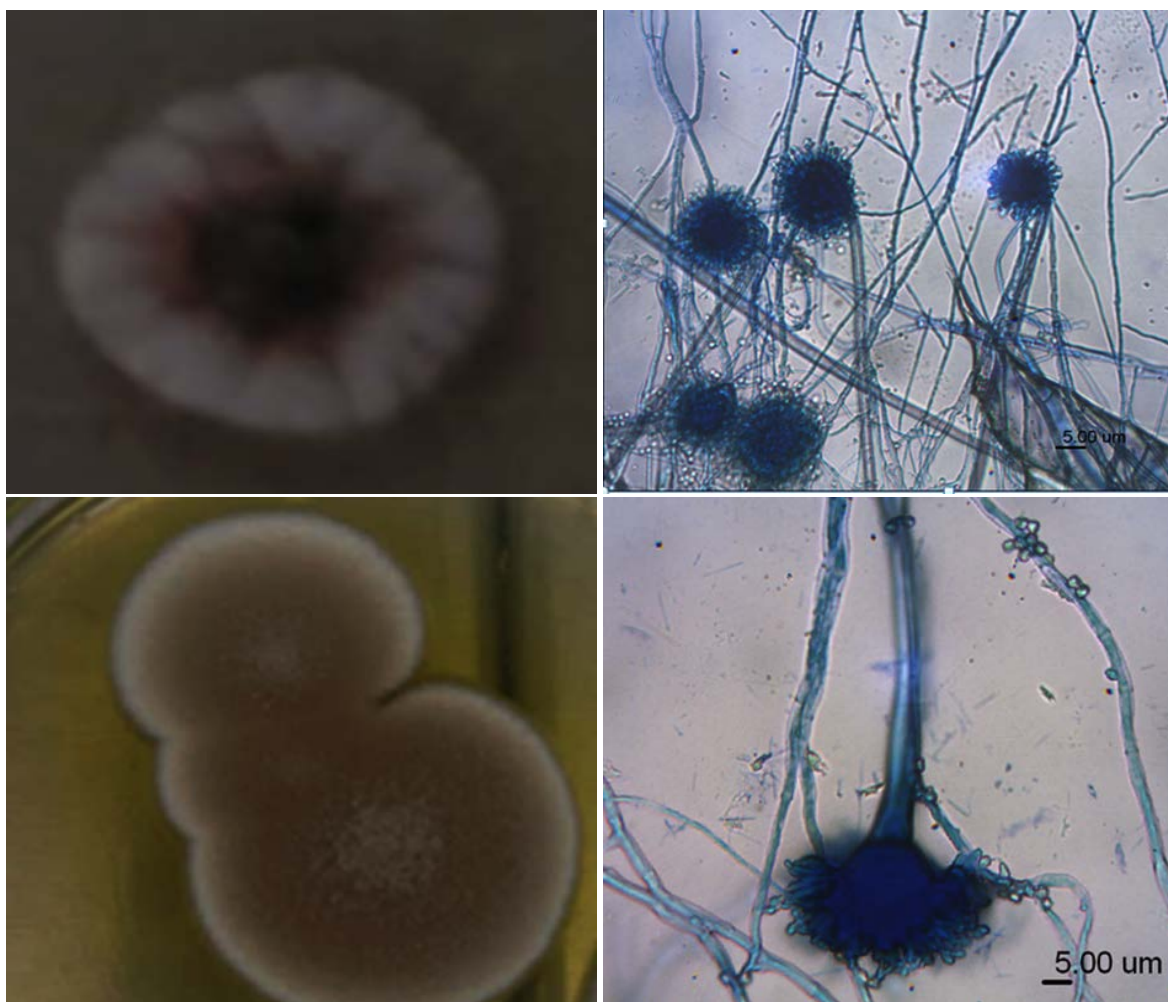
**Figura 35** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Trichoderma* sp.



(A e B) *Trichoderma* sp. M165, (C e D) *Trichoderma* sp. M167; (E e F) *Trichoderma* sp. Observação em aumento de 100X, Barra = 5 µm.

Fonte: O autor

**Figura 36** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Aspergillus* em meio Ágar Dextrose Batata (BDA) com 10 dias de crescimento a 28°C.

