

JOSENILDA CARLOS DOS SANTOS

**PERFIL ENZIMÁTICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE UMA
COMUNIDADE MICROBIANA CELULOLÍTICA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237p
2014

Carlos dos Santos, Josenilda, 1984-
Perfil enzimático e análise filogenética de uma
comunidade microbiana celulolítica / Josenilda Carlos dos
Santos. - Viçosa, MG, 2014.
xii, 53f : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador : Flávia Maria Lopes Passos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.42-50.

1. Microbiologia industrial. 2. Microrganismos
biotecnológicos. 3. Comunidade microbiana. 4. Celulases.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Mestrado em Microbiologia Agrícola.
II. Título.

660.6 CDD 22. ed.

JOSENILDA CARLOS DOS SANTOS

**PERFIL ENZIMÁTICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE UMA
COMUNIDADE MICROBIANA CELULOLÍTICA**

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

APROVADA: 26 de novembro de 2014.

Fábio de Ávila Rodrigues

Cynthia Canêdo da Silva

Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

Dedico esta dissertação a Deus.

À minha família.

Ao meu amado, Josemar.

E aos meus amigos.

A fonte da minha força!

“Uma falsa ciência faz um homem ateu, mas uma verdadeira ciência leva o homem a Deus.”

Voltaire

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida e por me conceder a força necessária para seguir em frente diante das dificuldades.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia agrícola pela oportunidade e por todo o suporte financeiro, estrutural e intelectual.

Ao Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária – BIOAGRO por disponibilizar seu espaço e equipamentos para a realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e por todo o suporte financeiro.

A professora Flávia Maria Lopes Passos pela orientação e, principalmente, por extrair o melhor de mim a cada dia e por me mostrar como fazer Ciência com ética e comprometimento.

A Banca, professora Cynthia Canêdo e professor Fábio Rodrigues, pelas imensas contribuições.

Aos professores Wendel Batista da Silveira e Marisa Vieira de Queiroz pela co-orientação e por todas as contribuições feitas.

Aos meus pais por seu amor incondicional, por entender minha ausência em diversos momentos, por me dar todo o suporte para que eu pudesse concluir meu curso e por sempre ter me encorajado a nunca desistir de meus sonhos. Meus heróis!

Aos meus irmãos Diogo, Carlos, Igor, Antonio, João, Manoel e Benedito pelo carinho e pelo incentivo.

Ao meu namorado, Josemar, por toda a cumplicidade, compreensão e paciência ao longo desses dois anos. Sem você eu não teria conseguido!

Aos meus preciosos amigos do LabFis: Livia, Fernando, Robson, Mariana, Éder, Raquel, Breno, Amanda, Maria Fernanda, Juan, Lilian e Hugo. Obrigada pela convivência diária, pela ajuda constante, por terem se preocupado junto comigo, pelos momentos de descontração, pelas conversas, pelos cafés e caronas e, principalmente, pela amizade de vocês. Vocês são uma família para mim!

Ao Grupo de Convivência pelas orações e pelo apoio.

Aos meus amigos Verônica, Bárbara, Juliana, Caroline, Fernanda, Leonardo, Meriele e Sérgio por trazer alegria, inspiração e motivação nos meus piores momentos.

A Marcelo Nagem, Júlio Delvaux, Pedro Vidigal e Tomás Gomes por toda a ajuda e pelas ricas contribuições.

A todos os professores e professoras do Departamento por dividirem seu conhecimento comigo e me ensinarem a pensar além do óbvio.

A todos os queridos funcionários do Departamento, especialmente ao Danilo e a Nilcéa, por toda a ajuda, atenção e carinho.

Aos meus colegas de curso por toda a ajuda nas disciplinas e no projeto.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT..... | x |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 O estudo de comunidades microbianas celulolíticas..... | 4 |
| 2.2 Biomassa lignocelulósica..... | 7 |
| 2.3 Principais enzimas celulolíticas e hemicelulolítica | 10 |
| 2.3.1 Celulases..... | 10 |
| 2.3.2 Xilanases | 13 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 Reativação da comunidade | 15 |
| 3.2 Preparação do coquetel enzimático..... | 16 |
| 3.3 Determinação das atividades enzimáticas | 17 |
| 3.3.1 Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)..... | 17 |
| 3.3.2 Atividade de Xilanase | 17 |
| 3.3.3 Atividade de celulase total (FPase) | 18 |
| 3.3.4 Atividade de β -glicosidase..... | 19 |
| 3.3.5 Atividade de Protease | 19 |
| 3.3.6 Determinação da proteína total..... | 20 |
| 3.4 Efeito da temperatura, pH e termoestabilidade..... | 20 |
| 3.4.1 Análises estatísticas..... | 20 |
| 3.5.1 Extração do DNA total..... | 20 |
| 3.5.2 Amplificação dos genes 16S rRNA e 28S rRNA..... | 21 |
| 3.5.3 Sequenciamento e análise filogenética..... | 21 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 22 |
| 4.1 Detecção das atividades enzimáticas..... | 22 |
| 4.2 Produção das enzimas ao longo do tempo | 23 |
| 4.3 Efeito da temperatura, pH e termoestabilidade..... | 27 |
| 4.4 Composição da comunidade microbiana mista e relações filogenéticas..... | 34 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 5 CONCLUSÕES..... | 40 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 42 |
| APÊNDICE..... | 51 |

RESUMO

SANTOS, Josenilda Carlos dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2014. **Perfil enzimático e análise filogenética de uma comunidade microbiana celulolítica.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Coorientadores: Wendel Batista da Silveira e Mariza Vieira de Queiroz.

A hidrólise da lignocelulose, presente na biomassa vegetal, requer a participação de uma série de enzimas lignocelulolíticas, produzidas por diversos micro-organismos. Este processo é natural, gradual e resulta na liberação de açúcares fermentáveis e outros produtos industriais. No entanto, o processo de hidrólise da lignocelulose na indústria requer uma formulação enzimática robusta e com amplo espectro de atividade hidrolítica, capaz de disponibilizar a maior quantidade possível de açúcares para os bioprocessos. Dessa forma, o ideal seria produzir coquetéis enzimáticos a partir de comunidades microbianas, que se estabelecem em ambientes onde a biomassa vegetal está sendo degradada. Assim, os objetivos deste estudo foram: determinar e caracterizar atividades enzimáticas presentes no coquetel enzimático obtido a partir de uma comunidade microbiana celulolítica; determinar a diversidade de micro-organismos presentes nesta comunidade e inferir sobre as relações filogenéticas e funcionais entre seus membros. Uma comunidade microbiana celulolítica, derivada de duas outras comunidades foi cultivada em meio solução Peptona-Celulose (PCS), suplementado com 1% (p/v) de bagaço de cana, a 50°C e sem aeração, durante sete dias. O extrato enzimático produzido por esta comunidade apresentou cinco atividades enzimáticas diferentes (CMCase, FPase, xilanase, β -glicosidase e protease). Xilanase e CMCase alcançaram sua atividade máxima no sexto dia de cultivo (9,98 U mg⁻¹ e 2,0 U mg⁻¹, respectivamente), FPase no quarto dia (0,6 U mg⁻¹), β -glicosidase no terceiro (0,36 U mg⁻¹) e protease no primeiro dia (0,05 U mg⁻¹). O efeito do pH, temperatura e termoestabilidade sobre as atividades enzimáticas foi analisado. Xilanase e CMCase apresentaram maior atividade em pH 8,0, FPase e β -glicosidase em pH 7,0 e protease em pH 5,0. A melhor atividade de xilanase e CMCase ocorreu a 70°C, FPase a 60°C, β -glicosidase a 50°C e protease a 40°C. Xilanase, CMCase e FPase foram termoestáveis em todas as temperaturas testadas (40, 50 e 60°C) ao longo de 2h de incubação. A β -glicosidase foi termoestável nos 80 min iniciais, em todas as temperaturas. Protease foi termosensível a 40°C, nos 40 min iniciais de incubação. As atividades enzimáticas

presentes no coquetel enzimático, produzido pela comunidade microbiana mista, apresentaram tolerância a ampla faixa de pH e elevadas temperaturas e estabilidade térmica, exibindo potencial para aplicação em processos biotecnológicos. O DNA total da comunidade foi extraído, os genes ribossomais 16S e 28S foram amplificados e sequenciados. A análise das sequências dos genes ribossomais revelou que estes possuem similaridade maior que 90% com sequências conhecidas depositadas no GenBank e indicaram que a comunidade microbiana celulolítica era composta por diversas espécies de bactérias e fungos, que foram agrupadas em duas árvores filogenéticas. O fungo *Ganoderma lucidum* e a bactéria *Ureibacillus* não cultivável apresentaram a maior frequência relativa na comunidade. As complexas interações metabólicas e ecológicas entre as multiespécies microbianas, presentes na comunidade microbiana mista certamente contribuíram para a eficiente hidrólise da lignocelulose nas condições estabelecidas neste estudo.

ABSTRACT

SANTOS, Josenilda Carlos dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november, 2014. **Enzymatic profile and phylogenetic analysis of a cellulolytic microbial community**. Advisor: Flávia Maria Lopes Passos. Co-advisors: Wendel Batista da Silveira and Mariza Vieira de Queiroz.

The hydrolysis of lignocellulose present in the vegetable biomass requires the participation of a series of lignocellulolytic enzymes, produced by various microorganisms. This process is natural, gradual and results in the release of fermentable sugars and other industrially products. However, the hydrolysis process of the lignocellulose in the industry requires robust enzyme formulation with broad spectrum of hydrolytic activity, able to provide the largest possible amount of sugars for bioprocesses. Thus, the ideal would be to produce enzyme cocktails from microbial communities that are established in environments where the vegetable biomass is being degraded. The objectives of this study were to determine and characterize enzymatic activities present in the enzyme cocktail obtained from a cellulolytic microbial community; determine the diversity of micro-organisms present in this community and infer the phylogenetic and functional relationships among its members. One cellulolytic microbial community, derived from two other communities was cultured in Peptone-Cellulose Solution medium (PCS), supplemented with 1% (w/v) sugarcane bagasse, at 50°C, static conditions aeration, for seven days. The enzyme extract produced by this community showed activity of five different enzymes (CMCase, FPase, xylanase, β -glucosidase and protease). Xylanase and CMCase achieved their maximum activity on the sixth day of cultivation (9,98 U mg⁻¹ e 2,0 U mg⁻¹, respectively), FPase on the fourth day (0,6 U mg⁻¹), β -glucosidase on the third day (0,36 U mg⁻¹) and protease on the first day (0,05 U mg⁻¹). The effect of pH, temperature and thermostability of the enzyme activities was analyzed. Xylanase and CMCase exhibit higher activity in pH 8.0, FPase and β -glucosidase in pH 7.0 and protease in pH 5.0. The best activity of the xylanase and CMCase was at 70°C, FPase at 60°C, β -glucosidase at 50°C and protease at 40°C. Xylanase, CMCase and FPase were thermostable at all temperatures tested (50, 60 and 70°C) over 2h incubation. β -glucosidase was thermostable in the initial 80 min at all temperatures. Protease was thermosensitive at 40°C, in the initial 40 min. The enzymes present in the enzyme cocktail, produced by the mixed microbial community, presented

tolerance to a wide pH range and high temperatures and thermal stability, showing potential for application in biotechnological processes. The total DNA of the community was extracted, the 16S and 28S ribosomal genes were amplified and sequenced. Sequence analysis of ribosomal genes revealed that these have a similarity higher than 90% with known sequences deposited in GenBank and indicated that cellulolytic microbial community was composed of several species of bacteria and fungi that were grouped into two phylogenetic trees. The *Ganoderma lucidum* fungus and bacteria *Ureibacillus* uncultivable had the highest relative frequency in the community. The complex metabolic and ecological interactions between microbial multi-species present in the mixed microbial community certainly contributed to the efficient depolymerization of lignocellulose under the conditions established in this study.

1 INTRODUÇÃO

A demanda crescente por energia, associada a preocupações ambientais, estimula a busca por alternativas à substituição dos combustíveis fósseis por fontes de energia renováveis, como biocombustíveis de resíduos agroindustriais (DE PAULA et al., 2009). A biomassa lignocelulósica, presente na parede celular de vegetais e remanescente na maioria dos resíduos da agroindústria, é uma fonte potencial de açúcares solúveis para a fermentação e obtenção de combustíveis e outros produtos químicos industrializáveis, pois é constituída por polímeros de celulose, hemicelulose e lignina, em diferentes proporções (PARISI, 1989).

O processo de despolimerização da biomassa lignocelulósica é atribuído à ação de uma série de enzimas microbianas, que hidrolisam lignina, hemicelulose e celulose a seus monômeros constituintes. A lignina é separada da biomassa vegetal a partir da ação das enzimas lacases e peroxidases produzidas principalmente por fungos da degradação branca (KIRK e FARRELL, 1987). A celulose é hidrolisada por celulasas, gerando uma mistura de glicose, celobiose e oligossacarídeos (DILLON, 2004). A hemicelulose, por sua vez, é hidrolisada a monômeros de xilose, arabinose, manose, galactose e outros açúcares pelas enzimas do complexo xilanolítico (COUGHLAN, 1992). Tanto as celulasas quanto as xilanases são sintetizadas por fungos e por bactérias do meio ambiente.

Os micro-organismos lignocelulolíticos desenvolveram diversas estratégias a fim de decompor a biomassa vegetal, inclusive secretando um arsenal enzimático para a completa degradação da biomassa vegetal. Em geral, desenvolve-se uma sucessão ecológica de comunidades microbianas que secretam coquetéis enzimáticos incluindo lacases, peroxidases, celulasas, hemicelulasas, e outras enzimas acessórias cujas atividades gradativas e sinérgicas hidrolisam completamente a biomassa vegetal.

No processo de hidrólise de biomassas lignocelulósicas em escala industrial é ideal ter uma formulação enzimática com elevadas e diversas atividades capaz de cobrir todo espectro de hidrólise necessária à completa liberação dos açúcares. Coquetéis enzimáticos obtidos de comunidades microbianas satisfazem este requisito da indústria e são, em geral, mais estáveis e eficientes na produção de energia a partir de biomassa vegetal, além de terem sua atividade menos susceptíveis a regulação por *feedback* (DE LA TORRE e CAMPILLO, 1984). A reprodução de comunidades naturais traz ainda as vantagens evolutivas de seus respectivos membros, já que as mesmas já passaram pela seleção que favorecem sua convivência e a interação e comunicação entre os micro-organismos na comunidade constitui também um sistema metabolicamente acoplado, onde o produto de um membro é substrato ou sinal molecular para o metabolismo de outro membro (SMID e LACROIX, 2013; HARRISON e WRENG 1977).

Três comunidades lignocelulolíticas foram reproduzidas *in vitro*, a partir de inóculo natural de esterco de gado em compostagem, do bagaço de cana em decomposição e de uma mistura das duas anteriores (comunidade mista), por Souza (2012). A comunidade mista foi selecionada pela capacidade de hidrolisar em 72 horas a celulose e a hemicelulose adicionadas ao meio. Naquele trabalho foram estabelecidas as condições de reprodução do inoculante formado pela comunidade microbiana mista, bem como do coquetel enzimático extracelular cujas atividades de xilanase e CMCase foram demonstradas. A viabilidade do inoculante bem como as atividades de xilanase e CMCase ao longo de sessenta dias também foram verificadas, indicando potencial da aplicabilidade de ambos produtos: o inoculante e o coquetel enzimático. Entretanto, maior valor agregado seria conferido ao coquetel se outras atividades enzimáticas, inclusive β -glicosidase, normalmente deficientes nas preparações comerciais, fossem detectadas no mesmo extrato. É interessante, também, conhecer a estrutura biológica da comunidade inoculante, identificando os componentes de modo que cultivos associados possam ser promovidos *in vitro* para atender demandas específicas de uma biorrefinaria. Há ainda pouca informação disponível sobre culturas conduzidas *in vitro* de comunidades microbianas lignocelulósicas, portanto, estudar comunidades mistas e seus sistemas enzimáticos poderia fornecer uma base importante para a compreensão das complexas interações entre os micro-organismos envolvidos e do processo de degradação da lignocelulose na natureza. Desta forma, os objetivos dessa pesquisa foram determinar e caracterizar atividades enzimáticas no coquetel enzimático obtido a partir das comunidades previamente reproduzidas *in vitro* na presença de celulose, além de determinar a diversidade

de micro-organismos presentes e responsáveis por degradar a celulose na tentativa de inferir sobre as relações filogenéticas e funcionais dos membros dessa comunidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O estudo de comunidades microbianas celulolíticas

É grande o interesse em micro-organismos capazes de produzir enzimas que atuem eficientemente sobre a biomassa lignocelulósica, fonte abundante e sustentável para a produção de combustíveis e químicos (STEPHANOPOULOS, 2007). Micro-organismos vivendo em comunidades atuam de forma sinérgica na degradação da lignocelulose, aumentando a eficiência na utilização deste recurso. Além disso, comunidades microbianas celulolíticas podem ser selecionadas dos mais diversos ambientes, como por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar em compostagem (HARUTA et al., 2002), adubo composto maduro (WANG et al., 2011), bagaço de cana-de-açúcar em decomposição e esterco de boi (SOUZA, 2012), e conter desde fungos a bactérias aeróbias e anaeróbias.

Essas características das comunidades microbianas despertam o interesse de pesquisas biotecnológicas, principalmente na área de bioenergética. No entanto, há poucas informações sobre estas comunidades, sua composição e diversidade devido a grande dificuldade em caracterizá-las. Esta dificuldade reside no fato desta poder conter micro-organismos difíceis de serem cultivados ou não cultiváveis e por esses micro-organismos, muitas vezes, estarem presentes em interações complexas (SOLOMON et al., 2014).

Embora existam algumas dificuldades no estudo da diversidade de micro-organismos em uma comunidade, técnicas de biologia molecular desenvolvidas permitem identificar os grupos filogenéticos das comunidades microbianas, sem a necessidade direta de cultivo (AOI, 2002). Entre estas técnicas estão incluídos: os estudos dos genes ribossomais 16S, que é muito utilizado nos pesquisas de filogenia bacteriana por ser um gene estável e por apresentar regiões com sequência de nucleotídeos variáveis entre regiões conservadas, ausência aparente de transferência genética lateral, e por estar presente em todos os procariotos (AMANN, 1990); o estudo dos genes ribossomais 18S e 28S, que está presente em eucariotos e, é frequentemente utilizado em estudos de diversidade e filogenia de fungos (ANDERSON e CAIRNEY, 2004) e o uso de sequenciamento de nova geração (NGS – Next Generation Sequencing).

O sequenciamento NGS refere-se a várias técnicas de sequenciamento do genoma ou de partes dele, gerando uma grande quantidade de dados em um tempo relativamente curto e com um custo acessível, sem a necessidade direta de cultivar micro-organismos. As técnicas de sequenciamento NGS permitem não apenas estudar o genoma de um micro-organismo, mas também permitem estabelecer a relação genoma/ transcriptoma, estudos de prospecção de novos genes, análises de expressão através de sequenciamento de RNA (RNA seq), além de estudos da composição e dinâmica de comunidades microbianas. Geralmente, todas as plataformas de sequenciamento de nova geração utilizam o mesmo fluxo de trabalho (Figura 1). Onde, o primeiro passo é a coleta e processamento das amostras, que podem ser utilizadas em seu estado bruto, ou são isoladas em culturas puras (quando os micro-organismos de interesse são cultiváveis). Em seguida, a extração do DNA é realizada e uma biblioteca de *amplicons* é construída, através de PCR, e processada, algumas vezes com inserção de códigos de barra diferentes para cada amostra. As sequências são, então, obtidas, anotadas e comparadas com os bancos de dados disponíveis (SOLOMON et al., 2014). Uma vez obtidas essas informações, diversas inferências podem ser feitas e uma ampla faixa de conhecimento pode ser gerada.

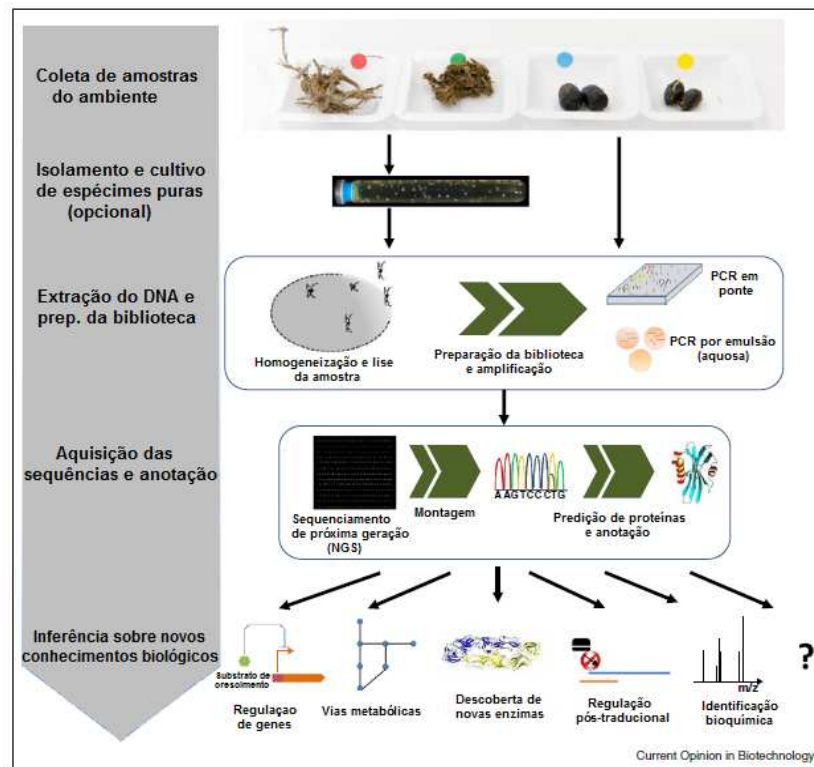


Figura 1 - Fluxo de trabalho das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS). Fonte: Adaptado de Solomon et al. (2014).

Estas técnicas de biologia molecular no estudo de comunidades microbianas permitiram ampliar o conhecimento acerca deste assunto e diversas pesquisas vem sendo publicadas nos últimos anos. A maior parte dos estudos de comunidades microbianas são aqueles relacionados ao melhoramento da qualidade de solos cultiváveis devido ao seu envolvimento na dinâmica da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e processos de decomposição, incluindo a desintoxicação de xenobióticos. A caracterização da diversidade e da composição microbiana permite uma melhor compreensão e possível manipulação das funções do ecossistema, porque a capacidade de um ecossistema para suportar perturbações graves pode depender, em parte, do componente microbiano do sistema (NANNIPIERI et al., 2003). Acosta-Martínez et al. (2008) analisaram a estrutura das comunidades microbianas e atividade enzimática do solo do semi-árido, sob diferentes manejos e observou que tanto a composição da comunidade quanto as atividades enzimáticas presentes no solo variam de acordo com a utilização do mesmo solo (para pastagem, agricultura ou plantio de árvores). Essas diferenças indicam que as comunidades microbianas e as atividades enzimáticas presentes em determinado solo é reflexo direto da funcionalidade daquele solo.

Outro foco do estudo de comunidades microbianas é o efeito da adição de um micro-organismo exógeno em uma comunidade conhecida. Narisawa et al. (2007) compararam duas comunidades de bactérias capazes de degradar efetivamente vários materiais celulósicos e cujos principais membros da comunidade e suas relações eram bem caracterizadas. Uma das comunidades foi dita “original” e a outra teve um micro-organismo exógeno introduzido. *Clostridium straminisolvens* CSK1, presente na comunidade original, era a principal fornecedora de metabólitos, originados a partir da degradação da celulose, aos outros membros da comunidade original. *Clostridium thermocellum*, a bactéria exógena, que é muito relacionada a *C. straminisolvens* e é capaz de produzir níveis altos de celulase, foi introduzida na comunidade. Os experimentos mostraram que a introdução de um micro-organismo exógeno não causou efeito significativo na degradação do material celulósico e nem na estrutura da comunidade. No entanto, não houve colonização por *C. thermocellum*, indicando uma desvantagem competitiva em relação à bactéria original.

2.2 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é considerada uma importante fonte de açúcares solúveis para a fermentação e obtenção de combustíveis e outros produtos químicos. A hidrólise da celulose e da hemicelulose e a fermentação das pentoses e glicose a etanol são alvos de estudos há vários anos (CANTARELLA et al., 2001). Matérias lignocelulósicas de baixo custo, como palha de trigo, serragem, bagaço de cana-de-açúcar e outros resíduos da agricultura são produzidos em bilhões de toneladas anualmente e podem ser utilizados se esta biomassa for convertida a produtos úteis (BON, GIRIO e PEREIRA JR., 2008). De acordo com Ferraz (2010), tais resíduos são compostos por 30 a 50% de celulose, 15 a 45% de hemicelulose e 20 a 30% de lignina, variando de acordo com o tipo do material, estágio vegetativo e idade (Figura 2).

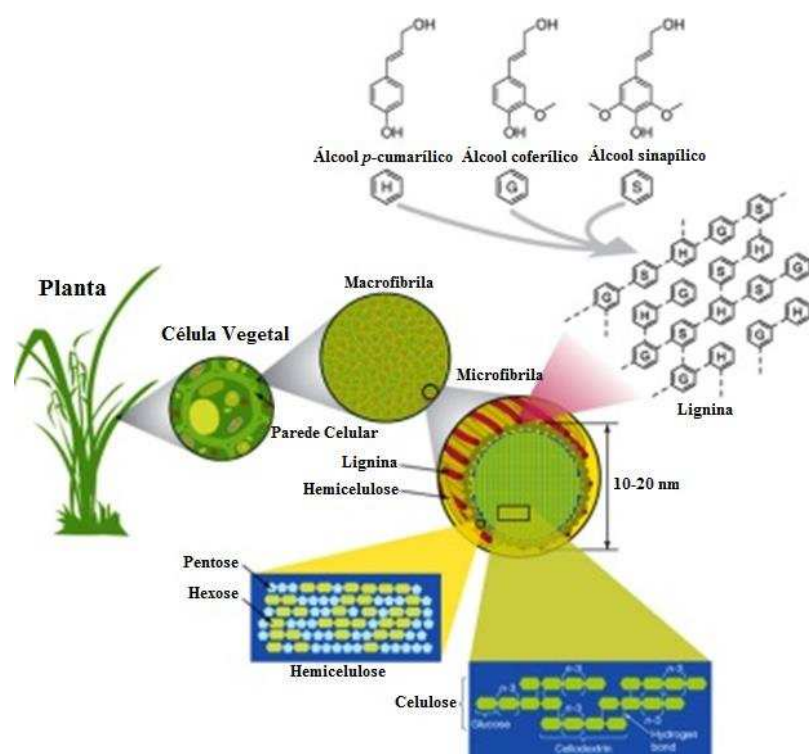


Figura 2 - Desenho esquemático da lignocelulose presente na biomassa vegetal. Fonte: adaptado de Rubim (2008).

A lignina é composta basicamente de unidades de fenilpropano, acopladas por ligações éter biologicamente estáveis, formando uma macromolécula tridimensional e amorfa, que representa de 20% a 30% do total dos lignocelulósicos e 40% do seu peso seco (FERRAZ, 2010; HIGUCHI, 1982; PAULI, 1997). O acoplamento das unidades de fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese da lignina, que se processa por via radicalar a partir de reação de três diferentes álcoois cinâmicos precursores (FERRAZ, 2010). Este arranjo estrutural da lignina, sem ligações repetidas, e sua localização envolta da fibra de celulose lhe permite desempenhar a função de cimentante e preservadora (PAULI, 1997). Assim, a lignina representa uma importante barreira física que irá dificultar a ação de enzimas hidrolíticas, limitando os sítios de ataques enzimáticos e impedindo a entrada de enzimas de maior peso molecular (RAJARATHNAM, SHASHIREKA e BANO, 1992). Para romper a barreira imposta pela lignina à atuação das celulases, geralmente, são empregados pré-tratamentos térmicos, físicos e químicos. Maeda et al. (2013) empregaram pré-tratamentos (ácido e alcalino) em bagaço de cana de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração e verificaram que os tratamentos foram eficazes na redução tanto de frações de hemicelulose (29,6-12,2%) quanto da lignina (19,4-

9,3%), com um aumento concomitante no teor de celulose da celullignina de 34,1% para 68,0%. Como a lignina representa um dos maiores estoques de carbono da natureza e é o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, ela constitui-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química, sobretudo como fonte de energia para diversos processos (PEREIRA JR., COUTO e SANTA ANNA, 2008).