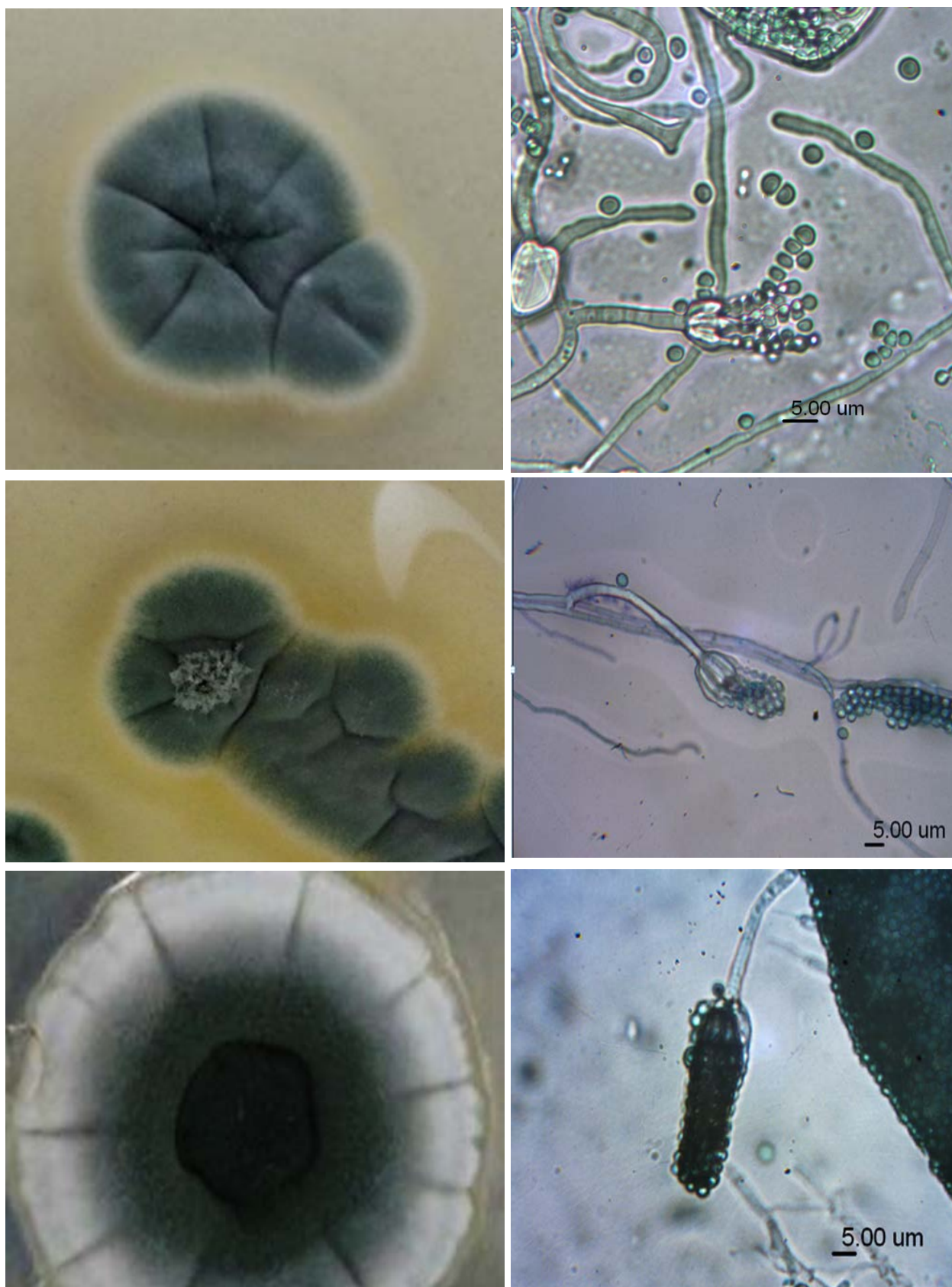


(A e B) *Aspergillus* sp. M04; (C e D) *Aspergillus* sp. M129. Observação em aumento de 100X, Barra = 5 μm.

Fonte: O autor.