A hemicelulose é composta de polímeros complexos, como anidro-açúcares de glicose, manose e galactose e por xilose e arabinose, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses dependendo do material vegetal. Representa 15% a 45% do material lignocelulósico e 20 a 40% do peso seco do vegetal (FERRAZ, 2010). Os arranjos moleculares podem variar bastante, originando compostos ramificados, classificados como xilanas, arabinoxilanas, arabinanas, galactomananas ou mananas, sendo as xilanas e as galactomananas os principais constituintes (BON, GIRIO e PEREIRA JR., 2008; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA et al., 2009). A hemicelulose difere da celulose, entre outras características, por possuir menor massa molecular, entre 100 e 200 unidades glicosídicas, e por não apresentarem região cristalina, sendo, portanto, mais suscetível a hidrólise química sob condições mais brandas. Os polissacarídeos da hemicelulose estabelecem, ainda, a ligação entre a celulose e a lignina (BON, GIRIO e PEREIRA JR., 2008; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

A celulose é o polímero natural e renovável mais abundante da Terra, sendo o principal componente da parede celular das plantas e constituindo cerca de 1/3 da matéria orgânica vegetal e 23% a 50% de seu peso seco (ARANTES e SADDLER, 2010; CAO e TAN, 2002; NORKRANS, 1967). Este polímero linear contém até 15.000 unidades de β -D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e por ligações de hidrogênio intramoleculares, que formam fibrilas altamente ordenadas (as fibrilas se associam e formam as fibras de celulose) e ligações de hidrogênio intermoleculares, que conferem rigidez à parede celular (ARANTES e SADDLER, 2010). A organização estrutural das fibrilas é alternada entre regiões altamente ordenadas, denominadas região cristalina e entre regiões não ordenadas, denominadas região amorfa (BAYER e LAMED, 1992; BON, GIRIO e PEREIRA JR., 2008). Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à absorção de solvente que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VÁSQUEZ et al., 2007). Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à celulose alta

força de tensão que permite às células vegetais suportarem uma elevada pressão osmótica e, ao mesmo tempo, confere grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração. A biodegradação da molécula de celulose está relacionada com a capacidade enzimática dos micro-organismos celulolíticos de penetrar entre as cadeias adjacentes da fibra, atuando em sítios onde a estrutura do substrato é mais acessível, ou seja, onde a fibra teve seu aspecto cristalino alterado para uma morfologia mais amorfa (ARANTES e SADDLER, 2010; BAYER e LAMED, 1992; BEGUIN e AUBERT,1994).

2.3 Principais enzimas celulolíticas e hemicelulolítica

As enzimas são proteínas que estão presentes em todos os sistemas biológicos e tem a função de catalisar reações entre componentes químicos com elevada especificidade sobre o substrato. Atualmente, são os principais alvos das pesquisas em Biotecnologia devido ao seu papel decisivo em mecanismos celulares e a sua potencialidade em substituir processos químicos convencionais, viabilizando economicamente diversos processos tecnológicos (ÂNGELO, 2010). Dentre as enzimas de interesse biotecnológico estão as enzimas do complexo lignocelulolítico, como as celulases e as xilanases que desempenham papel central na degradação da biomassa vegetal.

2.3.1 Celulases

As celulases são as enzimas responsáveis pela degradação da celulose que constituem o segundo maior grupo de carboidrases exploradas comercialmente. Apenas nos Estados Unidos, no fim da década de 1990, foi estimado um investimento de US\$ 400 milhões no mercado de celulases aplicadas em hidrólise de biomassa. No contexto atual, as celulases produzidas por fungos tem sido as mais estudadas e exploradas industrialmente, sobretudo para reutilização de resíduos lignocelulósicos provenientes da agricultura e de processos industriais para produção de etanol e de polpa de celulose, por exemplo. A ideia é utilizar os

resíduos agroindustriais como substratos para obtenção de celulasas a partir da fermentação microbiana (ÂNGELO, 2010).

As celulasas atuam nas ligações glicosídicas β -1,4 das microfibrilas de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose. (DILLON, 2004). Porém, a conversão enzimática é dificultada devido a composição da própria celulose, com fibras cristalinas insolúveis, embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina e pontes de hidrogênio que mantêm as moléculas unidas, reduzindo a acessibilidade das enzimas hidrolíticas (BEGUIN e AUBERT, 1994). Assim, a completa degradação da celulose requer ação sinérgica de um complexo de enzimas celulolíticas composto por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (ÂNGELO, 2010).

Endoglucanases (EC 3.2.1.4) – A 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase é a enzima do complexo celulolítico que dá início à hidrólise da molécula de celulose. As endoglucanases hidrolisam randomicamente as ligações glicosídicas da estrutura amorfa da fibra de celulose, liberando oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e novos terminais redutores e não redutores (LYND et al., 2002). Martins (2005) afirma que a forma em chave do sítio ativo das endoglucanases permite a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e a redução do grau de polimerização (GP). As regiões amorfas são mais acessíveis e, conseqüentemente, mais prontamente atacadas, pois as cadeias não estão envolvidas com interações de hidrogênio intermoleculares fortes como as que ocorrem em regiões cristalinas, assim há uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose.

Exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) – É um grupo formado por duas enzimas distintas: 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase (glucanohidrolase) que libera glicose diretamente do polímero e 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase (celobiohidrolase) que catalisa a hidrólise dos terminais redutores (enzimas do tipo I) e não redutores (enzimas do tipo II) da fibra celulósica e oligossacarídeos com GP>3 em celobiose (LYND et al., 2002). As celobiohidrolases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. Este fenômeno promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, expondo-as às outras celulasas (ZHANG e LYND, 2004). O sítio ativo das celobio-hidrolases possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando celobiose na maioria dos casos (MARTINS, 2005). As

celobiohidrolases geralmente são inibidas pelo seu produto de hidrólise – celobiose (CARVALHO, 2014).

β -Glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) – A β -glicosídeo glicohidrolase tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose (CASTRO, 2009; LYND et al., 2002; LYND e ZHANG, 2002) gerados pelas endoglucanases e exoglucanases. As betaglicosidases não são consideradas celulases legítimas, por não atuarem diretamente sobre as fibras de celulose, porém sua atuação é fundamental para a completa degradação da celulose, uma vez que as endoglucanases e celobiohidrolases são inibidas por celobiose (KAUR et al., 2007). Por outro lado, as betaglicosidases sofrem inibição por seu produto de hidrólise, a glicose, o que limita a aplicação destas enzimas na hidrólise enzimática (AWAFO, 1997). No entanto, foram encontradas algumas espécies de *Aspergillus* que produzem β -glicosidases tolerantes à glicose. O estudo detalhado dessas β -glicosidases tolerantes à glicose pode ajudar na obtenção de coquetéis enzimáticos mais eficientes para a hidrólise da biomassa (SINGHANIA et al., 2013).

São distinguidas pelo menos três formas de sinergia entre as enzimas celulolíticas (Figura 3):

Sinergia Endoglucanase/Exoglucanase - a endoglucanase, atua nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação das celobiohidrolase do tipo I e do tipo II, respectivamente;

Sinergia Exoglucanase/Exoglucanase - as celobio-hidrolase do tipo I e do tipo II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase;

Sinergias Exoglucanase/ β -glicosidase e Endoglucanase/ β -glicosidase - como seus produtos de hidrólise, a celobio-hidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β -glicosidase (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; BHAT e BHAT, 1997; LYND et al., 2002).

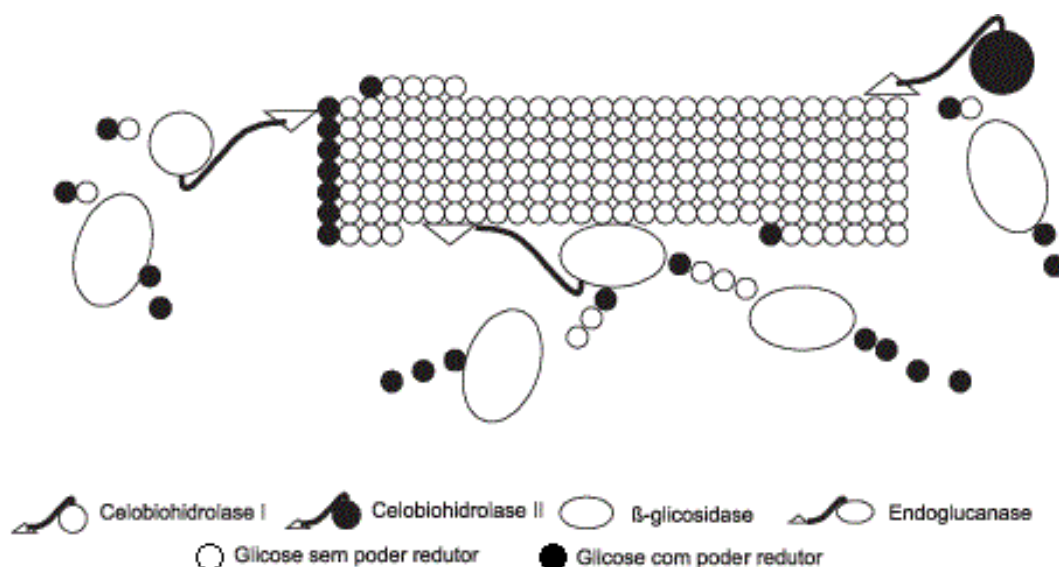


Figura 3 - Sinergias entre as diferentes celulases no processo de degradação da celulose. Fonte: Castro e Pereira JR. (2010).

2.3.2 Xilanases

Entre os principais componentes da hemicelulose está a xilana, que é um heteropolissacarídeo constituído por resíduos de xilanopiranosose unidos através de ligações β -1,4 com variado grau de substituições em suas cadeias laterais por ácido glucurônico, 4-O-metil-D-glucuronopiranosil, α -L-arabinofuranose e grupamento acetil. Para a total hidrólise da xilana, devido a sua heterogeneidade e complexidade, é necessária a ação sinérgica de várias enzimas xilanolíticas, entre estas estão endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), exoxilanase (β -D-xilano xilohidrolase), e β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37) (COLLINS, GERDAY e FELLER, 2005). As xilanases são produzidas, principalmente, por fungos e bactérias, tais como *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis*, e *Streptomyces lividans*, que tem sido amplamente utilizados na produção industrial destas enzimas (BEG et al., 2001).

Endo β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) – São classificadas como glicosidades e catalizam a hidrólise aleatória das ligações β -1,4 na cadeia de xilana, gerando xilo-oligossacarídeos de diferentes tamanhos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidase (JÄNIS et al., 2007). As endoxilanases podem tanto hidrolisar as ligações β -1,4 da xilana como podem também hidrolisar as ligações β -1,4 de outros polímeros, como os da celulose microcristalina.

Algumas enzimas irão atuar apenas nas regiões lineares da cadeia de xilana, enquanto outras nas regiões ramificadas, liberando resíduos de arabinose durante a hidrólise (COUGHLAN, 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa.

3.1 Reativação da comunidade

A comunidade microbiana celulolítica utilizada nestes experimentos foi obtida por Souza (2012) a partir da mistura de duas comunidades: uma selecionada do esterco de gado em fase termofílica de compostagem e outra selecionada de resíduos de bagaço de cana-de-açúcar no campo. Uma suspensão de células da comunidade mista encontra-se preservada à -80°C no Laboratório de Genética de Micro-organismos, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa.

Para ativar a comunidade foi inoculado 2% (v/v) da suspensão de células da comunidade mista em frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL de meio solução Peptona-Celulose (PCS), acrescido de 1% (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar (WONGWILAIWALIN et al., 2010). O bagaço de cana-de-açúcar foi previamente tratado, conforme descrito por Souza (2012). Uma tira de papel filtro Whatman® nº 1 de 2,0 x 7,0 cm foi adicionada para indicar a atividade das enzimas celulolíticas.

Os frascos foram incubados em estufa a 50°C em condições estáticas de aeração, por 7 dias (tempo necessário para a total degradação da tira de papel filtro, a partir do inoculo de células previamente congeladas). Após os 7 dias de incubação, 2% do sobrenadante foi transferido para um segundo frasco contendo o mesmo meio e sob as mesmas condições citadas anteriormente. Após 4 dias de inoculo no segundo frasco, uma nova transferência foi realizada para um terceiro frasco, também sob as mesmas condições do primeiro. Amostras de 5 mL do terceiro frasco foram coletadas diariamente, centrifugadas e as atividades enzimáticas foram detectadas. Durante todos os experimentos um controle negativo foi realizado, a fim de garantir que a comunidade microbiana era a responsável pela degradação da fita e não as condições de cultivo.

3.2 Preparação do coquetel enzimático

Após o período de incubação, o extrato enzimático foi coletado e centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos, a 24°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro frasco e uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições da primeira. Após a segunda centrifugação, todo o sobrenadante foi filtrado em discos de papel filtro Whatman® n° 1 de 45 mm de diâmetro com auxílio de uma bomba de vácuo. O material coletado foi ainda filtrado em membranas filtrantes com poros de 45 µm e, em seguida, de 22 µm também com auxílio da bomba de vácuo. Após estas etapas, o volume obtido de extrato bruto foi concentrado por ultrafiltração. O processo foi realizado usando-se uma célula de ultrafiltração, sob pressão de 1,08 atm em uma câmara a 23°C sob constante agitação. Foram utilizadas membranas de celulose regenerada com limite nominal de peso molecular de 3.000 Da (Millipore, MA, EUA). A caracterização das enzimas foi realizada nas frações filtradas e concentradas.

3.3 Determinação das atividades enzimáticas

3.3.1 Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade de CMCase (endoglucanase) foi determinada por espectrofotometria pelo método de liberação de açúcares redutores usando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme proposto por Miller (1959).

A mistura reacional foi adaptada de Ghose (1987). Cada tubo de reação continha 750 μL da solução de substrato, composta por carboximetilcelulose (CMC) na proporção de 1% (p/v) em solução tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,0, e 250 μL do extrato bruto. A mistura reacional foi incubada a 50°C por 30 minutos (T_f). Após este tempo, a reação enzimática foi interrompida em banho de gelo e 500 μL desta mistura foram transferidos para outro tubo de ensaio contendo 500 μL de DNS. Este tubo foi incubado em banho fervente por 5 minutos com posterior adição de 3,5 mL de água destilada. A determinação do tempo inicial da reação (T_0) foi feita a partir de um tubo com 750 μL do substrato que foi incubado sem o extrato bruto, o qual foi adicionado somente após ter transcorrido os 30 minutos. Imediatamente após a adição do extrato bruto, 500 μL da solução foram transferidos para outro tubo já contendo 500 μL de DNS e receberam o mesmo tratamento dos tubos T_f . A leitura da absorbância dos tubos T_f e T_0 foi feita sob o comprimento de onda de 540nm. No branco da reação, o extrato bruto foi substituído pelo mesmo volume da solução tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,0.

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se a equação da curva padrão de D-glicose (concentração variando de 0,3 a 1,3 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) com DNS, para se determinar as concentrações do açúcar no T_0 e T_f , levando-se em consideração as diluições feitas. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto por miligrama nas condições descritas (U mg^{-1}).

3.3.2 Atividade de Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pelo método espectrofotométrico a partir da liberação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNS.

A mistura reacional foi adaptada a partir do proposto por Bailey, Bailey e Poutanen (1992) e como substrato foi utilizado 750 μL de uma solução de xilana *birchwood* 1% (p/v) em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,0. O procedimento para realização do ensaio padrão adotado foi o mesmo descrito para CMCase, com exceção de que na mistura final, após o banho fervente, foi adicionados 2,0 mL de água destilada para se realizar a leitura da absorbância.

Para o cálculo da atividade, foi utilizada a equação da curva padrão de D-xilose (concentração variando de 0,5 a 2,3 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) com DNS, para se determinar as concentrações deste açúcar no T_0 e T_f .

3.3.3 Atividade de celulase total (FPase)

A atividade de celulase total foi determinada pelo método espectrofotométrico, através da quantificação dos açúcares redutores produzidos pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNS. Para determinação do T_f , 0,5 mL do sobrenadante enzimático foi adicionado a 1,0 mL tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, contendo uma tira de papel filtro (2,0 x 6,0 cm). A mistura reacional foi incubada a 50°C durante 4 horas (GHOSE, 1987). Após este tempo, a reação enzimática foi interrompida em banho de gelo e 500 μL desta mistura foram transferidos para outro tubo de ensaio contendo 500 μL de DNS. Este tubo foi incubado em banho fervente por 5 minutos com posterior adição de 5,0 mL de água destilada. Para a determinação do T_0 , 0,5 mL do sobrenadante enzimático foi adicionado a 1,0 mL tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, de forma semelhante a determinação do T_f , porém não houve incubação desta mistura reacional. A leitura da absorbância dos tubos T_f e T_0 foi feita sob o comprimento de onda de 550nm. O branco da reação foi feito substituindo o extrato enzimático por igual quantidade de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado utilizando-se a equação da curva padrão de D-glicose (concentração variando de 0,3 a 1,3 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) com DNS, para se determinar as concentrações do açúcar no T_0 e T_f . Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto por miligrama nas condições descritas (U mg^{-1}).

3.3.4 Atividade de β -glicosidase

A avaliação da atividade da β -glicosidase também foi realizada pelo método espectrofotométrico, utilizando o substrato cromogênico *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G) em microplacas. Para a determinação do T_f a reação, cujo volume final conterá 220 μ L, consistiu de 200 μ L do mix reacional (200 μ L de tampão mais 8 μ L da solução pNP β G) e 20 μ L da amostra contendo a enzima. Uma leitura inicial foi realizada à 405 nm para determinação do T_0 . Em seguida, a placa foi incubada a 37°C por 20 minutos e a leitura também foi realizada a 405 nm.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado segundo as instruções contidas no kit comercial para ensaios de β -glicosidase da Sigma®. Uma unidade (U) de β -glicosidase foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1 μ mol de pNP β G por minuto, sob as respectivas condições acima descritas.

3.3.5 Atividade de Protease

A atividade de protease foi determinada pelo método espectrofotométrico, com base na hidrólise da caseína. De acordo com o protocolo adaptado de Joo e Chang (2005). O T_f foi determinado a partir da incubação de 50 μ L de extrato enzimático, 450 μ L de tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 e 500 μ L de caseína 1% pH 8,0, por 15 minutos a 40°C. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida com adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10%. O meio de reação foi centrifugado a 12.0000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e a absorbância foi determinada a 280 nm. A determinação do T_0 seguiu os mesmos passos do T_f , porém a solução de ácido tricloroacético 10% foi adicionada primeiro e não houve incubação da mistura. Para o branco da reação foram utilizados 500 μ L de tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0, 500 μ L de caseína 1% pH 8,0 e 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10% .

O cálculo da atividade enzimática foi realizado utilizando a equação da curva padrão de tirosina (concentração variando de 0,06 a 0,5 μ mol mL⁻¹). Uma unidade (U) de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de tirosina por minuto nas condições descritas.

3.3.6 Determinação da proteína total

A quantidade de proteína total presente no sobrenadante da amostra foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm, conforme o método descrito por Bradford (1976), e usando uma curva padrão de albumina de soro bovino (concentração variando de 2,5 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

3.4 Efeito da temperatura, pH e termoestabilidade

O efeito da temperatura nas atividades de CMCase, xilanase, FPase, protease e β -glicosidase foi determinado nas temperaturas 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, em pH 5,0. Em seguida, o efeito do pH nas atividades de CMCase, xilanase, FPase, protease e β -glicosidase foi determinado nos pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 9,0 e 10,0, na melhor temperatura de cada enzima, determinada anteriormente. Por fim, a verificação da termoestabilidade foi realizada através da incubação do extrato enzimático bruto nas temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C. O extrato enzimático foi incubado por 2 horas, sendo as atividades determinadas após 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos, na melhor temperatura e pH de cada enzima. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições dos ensaios enzimáticos padrões.

3.4.1 Análises estatísticas

Todos os ensaios enzimáticos foram repetidos três vezes, assim, foram calculadas as médias de cada ensaio e seu desvio padrão. Foi realizada, ainda, análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey, com nível de significância 5%.

3.5 Composição da comunidade microbiana mista e análise filogenética

3.5.1 Extração do DNA total

Um volume de 10 mL do cultivo da comunidade microbiana foi centrifugado e o material decantado, ressuspensionado em 300 μL de água. A partir das suspensões, foi feita a

extração do DNA total da amostra usando o protocolo adaptado de Stevenson e Weimer (2007).

3.5.2 Amplificação dos genes 16S rRNA e 28S rRNA

A amplificação do gene ribossomal 16S foi obtida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os *primers* universais para o domínio Bacteria, UNI-27F1 (5'-GAGTTGATCMTGGCTCAG-3') e UNI-518R1 (5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3') (MAO et al, 2012). E a amplificação do gene ribossomal 28S também foi realizada por PCR, usando a combinação dos *primers* NL1-F (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4-R (5-'GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (HESHAM et al., 2006; KURTZMAN e ROBNETT, 1998).

As reações foram feitas em um volume total de 25 µL, compostas de: 1 µL de cada amostra de DNA diluída [20 ng/µL] e 24 µL da mistura reacional (1 µL de cada *primer* a 10 µM, 0,1 µL de cada deoxinucleosídeo trifosfato [10 µM], 2,5 µL de tampão de reação 10X, 0,25 µL da enzimas DNA polimerase de alta fidelidade [5 U/µL] e 18,75 µL de água ultrapura). As reações de PCR foram iniciadas com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos termais de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão de 72°C por 8 minutos.

3.5.3 Sequenciamento e análise filogenética

Os fragmentos com as sequências dos genes ribossomais 16S e 28S foram amplificados e sequenciados por pirosequenciamento. A comparação de sequências foi realizada utilizando a opção de busca BLAST no banco de dados de sequência de nucleotídeos NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a análise filogenética, as sequências foram alinhadas usando o Clustal W *software* e o Gblocks. A árvore filogenética foi construída usando o método *Neighbor-Joining* pelo programa MEGA 6.0, e algumas sequências de referência utilizadas na construção da árvore foram adquiridas do GenBank. A análise de *bootstrap* com 100.000 repetições foi aplicada para atribuir confiança aos níveis nos nós das árvores.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Detecção das atividades enzimáticas

A fita de papel filtro, utilizada como indicador da atividade de celulases, foi totalmente degradada após sete dias de cultivo no primeiro frasco inoculado com as células da comunidade mista que estavam preservadas a -80°C e, então, sucessivas reinoculações foram realizadas até a obtenção do menor tempo de degradação da fita, que ocorreu no terceiro frasco, após três dias. Do terceiro frasco, uma nova reinoculação foi feita com o objetivo de monitorar a produção de enzimas, ao longo do tempo. Durante sete dias de incubação da comunidade microbiana mista, cinco enzimas extracelulares diferentes foram detectadas no extrato enzimático bruto, sob as condições experimentais definidas. Quatro dessas enzimas estão relacionadas ao processo de degradação da biomassa lignocelulósica (CMCase, xilanase, FPase e β -glicosidase) e uma pode interferir diretamente na atividade das demais enzimas por tratar-se de uma protease. Os resultados experimentais mostraram que o extrato enzimático produzido por esta comunidade tem potencial aplicação na degradação completa da holocelulose (celulose e hemicelulose), proveniente da biomassa vegetal pré-tratada.

Com relação ao tempo de degradação da fita de papel filtro, os dados obtidos neste estudo foram semelhantes aos obtidos por Souza (2012), após três dias de incubação. Resultado similar também foi encontrado por Lv et al. (2008), onde comunidades microbianas mistas que foram selecionadas de adubo, esterco de gado e palha em decomposição apresentaram a capacidade de degradar a lignocelulose também em três dias. Já Wongwilaiwalin et al. (2010) após sucessivas subculturações de um consórcio microbiano,

obtido a partir de bagaço de cana-de-açúcar em compostagem, observou que somente após sete dias a fita era degradada.

No que se refere a atividade de diferentes enzimas, houve melhores resultados neste estudo, com a detecção de cinco enzimas diferentes (xilanase, CMCase, FPase, β -glicosidase e protease), sendo três destas novas, em relação ao trabalho de Souza (2012). Esse achado confere um maior valor agregado ao coquetel produzido por esta comunidade, pois um coquetel que apresenta atividade de cinco enzimas diferentes é mais bem aplicado do que um que apresenta atividade de apenas duas.

A maioria dos estudos com comunidades microbianas celulolíticas apresenta atividades de CMCase, xilanase, β -glicosidase e, algumas vezes, exoglucanase (KALYANI et al., 2013; LV et al., 2008; LV, YANG e YUAN, 2008; WONGWILAIWALIN et al., 2010), mas em nenhum destes estudos a atividade de protease é avaliada. Estudos indicam que a expressão de celulases também desencadeia a expressão de proteases, que hidrolisa as celulases extracelulares. Porém, o processo de proteólise sofrido pelas celulases após sua secreção não resulta apenas em baixos níveis extracelulares destas enzimas, mas origina tanto múltiplas formas quanto enzimas específicas para degradação da celulose (JUTURU e WU, 2014).

4.2 Produção das enzimas ao longo do tempo

A atividade das enzimas presentes no extrato enzimático bruto atingiu níveis máximos em diferentes dias, para cada enzima analisada (Figura 4).

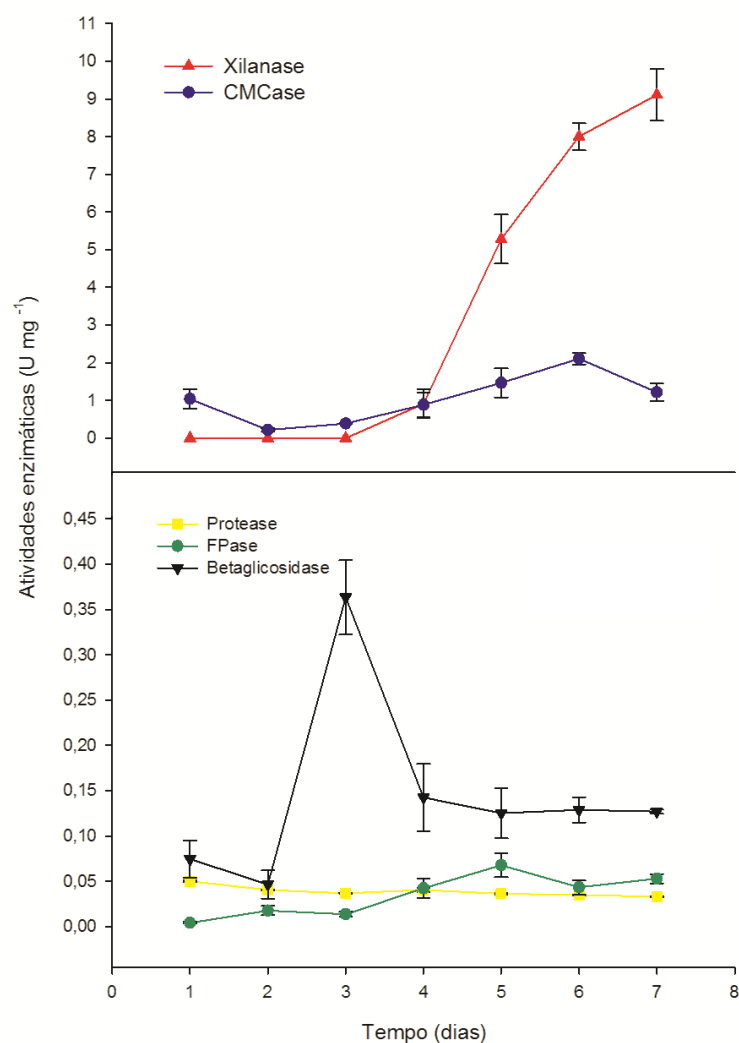


Figura 4 - Determinação das atividades enzimáticas presentes no coquetel enzimático, produzido pela comunidade microbiana celulolítica ao longo de 7 dias de incubação em meio PCS, suplementado com 1% de bagaço de cana, à 50°C, pH 5,0 e sem aeração. Os valores representam as médias das três medições e as barras de erro indicam o desvio padrão.