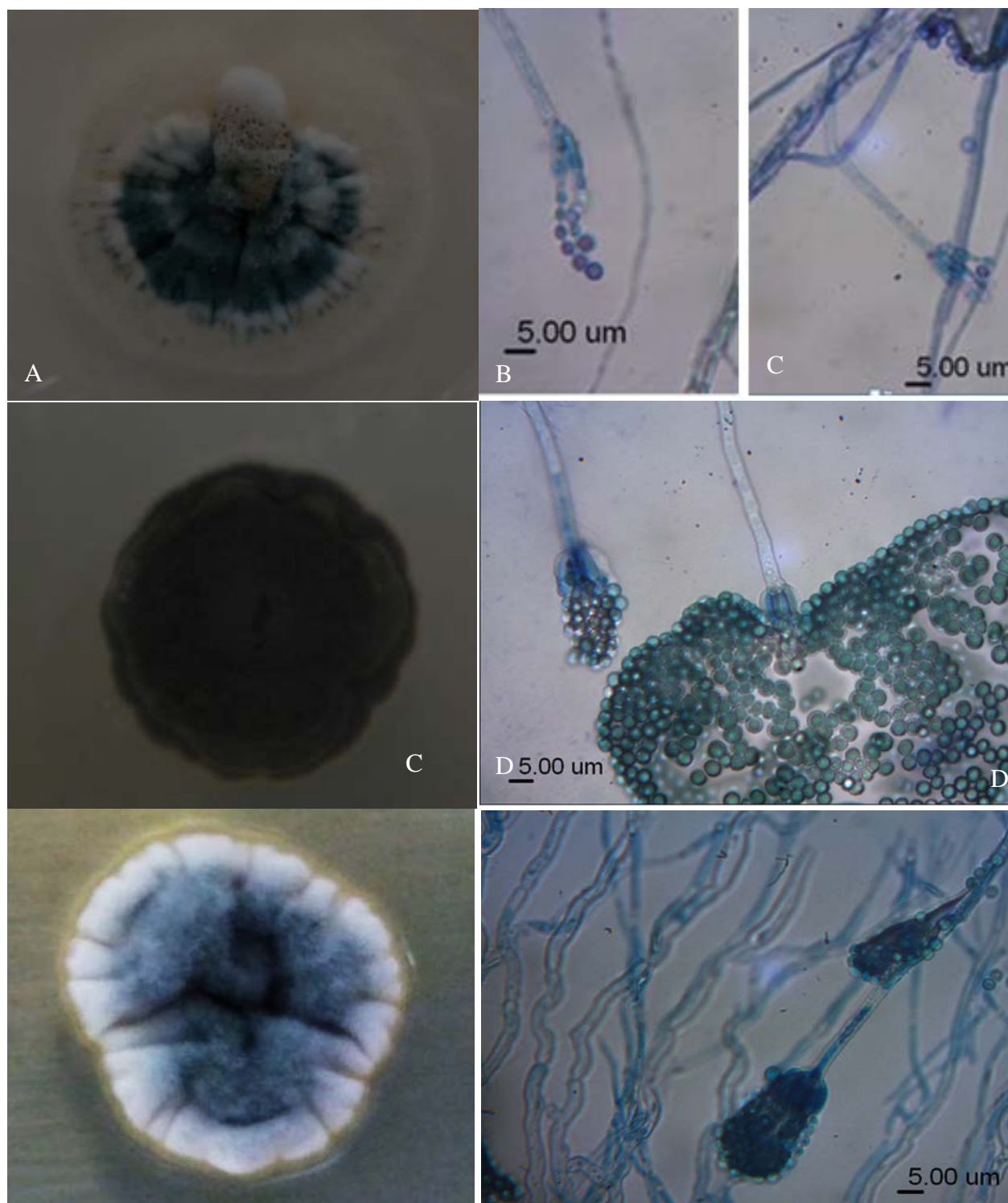


**Figura 37** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Penicillium* sp.



M10 (A e B), *P. M97* (C e D) e *P. sp. M117* (E e F), em meio Ágar Dextrose Batata (BDA) com 10 dias de crescimento a 28°C. Observação em aumento de 100X, Barra = 5 μm.. Fonte: O autor.

**Figura 38** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Penicillium* sp.



M1124 (A, B e C), *P. M135* (D e E) e *P. sp. M139* (F e G), em meio Ágar Dextrose Batata (BDA) com 10 dias de crescimento a 28°C. Observação em aumento de 100X, Barra = 5 µm.