A maior atividade enzimática detectada no sobrenadante produzido pela comunidade microbiana mista foi de xilanase no sexto e sétimo dias (7,98 e 9,98 U mg⁻¹, respectivamente), com valores estatisticamente iguais entre si (Tabela 1). Mas, apesar de ter apresentado maior atividade em relação às outras enzimas, a xilanase não foi detectada nos três primeiros dias de incubação, o que poderia indicar a necessidade de um indutor que se acumula no meio somente após esse período. Lv et al., (2008) também observou que a atividade de xilanase extracelular atingiu níveis altos apenas após o terceiro dia de incubação. A enzima CMCCase também apresentou o sexto dia como de maior produção, atingindo 2,0 U mg⁻¹, enquanto nos demais dias a produção foi menor e os valores não apresentaram diferenças significativas.

Juntas, xilanase e CMCase apresentam as maiores atividades encontradas no extrato enzimático bruto, o que indica que estas duas enzimas são as maiores responsáveis pela degradação da holocelulose pela comunidade e seus valores máximos são maiores do que os valores encontrados na literatura sob as mesmas condições de cultivo de uma comunidade (WONGWILAIWALIN et al., 2010). Com relação a β -glicosidase, sua maior atividade ocorreu no terceiro dia (0,36 U mg⁻¹) e depois seus valores se mantiveram estáveis. A enzima FPase nos três primeiros dias mostrou valores de atividade baixos e estatisticamente iguais entre si, tendo sua atividade aumentada do quarto ao sétimo dia, mas também sem diferenças significativas.

Tabela 1. Valores médios (erro padrão) da medida de atividade enzimática em função do tempo.

| Tempo (dias) | ¹ Médias das atividades enzimáticas (U mg ⁻¹) | | | | |
|-----------------|--|------------|-----------|---------|-----------------|
| | Xilanase | CMCase | Protease | FPase | Betaglicosidase |
| 1° | 0 a | 0,99 b c | 0,049 d | 0,004 a | 0,085 a |
| 2° | 0 a | 0,24 a | 0,040 c | 0,02 a | 0,046 a |
| 3° | 0 a | 0,39 a b | 0,037 b | 0,015 a | 0,39 b |
| 4° | 0,97 a | 0,82 a b c | 0,40 c | 0,044 b | 0,13 a |
| 5° | 5,3 b | 1,24 c | 0,036 b | 0,06 b | 0,13 a |
| 6° | 7,98 c | 2,0 d | 0,035 a b | 0,042 b | 0,13 a |
| 7° | 9,98 c | 1,28 c | 0,032 a | 0,05 b | 0,13 a |

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de significância de 5%.

Wongwilaiwalin et al. (2010), em um estudo com uma comunidade, também selecionada a partir do bagaço de cana em compostagem, não encontrou nenhuma atividade de exoglucanase e β -glicosidase no extrato enzimático. No extrato enzimático bruto deste estudo todas as enzimas necessárias à degradação da celulose (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) e, uma fundamental na degradação da hemicelulose (xilanase), foram detectadas. Isto explica a eficácia do coquetel na total degradação da fita de papel filtro, utilizada como indicador de atividade destas enzimas. É extremamente importante que um coquetel enzimático destinado a sacarificação da biomassa vegetal apresente todas as enzimas de despolimerização da holocelulose, uma vez que há uma forte sinergia entre elas (WOOD e MCRAE, 1979).

Protease teve sua maior atividade detectada no primeiro dia, sendo que esta atividade foi menor do que a atividade das demais enzimas. Além de sua atividade máxima ser menor que as atividades das enzimas celulolíticas, a protease teve seu máximo de produção no primeiro dia de cultivo, enquanto que as demais enzimas apresentaram seu máximo a partir do terceiro dia, o que pode sugerir que a protease produzida pela comunidade mista não afeta a ação das celulases expressas no processo de despolimerização da biomassa vegetal e, possivelmente, a expressão das celulases não desencadeia a expressão destas proteases.

A comparação das atividades enzimáticas encontradas neste estudo com alguns dados registrados na literatura estão resumidos na Tabela 2. O fungo *Trichoderma reesei* RUT C30 é uma estirpe geneticamente modificada para super-expressar celulases, porém apresenta deficiência na produção de β -glicosidase (JUHÁSZ et al., 2005). Quando os dados obtidos neste estudo é comparado com os dados desse fungo observa-se que o RUT C30 tem maior atividade de FPase e CMCase, enquanto a comunidade microbiana mista tem maior atividade de xilanase e β -glicosidase. A bactéria *Bacillus* sp., quando cultivada em carboximetilcelulose, produz mais FPase e β -glicosidase do que a comunidade mista mas, a produção de CMCase é muito menor. Comparando as atividades com as de um consórcio microbiano, cultivado sob as mesmas condições, apenas a β -glicosidase apresenta maior atividade que a comunidade mista. A comunidade mista deste estudo apresentou atividade de xilanase três vezes maior e de CMCase pouco mais de vinte vezes maior que a comunidade mista cultivada por Souza (2012), nas mesmas condições, embora ambas tenham sido obtidas a partir do mesmo inoculante. No geral, pode-se afirmar que o coquetel enzimático produzido pela comunidade microbiana mista é bastante promissor para aplicação na despolimerização da holocelulose, liberando açúcares fermentáveis e outros oligossacarídeos com potencial aplicação industrial.

Tabela 2. Comparação das atividades enzimáticas de celulases e hemicelulase de diferentes origens.

| Fonte | Enzimas (U mg ⁻¹) | | | | Referência |
|---------------------|-------------------------------|------------|------------|----------------------|---------------------|
| | Xilanase | FPase | CMCase | β -glicosidase | |
| Comunidade mista | 9,1±1,9 | 0,6±0,01 | 2,1±0,1 | 0,36±0,1 | Este estudo |
| RUT C30 | 4,68±0,29 | 0,92±0,06 | 7,48±0,27 | 0,07±0,01 | Jiang et al. (2011) |
| <i>Bacillus</i> sp. | ---- | 0,84±0,026 | 0,73±0,011 | 0,93±0,014 | Sadhu et al. (2014) |
| C. mista | 2,86±0,36 | ---- | 0,09±0,01 | ---- | Souza (2012) |

4.3 Efeito da temperatura, pH e termoestabilidade

Os ensaios referentes ao efeito da temperatura revelaram que as enzimas de um modo geral apresentaram maior atividade em temperaturas elevadas, o que já era esperado por tratar-se de uma comunidade microbiana com características termofílicas (Figura 5).

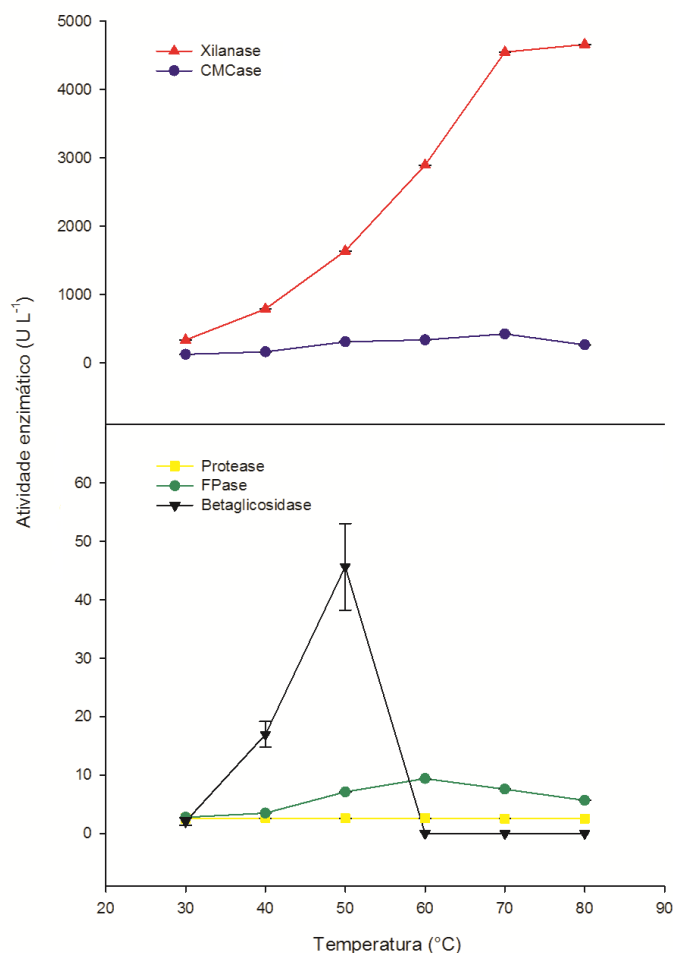


Figura 5 – Efeito da temperatura nas diferentes atividades enzimáticas presentes no coquetel enzimático, produzido pela comunidade microbiana celulolítica, em pH 5,0. Os valores representam as médias das três medições e as barras de erro indicam o desvio padrão.

A xilanase apresentou maior atividade a 70 e 80°C, cujos valores de atividade não apresentaram diferenças significativas (Tabela 3). Xilanases produzidas por comunidades apresentam atividade ótima em menores temperaturas, na faixa de 50 a 60°C. E xilanases produzidas por micro-organismos isolados apresentam temperatura ótima na faixa de 30 a 60°C, sendo as xilanases de bactérias mais tolerantes a altas temperaturas (ANG et al., 2013; KULKARNI et al., 1999; LV, YANG e YUAN, 2008; YANG et al., 2011; WONGWILAIWALIN et al., 2010). De forma semelhante à xilanase, a CMCase também apresentou maior atividade na temperatura 70°C. As endoglucanases, tanto de fungos quanto de bactérias, descritas na literatura também apresentam características termofílicas, tendo o seu ótimo variando de 50 a 70°C (ALMEIDA et al., 2013; ANG et al., 2013; YANG et al., 2011). Porém, nem toda endoglucanase é mesofílica ou termofílica. Há uma endoglucanase

bacteriana, isolada na Antártida, que possui pequenas alterações em sua estrutura para se adaptar a ambientes frios, assumindo características psicrófilas (VIOLOT et al., 2005). Dados obtidos por Souza (2012) para esta mesma comunidade apresentaram diferença nas temperaturas ótimas de xilanase e CMCCase (65°C e 60°C, respectivamente).

A enzima FPase alcançou atividade máxima a 60°C (9,42 U L⁻¹), mas manteve cerca de 80% de sua atividade a 50 e 70°C, nas quais não houve diferenças significativas entre si. A β-glicosidase apresentou sua atividade máxima a 50°C e em temperaturas maiores não apresentou nenhuma atividade. As β-glicosidases mais bem descritas na literatura pertencem, principalmente, ao gênero de fungos filamentosos *Aspergillus* e, geralmente, apresentam ótimo de atividade a 70°C (ANG et al., 2013; LI et al., 2013). A menor temperatura ótima entre as enzimas testadas foi a de protease, com atividade máxima a 40°C. São relatadas diversas proteases, produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* (proteases de *Bacillus* são dominantes na indústria de enzimas proteolíticas) com ótimo a 60°C (SEPAHY e JABALAMELI, 2011).

Tabela 3. Valores médios (erro padrão) da medida de atividade enzimática em diferentes temperaturas.

| Temperatura (°C) | ¹ Médias das atividades enzimáticas (U L ⁻¹) | | | | |
|---------------------|---|---------|----------|--------|-----------------|
| | Xilanase | CMCase | Protease | FPase | Betaglicosidase |
| 30 | 324,5 a | 131,6 a | 2,58 a b | 2,87 a | 1,91 a |
| 40 | 795,8 b | 166,1 a | 2,65 c | 3,42 a | 16,95 b |
| 50 | 1654,2 c | 322,5 c | 2,6 b | 7,15 c | 44,3 c |
| 60 | 2901,5 d | 330,2 c | 2,58 a b | 9,42 d | 0 a |
| 70 | 4563,4 e | 421,0 d | 2,57 a b | 7,54 c | 0 a |
| 80 | 4716,0 e | 263,2 b | 2,55 a | 5,67 b | 0 a |

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de significância de 5%.

A figura 6 sumariza os resultados do efeito do pH para as diferentes enzimas produzidas pela comunidade mista em estudo.

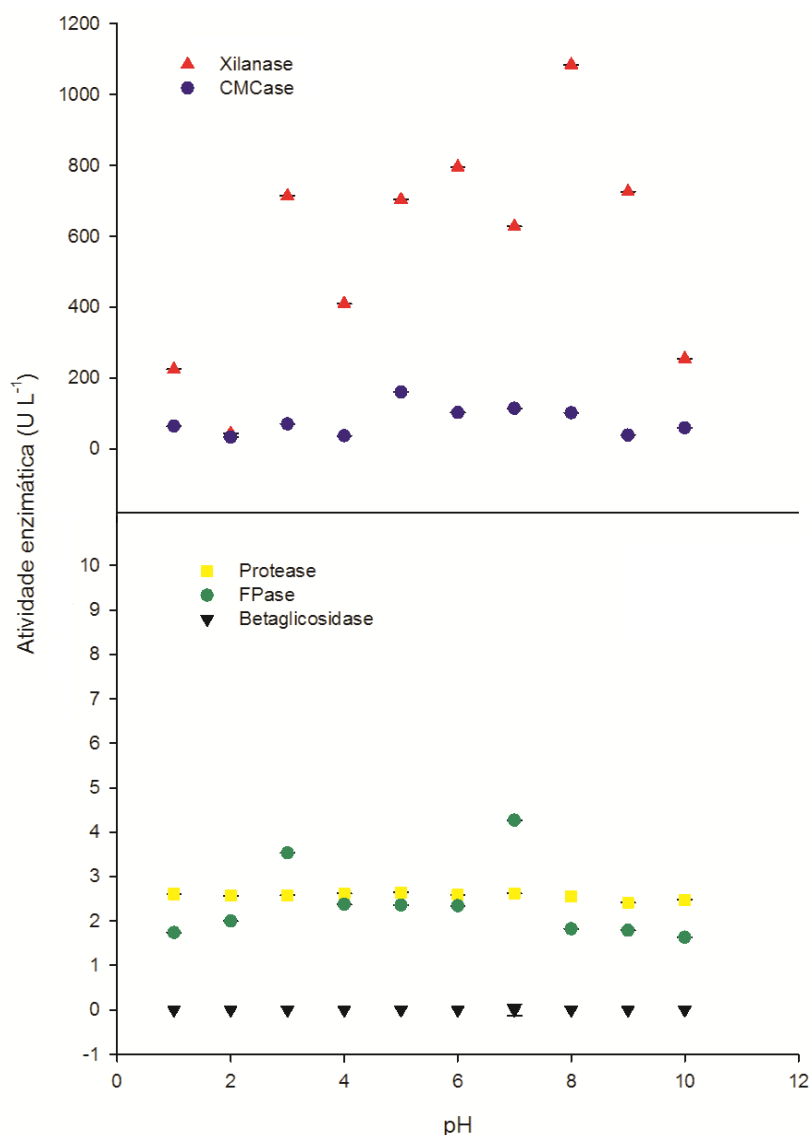


Figura 6 - Efeito do pH nas diferentes atividades enzimáticas presentes no coquetel enzimático, produzido pela comunidade microbiana celulolítica, a 50°C. Os valores representam as médias das três medições e as barras de erro indicam o desvio padrão.

Xilanase apresentou maior atividade em pH 8,0 mas sem diferença significativa na faixa de 5,0 a 9,0 (Tabela 4). CMCCase apresentou maior atividade em pH 5,0. A atividade máxima de xilanase em pH 8,0, obtida neste estudo, difere do obtido por Souza (2012), onde xilanase apresentou atividade máxima em pH 5,4 e por Yang et al. (2011), que encontrou pH ótimo igual a 6,0 para Xilanase. Souza (2012) e Yang et al. (2011) também encontraram maior atividade de CMCCase em pH 5,0. No entanto, há relatos de xilanases alcalifílicas, apresentando pH ótimo na faixa de 7,0-9,0, com atividade máxima em pH 8,0 (LV, YANG e YUAN, 2008) e, geralmente, endoglucanases não apresentam atividade em pH baixos

(ALMEIDA et al., 2013). FPase alcançou atividade máxima em pH 7,0, mas exibiu atividade com valor semelhante ao máximo na faixa de 3,0 a 7,0 e em pH 8,0 e 9,0 não ocorreram perdas significativas em sua atividade. FPase de *Aspergillus fumigatus* possui atividade máxima em pH 3,0 e 5,0 e pH mais elevados também não interferem significativamente em sua atividade, como os resultados obtidos neste estudo. A enzima β -glicosidase apresentou atividade apenas em pH 7,0. Porém, há alguns estudos que indicam uma faixa de pH de 4,0-6,0 como ótimo para atividade desta enzima (ANG et al., 2013; DESWAL, KHASA e KUHAD, 2011). Protease apresentou atividade máxima em pH 5,0, porém entre pH 1,0 e 7,0 os valores de atividade enzimática foram estatisticamente iguais.

Tabela 4. Valores médios (erro padrão) da medida de atividade enzimática em diferentes pH.

| pH | ¹ Médias das atividades enzimáticas (U L ⁻¹) | | | | |
|------|---|-------------|----------|------------|-----------------|
| | Xilanase | CMCase | Protease | FPase | Betaglicosidase |
| 1,0 | 249,0 a | 64,1 a b c | 2,60 c | 1,79 a b | 0 a |
| 2,0 | 47,0 a | 28,8 a | 2,57 c | 1,95 a b | 0 a |
| 3,0 | 692,2 b c | 82,3 a b c | 2,59 c | 3,47 b c | 0 a |
| 4,0 | 365,0 a b | 39,9 a b | 2,62 c | 2,32 a b c | 0 a |
| 5,0 | 712,7 b c | 161,1 d | 2,64 c | 2,45 a b c | 0 a |
| 6,0 | 702,5 b c | 102,5 b c d | 2,61 c | 2,67 a b c | 0 a |
| 7,0 | 633,0 b c | 107,3 c d | 2,62 c | 3,93 c | 0, 13 b |
| 8,0 | 994,3 c | 113,0 c d | 2,55 b c | 2,0 a b | 0 a |
| 9,0 | 656,0 b c | 39,3 a b | 2,42 a | 2,28 a b c | 0 a |
| 10,0 | 251,4 a | 55,5 a b c | 2,47 a b | 1,61 a | 0 a |

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de significância de 5%.

Um dos gargalos no processo de despolimerização industrial da fibra de celulose, entre muitos outros, é a resistência das enzimas utilizadas a uma ampla faixa de pH, que frequentemente varia durante esse processo. Nesse sentido, as celulasas de fungos são as mais aplicadas na indústria, por serem mais robustas, além de resistirem a extremos de pH e a altas temperaturas (JUTURU e WU, 2014). Neste estudo, as enzimas avaliadas apresentaram características muito próximas às características desejadas pela indústria, com tolerância a altas temperaturas (50 a 80°C) e resistência a uma faixa intermediária de pH (3,0 a 9,0).

A avaliação da estabilidade térmica das enzimas revelou que a xilanase, CMCase e FPase foram termoestáveis em todas as temperaturas analisadas, mantendo sua atividade quase inalterada ao longo dos 120 minutos de incubação (Figura 7A, B e C). A β -glicosidase apresentou termoestabilidade em todas as temperaturas até os primeiros 80 minutos e após

esse período não apresentou atividade (Figura 7D). A protease perdeu quase 50% da sua atividade após 40 minutos, a 40°C. E nas demais temperaturas não apresentou atividade.

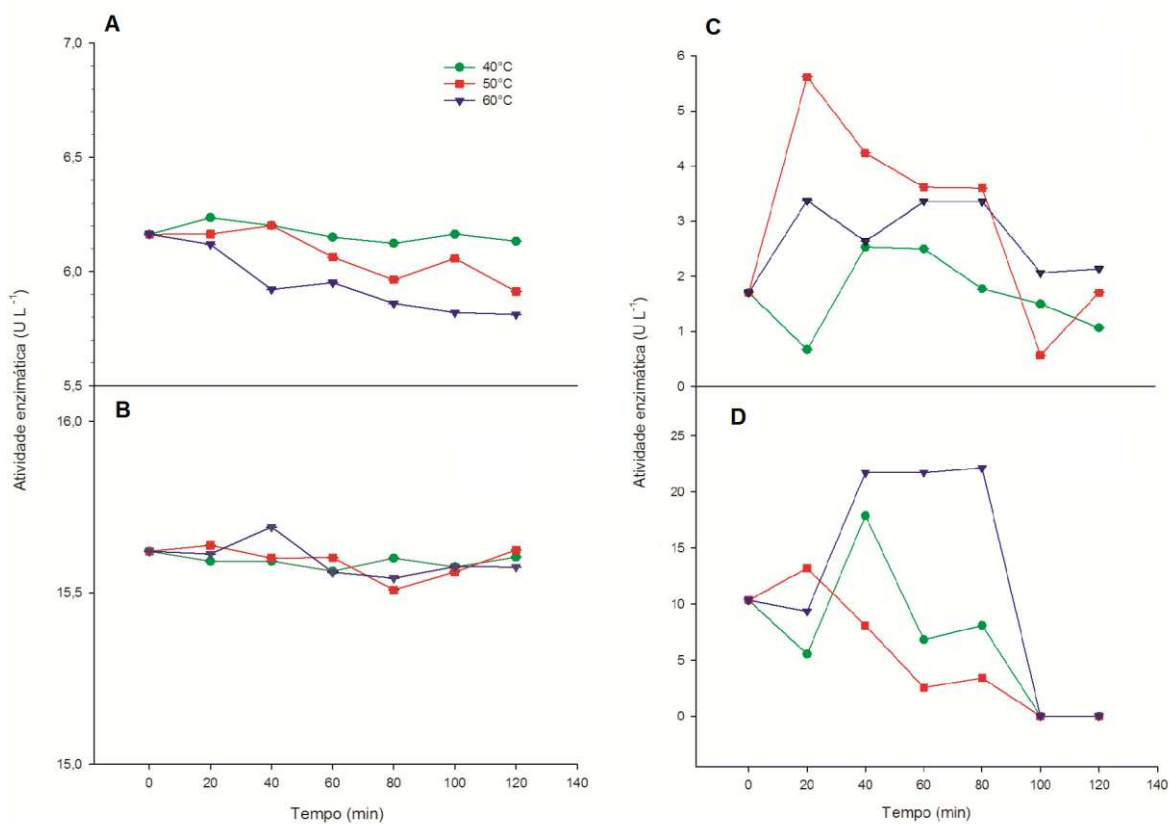


Figura 7 - Estabilidade térmica das diferentes atividades enzimáticas presentes no coquetel enzimático, produzido pela comunidade microbiana celulolítica, ao longo de 2h de incubação, na melhor temperatura e pH de cada atividade enzimática. Os ensaios foram realizados com intervalos de 20 minutos. A=Xilanase, B=CMCase, C=FPase e D=β-glicosidase . Os valores representam as médias das três medições e as barras de erro indicam o desvio padrão.

O teste de Tukey realizado para os ensaios de termoestabilidade revelaram que não houve diferenças significativas nos valores de atividades enzimáticas encontrados ao longo do tempo de incubação, nas diferentes temperaturas para cada enzima estudada (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios (erro padrão) das medidas das atividades enzimáticas em diferentes temperaturas ao longo de 2 horas.

| Tempo (min.) | ¹ Médias das atividades enzimáticas (U L ⁻¹) | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|-----------|-----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-----------------|----------|----------|
| | Xilanase | | | CMCase | | | FPase | | | Betaglicosidase | | |
| | 40°C | 50°C | 60° | 40°C | 50°C | 60° | 40°C | 50°C | 60° | 40°C | 50°C | 60° |
| 0 | 15,63 b | 15,63 c | 15,63 c d | 6,14 a | 6,14 b c | 6,14 d | 10,34 e | 10,34 a | 10,34 c | 1,85 a b | 1,85 a | 1,85 a |
| 20 | 15,60 a b | 15,63 c | 15,61 b c | 6,24 b | 6,16 c | 6,12 d | 5,53 b | | 9,36 b | 0,60 a | 5,53 c | 3,47 b |
| 40 | 15,58 a b | 15,60 b c | 15,68 d | 6,19 a b | 6,22 c | 5,91 b c | 17,88 f | | 21,72 d | 2,10 b | 4,23 b c | 2,66 a b |
| 60 | 15,56 a | 15,58 b c | 15,55 a b | 6,15 a | 6,08 b | 5,95 c | 6,81 c | | 21,72 d | 2,43 b | 3,30 b | 3,37 b |
| 80 | 15,58 a b | 15,50 a | 15,54 a | 6,14 a | 5,96 a | 5,89 b c | 8,09 d | | 22,14 e | 1,81 a b | 3,40 b | 3,39 b |
| 100 | 15,56 a | 15,56 a b | 15,57 a b | 6,18 a b | 6,08 b | 5,78 a | 0,00 a | | 0,00 a | 1,56 a b | 0,80 a | 2,06 a |
| 120 | 15,61 a b | 15,63 c | 15,56 a b | 6,13 a | 5,91 a | 5,81 a b | 0,00 a | | 0,00 a | 1,08 a b | 1,70 a | 2,13 a |

¹Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de significância de 5%.

De forma geral, as celulases e xilanases descritas na literatura apresentam boa estabilidade térmica (ALMEIDA et al., 2013; ANG et al., 2013; LV et al., 2008; LV, YANG e YUAN, 2008). De acordo com Haruta et al. (2002) a estabilidade térmica das enzimas celulolíticas em uma comunidade pode está relacionada com a coexistência de múltiplas espécies, tanto as que produzem celulase quanto as que não produzem. Do ponto de vista bioquímico, as razões para a estabilidade das celulases termófilas são: a existência de um núcleo protéico, com interior hidrofóbico; essas proteínas possuem uma estrutura compacta e rígida, devido ao elevado teor de prolina em sua constituição; não há nenhuma ou há poucas estruturas em *loop* na proteína; apresentam uma superfície altamente polar; possuem pequena razão superfície/volume; a presença de menos aminoácidos termolábeis; aumento nas pontes de hidrogênio, entre outras (LI, LI, e PAPAGEORGIU, 2011; TAYLOR e VAISMAN, 2010).

O alto custo da produção de enzimas é considerado outro gargalo da aplicação das celulases no processo de despolimerização da celulose, pois, é indispensável a superexpressão das celulases, uma vez que grandes volumes de enzimas são necessários nesses bioprocessos (JUTURU e WU, 2014). Desta forma, enzimas termoestáveis possuem uma enorme importância para indústria, pois, isto quer dizer que as enzimas possuem a capacidade de resistir a mudanças de temperatura em reatores e necessitam de uma menor frequência na sua reposição (ALMEIDA et al., 2013). As características das enzimas presentes no coquetel enzimático, produzido pela comunidade microbiana mista, satisfazem os pré-requisitos da indústria (tolerância a ampla faixa de pH e elevadas temperaturas e estabilidade térmica), exibindo potencial para aplicação em processos biotecnológicos, como a biorrefinaria.

4.4 Composição da comunidade microbiana mista e relações filogenéticas

Os conjuntos de primers utilizados geraram fragmentos com tamanhos em torno de 400 pb, tamanho requerido para a plataforma de sequenciamento utilizada neste estudo (GS-FLX 454- Roche ®). Assim, a maioria das sequências obtidas apresentou um tamanho aproximado de 400 pb. As sequências que apresentaram tamanhos inferiores a 300 pb foram descartadas. Dessa forma, foi obtido um total de 28 sequências ou OTU - unidades taxonômicas operacionais - que foram utilizadas nas análises posteriores.

A análise das OTU revelou que a comunidade microbiana mista é composta por bactérias micro-aerófilas, aerófilas, anaeróbias facultativas, bactérias do rúmen, espécie

patogênica e algumas bactérias não-cultiváveis, além de fungos filamentosos e diversos basidiomicetos.