Fonte: O autor

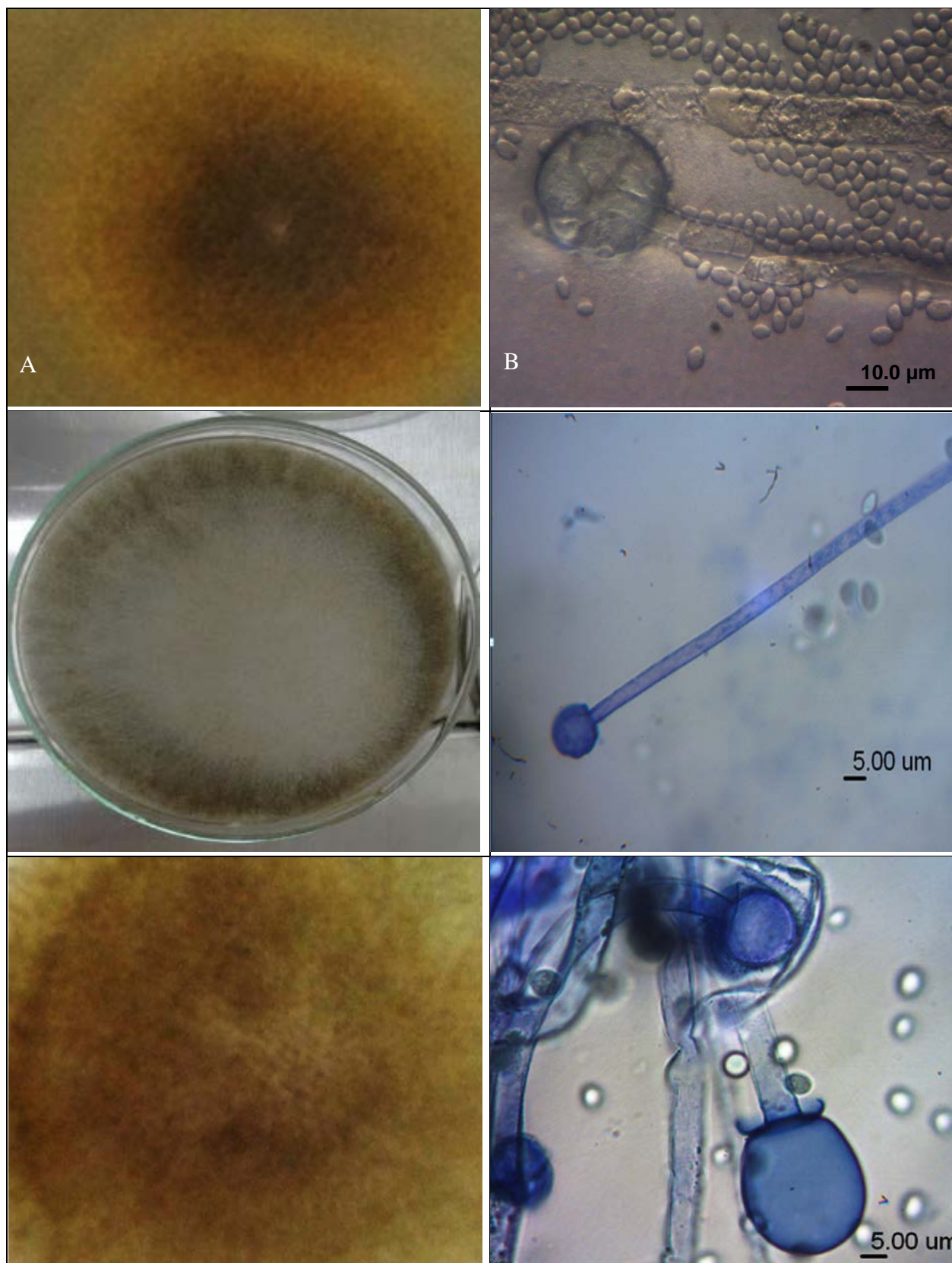
**Figura 39** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Penicillium* sp.



M153 (A e B), *P.* M175 (C e D), em meio Ágar Dextrose Batata (BDA) com 10 dias de crescimento a 28°C. Observação em aumento de 100X, Barra = 5 μm.