A figura 8 mostra que o fungo *Ganoderma lucidum* apresentou a maior frequência relativa na comunidade (66%), seguido pela bactéria não cultivável *Ureibacillus* (11%) e pelas espécies de *Clostridium thermocellum* e *C. thermocellum* DSM 2360 que juntas somaram cerca de 11% de frequência relativa. *Aspergillus niger*, *Trepidimicrobium* não cultivável e *Gloeophyllum abietinum*, apareceram com 4,0, 3,0 e 2,0%, respectivamente. Enquanto as demais espécies de bactérias e fungos tiveram cerca de 1% de frequência cada.

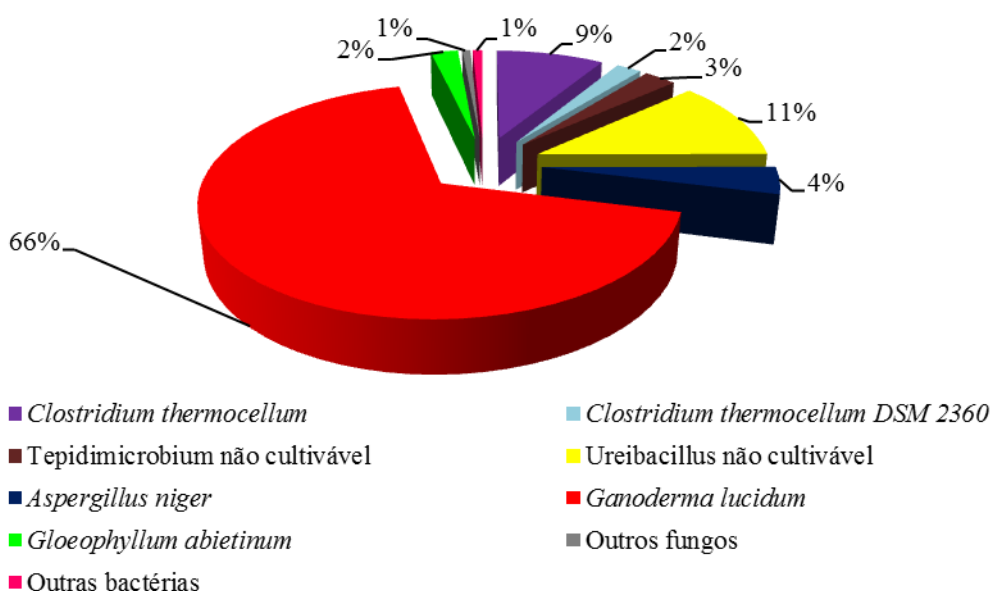


Figura 8 - Frequência relativa (%) de micro-organismos presentes na comunidade microbiana mista, com base no número de *reads* gerados durante o sequenciamento do DNA total da comunidade.

A maior frequência relativa de *G. lucidum* e *Ureibacillus* não cultivável pode significar que estes micro-organismos apresentam maior importância na despolimerização da biomassa vegetal por esta comunidade.

As árvores filogenéticas de bactérias e fungos foram construídas baseadas nas sequências do gene ribossomal. Todas as sequências obtidas apresentaram similaridade maior que 90%, com sequências conhecidas depositadas no GenBank. Algumas das sequências depositadas no GenBank foram utilizadas na construção das árvores, a fim de garantir uma análise filogenética mais segura.

Dezoito sequências diferentes do gene da subunidade menor do ribossomo (16S rRNA) foram obtidas, alinhadas e as relações filogenéticas foram determinadas (Figura 9). As

sequências obtidas ficaram agrupadas na árvore filogenética em dois filos: proteobactérias (gamaproteobactérias), com dois representantes apenas (*Pseudoxanthomonas taiwanensis* e *Klebsiella oxytoca*) e Firmicutes, com dezesseis membros. Firmicutes e proteobactérias são comumente encontrados em material vegetal em decomposição e no rúmen de animais ruminantes, o que indica a importância desses dois grupos no processo de degradação da lignocelulose (WANG et al., 2011).

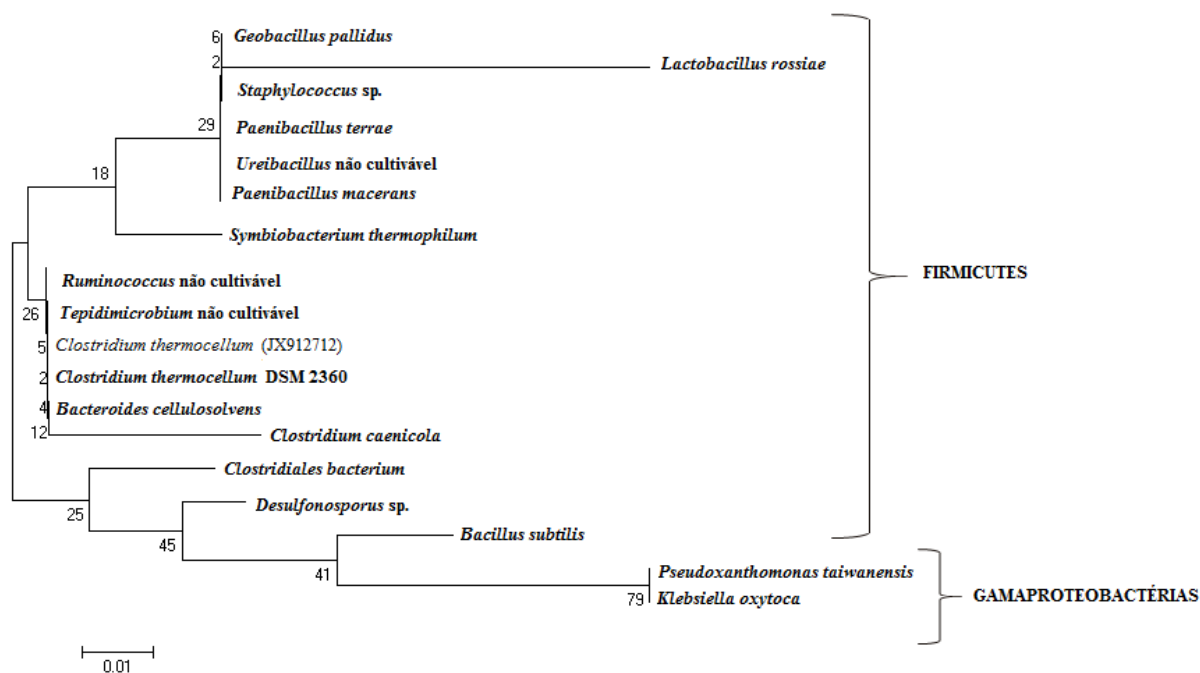


Figura 9 - Árvore filogenética derivada das sequências de genes 16S rRNA da comunidade microbiana mista, obtidas através do software MEGA 6.0, pelo método de *Neighbor-Joining* e *bootstrap* de 100.000 repetições. A barra de escala representa 1% de divergência entre as sequências de nucleotídeos. O código entre parênteses indica o número de acesso no GenBank.

Algumas bactérias do gênero *Clostridium* são frequentemente encontradas em estudos envolvendo degradação da lignocelulose, por secretarem celulases e xilanases. Um representante deste gênero, presente na comunidade mista, *C. thermocellum* é a bactéria celulolítica mais amplamente estudada, por apresentar a mais rápida taxa de utilização da celulose. *C. thermocellum* é capaz de hidrolizar a celulose e fermentar os açúcares resultantes simultaneamente, produzindo etanol (RONAN et al., 2013). *Paenibacillus* e *Ureibacillus*, assim como *Clostridium*, são bactérias termoestáveis. *Paenibacillus* apresenta a grande capacidade de degradação da xilana, pois secreta bem xilanases (ZHANG et al., 2013). *Ureibacillus* tem sido frequentemente encontrado em culturas enriquecidas com lignocelulose. Sua presença em uma comunidade indica, ainda, a presença de bactérias

anaeróbias. A coexistência de bactérias aeróbias e anaeróbias parece ser importante para degradação eficiente da lignocelulose e representa interações metabólicas complexas dentro de uma comunidade (WANG et al., 2011; WONGWILAIWALIN et al., 2010). Assim, é possível que a característica termofílica e os altos níveis de secreção de xilanase e celulases encontrados neste estudo sejam resultado da contribuição destas bactérias. Espécies de *Bacillus*, incluindo *B. subtilis*, são conhecidas por secretar ampla variedade de protease extracelular. Porém este grupo também secreta enzimas envolvidas na despolimerização da lignocelulose, como a β -glicosidase (SEPAHY e JABALAMELI, 2011; JUTURU e WU, 2014).

Bactérias não celulolíticas, como *C. caenicola* e *Geobacillus pallidus*, também foram encontradas na comunidade mista. Esses micro-organismos, embora não sejam celulolíticos, desempenham um papel importantíssimo na degradação da lignocelulose. Micro-organismos não celulolíticos podem utilizar produtos da hidrólise da celulose, como glicose e celobiose, não permitindo o acúmulo desses produtos no meio e, conseqüentemente, driblando a inibição catabólica das enzimas celulolíticas. Os não celulolíticos, ainda, podem consumir o oxigênio do meio, permitindo o crescimento dos micro-organismos anaeróbios e controlando o pH do meio (RONAN et al., 2013; WONGWILAIWALIN et al., 2010).

Dez sequências diferentes do gene da subunidade maior do ribossomo (28S rRNA) foram obtidas, alinhadas e uma árvore filogenética foi construída, mostrando a distribuição dos fungos em dois grandes grupos: os filos Basidiomycota com seis membros e Ascomycota com quatro membros (Figura 10). A maioria dos fungos que decompõe a biomassa vegetal pertence ao filo Basidiomycota, como os fungos da degradação branca e parda, incluindo *G. lucidum* (OHM, et al., 2014).

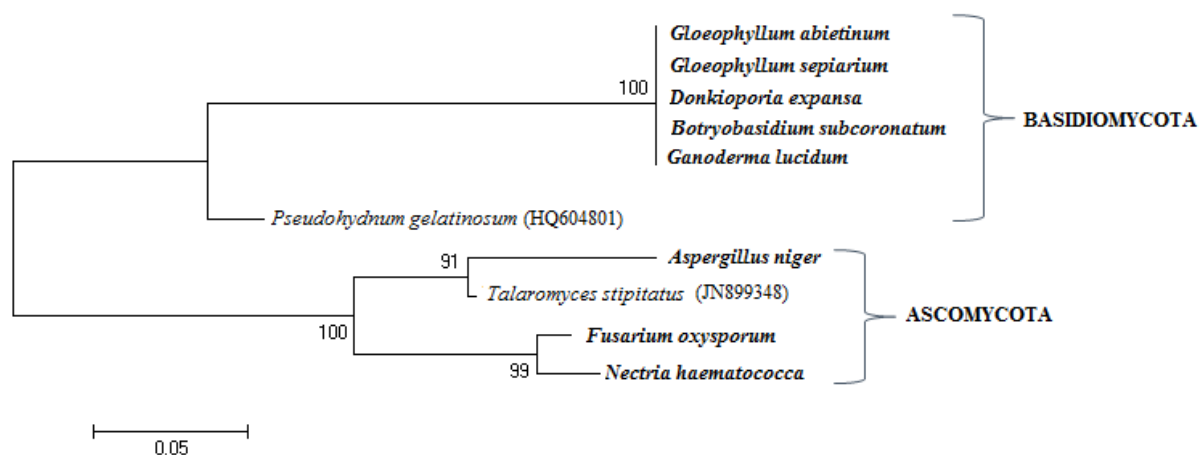


Figura 10 - Árvore filogenética derivada das sequências de genes 28S rRNA da comunidade microbiana mista, obtidas através do *software* MEGA 6.0, pelo método de *Neighbor-Joining* e *bootstrap* de 100.000 repetições. A barra de escala representa 5% de divergência entre as sequências de nucleotídeos. O código entre parênteses indica o número de acesso no GenBank.

Entre os fungos, que são conhecidos por possuírem complexos multi-enzimáticos envolvidos na hidrólise da lignocelulose, estão, principalmente, espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, e *Fusarium* (YANG, 2010). Neste estudo foram encontrados os fungos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*. O gênero *Aspergillus* possui a habilidade de secretar grandes quantidades de β -glicosidase, mas os níveis de produção de celulase total (FPase) encontrados em seu extrato enzimático são relativamente baixos, por isso frequentemente misturas de extratos enzimáticos de *Trichoderma* e *Aspergillus* são usadas (MANAVALANA et al., 2012). *F. oxysporum* se destaca entre os fungos por sua habilidade de realizar sacarificação e fermentação simultâneas da celulose, produzindo etanol (PANAGIOTOU et al., 2005).

A presença de várias espécies de basidiomicetos na comunidade pode está relacionada com o sucesso da comunidade no processo de degradação da biomassa vegetal, uma vez que a lignina altamente recalcitrante é predominantemente despolimerizada por estes fungos e o bagaço de cana utilizado nestes experimentos não passou por pré-tratamento. *G. lucidum* é um destes fungos. Em um estudo de análise do secretoma de *G. lucidum* cultivado em bagaço de cana foram identificadas diversas enzimas envolvidas na despolimerização da lignocelulose, incluindo celobiohidrolases, endoglucanases, β -glicosidase, endoxilanasas, exoglucanases, lacases e peroxidases (MANAVALANA et al., 2012). Em outros estudos, além destas enzimas, foram também encontradas no extrato enzimático secretado por *G. lucidum* β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase e acetil xilana esterase. Esses dados

somados a altíssima frequência relativa de *G. lucidum* na comunidade mista indicam que este fungo pode apresentar um papel central no processo de utilização da holocelulose como fonte de carbono para o crescimento desta comunidade.