Fonte: O autor

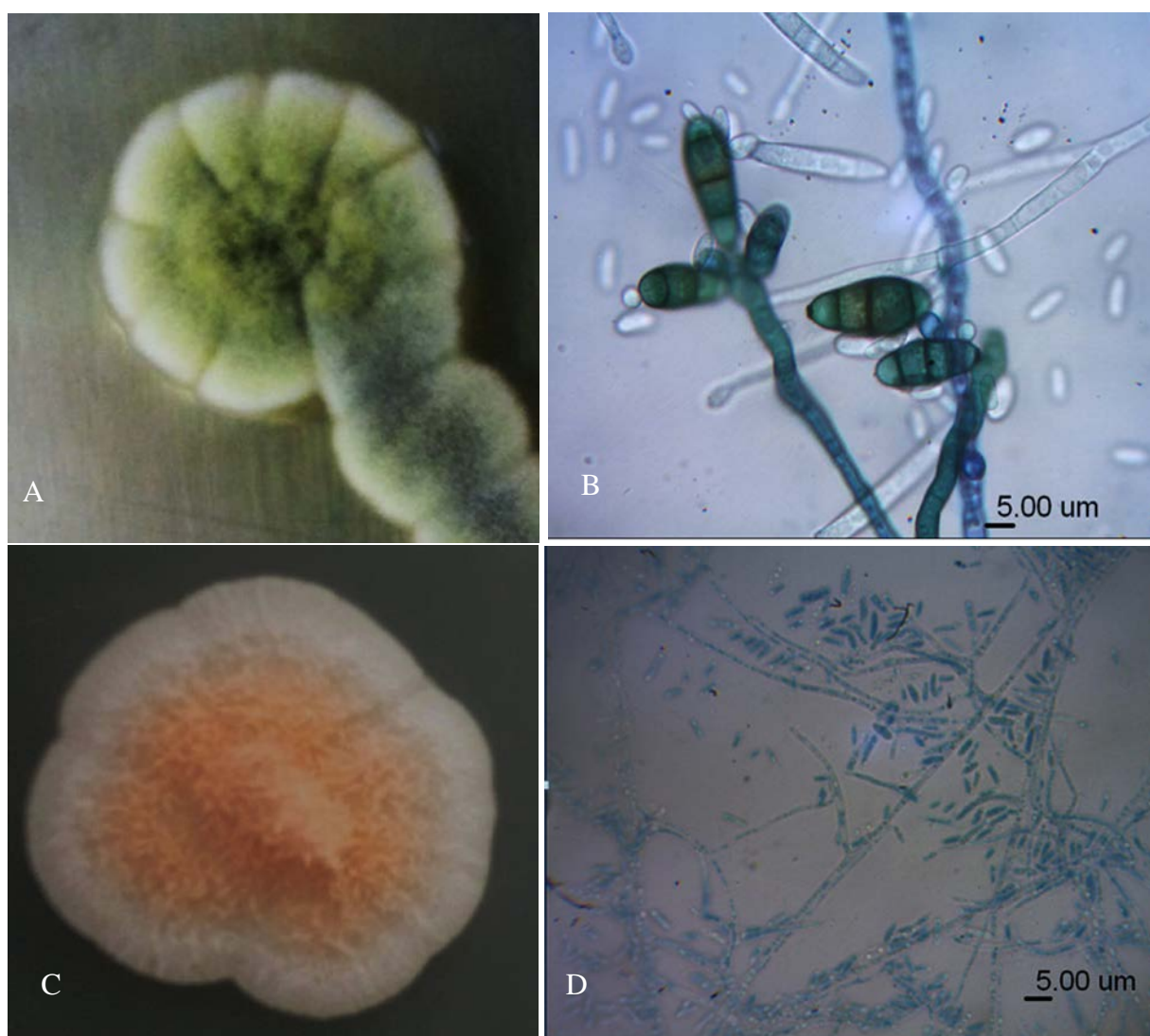
**Figura 40** - Visualização do aspecto macroscópico e microscópico do gênero *Mucor* sp. em meio Ágar Dextrose Batata (BDA) com 10 dias de crescimento a 28°C.



(A e B) *Mucor* sp. M19; (C e D) *Mucor* sp. M24; (E e F) *Mucor* sp. M45.

Fonte: O autor.

**Figura 41** - Aspecto macro e microscópico das linhagens de *Curvularia* sp. M44 e *Fusarium* sp. M133 cultivada em meio BDA a 28°C com cinco dias de crescimento.



(A e B) *Curvularia* sp. M44; (C e D) *Fusarium* sp. Observação em aumento de 100X, Barra = 5 μm.

Fonte: O autor