5 CONCLUSÕES

A comunidade microbiana celulolítica utilizada neste estudo, cultivada em meio contendo celulose como única fonte de carbono, foi capaz de degradar totalmente a fita de papel filtro em apenas três dias de cultivo, a 50°C, pH 5,0 e sob condições estáticas de aeração. Durante sete dias de cultivo, nas condições citadas anteriormente, cinco atividades enzimáticas (CMCase, FPase, xilanase, β -glicosidase e protease) foram detectadas no extrato enzimático produzido pela comunidade. Essas enzimas detectadas no extrato enzimático são responsáveis pela degradação das maiores frações da lignocelulose (celulose e hemicelulose) presente na biomassa vegetal. Além disso, as enzimas apresentaram valores de atividade relativamente elevados em poucos dias de cultivo: xilanase 9,98 U mg⁻¹ e CMCase 2,0 U mg⁻¹ ambas no sexto dia de cultivo; FPase 0,6 U mg⁻¹ no quarto dia; β -glicosidase 0,36 U mg⁻¹ no terceiro e protease 0,05 U mg⁻¹ no primeiro dia.

Os ensaios de efeito do pH e temperatura sobre as atividades das enzimas encontradas revelaram que as maiores atividades enzimáticas ocorreram em pH 5,0, (CMCase e protease), 7,0 (FPase e β -glicosidase) e 8,0 (xilanase) e que as enzimas celulolíticas tem propriedades termofílicas, com maiores atividades em temperaturas elevadas (xilanase e CMCase a 70°C, FPase a 60°C, β -glicosidase a 50°C e Protease 40°C). Os ensaios de termoestabilidade revelaram que Xilanase, CMCase e FPase são termoestáveis em todas as temperaturas testadas (50, 60 e 70°C) ao longo de 2 horas de incubação. Enquanto que a β -glicosidase é termoestável nos 80 minutos iniciais de incubação em todas as temperaturas. E a protease é termosensível a 40°C, nos 40 minutos iniciais de incubação. De modo geral, as enzimas

presentes no coquetel enzimático, produzido pela comunidade microbiana mista, satisfazem os pré-requisitos da indústria (tolerância a ampla faixa de pH e elevadas temperaturas e estabilidade térmica), exibindo, assim, um potencial para aplicação industrial.

Com base nas sequências dos genes ribossomais 16 e 28S rRNA, obtidas através de pirosequenciamento do DNA total da comunidade microbiana celulolítica, foi observada uma elevada riqueza de espécies na comunidade, incluindo bactérias micro-aerófilas, aerófilas, anaeróbias facultativas, bactérias do rúmen, espécie patogênica e algumas bactérias não-cultiváveis, além de fungos filamentosos e diversos basidiomicetos. Estes micro-organismos foram agrupados em árvores filogenéticas, com base nas sequências dos genes 16 e 28S rRNA, que indicaram a predominância dos filos firmicutes e proteobactérias e dos filos basidiomicota e ascomicota, respectivamente. Uma análise da frequência relativa dos micro-organismos, com base no número de *reads* obtidos a partir do sequenciamento, mostrou que o fungo *Ganoderma lucidum* e a bactéria *Ureibacillus* não cultivável apresentaram a maior frequência relativa na comunidade, o que pode ser indício de que estes micro-organismos fornecem uma maior contribuição no processo de hidrólise da lignocelulose por esta comunidade.

As complexas interações metabólicas e ecológicas entre as multiespécies microbianas, presentes na comunidade microbiana mista certamente contribuiu para a eficiente despolimerização da lignocelulose nas condições estabelecidas neste estudo. No entanto, análises mais aprofundadas destas interações, a identificação e caracterização de micro-organismos chave para o sucesso na utilização da biomassa vegetal por essa comunidade devem ser realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; ACOSTA-MERCADO, D.; SOTOMAYOR-RAMÍREZ, D. e CRUZ-RODRIGUEZ, L. Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. **Applied Soil Ecology**, v. 38, p. 249-260, 2008.

ALMEIDA, M. N.; FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; RAMOS, H. J. O.; VISSER, E. M.; MAITAN-ALFENAS, G. P. e REZENDE, S. T. Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 413–422, 2013.

AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W. e DEVEREUX, R. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1919-1925, 1990.

ANDERSON, I. C. and CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 769-779, 2004.

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A. e MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293–1302, 2013.

ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. In: AZEVEDO, J. L. e ESPOSITO, E. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2 ed., p. 173-212, 2010.

AOI, Y. *In Situ* identification of microorganisms in biofilm communities. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 552-556, 2002.

ARANTES, V. e SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.

AWAFO, V. A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. Tese (Doutorado em Fisiologia) - McGill University, Canadá, 1997.

BAILEY, M. J.; BIELY, P. e POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BAYER, E. A. e LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, p. 171-188, 1992.

BHAT, M. K. e BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential Industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAAJAN, L. e HOODAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BEGUIN, P. e AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Review**, v. 13, p.25-58,1994.

BON, E. P. S.; GIRIO, F. e PEREIRA JR., N. Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Editores: Elba Bon e Luisa Corvo. Rio de Janeiro: Editora Interciencia, 2008. Capítulo 10, p. 241- 271.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CANTARELLA, M.; ALFANI, F.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A. e SAPOROSI, A. Biosaccharification of cellulosic biomass in immiscible solvent-water mixtures. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 11, p. 867-875, 2001.

CAO, Y. e TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CARVALHO, M. L. A. Optimisation of Cellulase Production by *Penicillium funiculosum* in a Stirred Tank Bioreactor Using Multivariate Response Surface Analysis. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

CASTRO, A. M. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celuliginina de Bagaço de Cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), 2009.

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

COLLINS, T.; GERDAY, C. e FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, p. 3-23, 2005.

COUGHLAN, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In: VISSER, J. (Ed). Xylan and Xylanases. **Elsevier**, Amsterdam, 1992.

DE LA TORRE, M. e CAMPILLO, C. C. Isolation and characterization of a symbiotic cellulolytic mixed bacterial culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.19, p. 430-434,1984.

DE PAULA, M. O.; TINOCO, I. F. F.; RODRIGUES, C. S.; SILVA, E. N. e SOUZA, C. F. Potencial a cinza do bagaço da cana-de-açúcar como material de substituição parcial de cimento Portland. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, p.353-357, 2009.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P e KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp.* RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v, 102, p. 6065-6072, 2011.

DILLON, A. Celulases. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 243-270, 2004.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.215-242, 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1986.

HARRISON, D. E. F. e WRENG, S. J. Mixed microbial cultures as a basis for future fermentation processes. **Process Biochemistry**, v. 11, p. 30-33, 1977.

HARUTA, S.; CUI, Z.; LI, M.; e IGARASHI, Y. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. **Applied Microbiology Biotechnology**, v; 59, p. 529-534, 2002.

HESHAM, A.; Z. WANG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, W. L. V. e M. YANG. Isolation and identification of a yeast strain capable of degrading four and five ring aromatic hydrocarbons. **Annals of Microbiology**, v. 56, p. 109-112, 2006.

HIGUCHI, T. **Experientia**, v. 38, p. 159, 1982. In: CASTRO, A. M. e PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

JÄNIS, J.; PULKKINEN, P.; ROUVINEN, J. e VAINIOTALO, P. Determination of steady-state kinetic parameters for a xylanase-catalyzed hydrolysis of neutral underivatized xylooligosaccharides by mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, p. 165-173, 2007.

JIANG, X.; GENG, A.; HE, N. e LI, Q. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, p. 121-127, 2011.

JUHASZ, T.; SZENGEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M. e VIIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

JUTURU, V. e WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.33, p. 188-203, 2014.

KALYANI, D.; LEE, K.; KIM, T.; LI, J.; DHIMAN, S. S.; KANG, Y. C. e LEE, J. Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. **Fuel**, v. 107, p.815-822, 2013.

KAUR, J.; CHADRA, B. S.; KUMAR, B. A. e SAINI, H. S. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology**, p. 74-81, 2007.

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L. e SSANDERS, J. P. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, 2009.

KUBICEK, C. P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R. L. e KUICEK-PRANZ, E. M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 90-99, 1993.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A. e RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, v. 23, p. 411-456, 1999.

KURTZMAN, C. P. e ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.

LI, D. C.; LI, A. N. e PAPAGEORGIOU, A. C. Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. **Enzyme Resource**, 2011.

LI, H.; XU, X.; CHEN, H.; XU, Y. Z. J.; WANG, J. e LU, X. Molecular analyses of the functional microbial community in composting by PCR-DGGE targeting the genes of the β -glucosidase. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 51-58, 2013.

LV, Z.; YANG, J.; WANG, E. e YUAN, H. Characterization of extracellular and substrate-bound cellulases from a mesophilic sugarcane bagasse-degrading microbial community. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1467-1472, 2008.

LYND, L. R.; WEIMER, P.; ZYL, W. H. V. e PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

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

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M. e PEREIRA JR., N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 38-44, 2013.

MANAVALANA, T.; MANAVALAN, A.; THANGAVELU, K. P. e HEESE, K. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. **Journal of proteomics**, v. 77, p. 298-309, 2012.

MAO, D.; ZHOU, Q.; CHEN, C. e QUAN, Z. Coverage evaluation of universal bacteria primers using the metagenomic datasets. **BMB microbiology**, v. 12, p. 2-8, 2012.

MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2005.

MILLER L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIERAMELLARA, G. e RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 665-670, 2003.

NARISAWA, N.; HARUTA, S.; CUI, Z. J.; ISHII, M. e IGARASHI, Y. Effect of Adding Cellulolytic Bacterium on Stable Cellulose-Degrading Microbial Community. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, p. 432-434, 2007.

NORKRANS, B. Cellulose and cellulolysis. **Applied Microbiology**, v.9, p. 91-130,1967.

OHM, R. A.; RILEY, R.; SALAMOV, A.; MIN, B.; CHOI, I. e GRIGORIEV, I. Genomics of wood-degrading fungi. **Fungal Genetics and Biology**, 2014.

PANAGIOTOUA, G.; CHRISTAKOPOULOS, P. e OLSSONA, L. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3—growth characteristics and metabolite profiling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 693-699, 2005.

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 38, p. 53, 1989.

PAULI, G. U. How to create more income, create more jobs and eliminate pollution. **Special advanced edition for the Third World Congress on Zero Emissions**, 1997.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G. e SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, p. 45, 2008.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N. e BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v.37, p.223-361, 1992.

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

RONAN, P.; YEUNG, C. W.; SCHELLENBERG, J.; SPARLING, R.; WOLFAARDT, G. M. e HAUSNER, M. A versatile and robust aerotolerant microbial community capable of cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 156–163, 2013.

RUBIN, E. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841–845, 2008.

SADHU, S.; GHOSH, P. K.; ADITYA, G. e MAITI, T. K. Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus* sp. (MTCC10046) isolated from cow dung. **Journal of King Saud University – Science**, v. 26, p. 323–332, 2014.

SEPAHYL, A. e JABALAMELI, L. Effect of Culture Conditions on the Production of an Extracellular Protease by *Bacillus* sp. Isolated from Soil Sample of Lavizan Jungle Park Abbas. **Enzyme Research**, p. 1-7, 2011.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C. e PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–508, 2013.

SMID, E. J. e LACROIX, C. Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 148-154, 2013.

SOLOMON, K. V.; HAITJEMA, C. H.; THOMPSON, D. A. e O'MALLEY, M. A. Extracting data from the muck: deriving biological insight from complex microbial communities and non-model organisms with next generation sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 28, p. 103–110, 2014.

SOUNDAR, S. e CHANDRA, T. S. Cellulose degradation by a mixed bacterial culture. **Journal of Industrial Microbiology**, v.2, p. 257-265, 1987.

SOUZA, R. A. Obtenção de inoculante e de coquetel enzimático lignocelulolítico a partir de comunidades microbianas termofílicas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2012.

STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 801-804, 2007.

STEVENSON, D. M. e WEIMER, P. J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, p. 165–174, 2007.

SUNNA, A. e ANTRANKIAN, G. Xylanolytic enzymes for fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 39-67, 1997.

TAYLOR, T. J. e VAISMAN, I. I. Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins. **BMC Structural Biology**, v.10, 2010.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N.; DE SOUZA JR., M. B. e PEREIRA JR., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 137-140, 2007.

VIOLOT, S.; AGHAJARI, N.; CZJZEK, M.; FELLER, G.; SONAN, G. K.; GOET, P. et al. Structure of a full length psychrophilic cellulose from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by x-ray diffraction and small angle x-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, p. 1211–24, 2005.

YANG, H. Y.; WU, H.; WANG, X.; CUI, Z. e LI, Y. Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3546-3550, 2011.

ZHANG, Y. H.; TIAN, M.; TANG, L.; LI, H.; LI, W.; ZHANG, J.; ZHANG, H. e MAO, Z. Exploration of the key microbes involved in the cellulolytic activity of a microbial consortium by serial dilution. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 395–400, 2013.

ZHANG, Y. H. P e LYND, L. R.; Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, p.797-824, 2004.

WANG, W.; YAN, L.; CUI, Z.; GAO, Y.; WANG, Y. e JING, R. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9321-9324, 2011.

WONGWILAIWALIN, S.; RATTANACHOMSRI, U.; LAOTHANACHAREON, T.; EURWILAICHITR, L.; IGARASHI, Y. e CHAMPREDA, V. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, p. 283–290, 2010.

WOOD, T. M. e MCRAE, S. T. Synergism between enzymes involved in the solubilization of the native cellulose. **Advances in Chemistry Series**, v. 18, p. 181-210, 1979.

APÊNDICE

Tabela 1. OTUs geradas durante o pirosequenciamento da comunidade microbiana mista.

| OTU | Micro-organismo | e-value | Similaridade (%) |
|-----------------|------------------------------------|----------------|-------------------------|
| IZ1RPV407IOQ1X | <i>Aspergillus niger</i> | 4E-177 | 96% |
| IZ1RPV407HYSJ6 | <i>Bacillus subtilis</i> | 1E-18 | 95% |
| IZ1RPV407IISTS | <i>Bacteroides cellulosolvens</i> | 5E-15 | 100% |
| IZ1RPV407H4KQY | <i>Botryobasidium subcoronatum</i> | 8E-41 | 97% |
| IZ1RPV407HXYZCZ | <i>Clostridiales bacterium</i> | 4E-38 | 88% |
| IZ1RPV407IBYDD | <i>Clostridium caenicola</i> | 7E-32 | 80% |
| IZ1RPV407IDEZ3 | <i>C. thermocellum</i> | 2E-50 | 100% |
| IZ1RPV407ISZDR | <i>C. thermocellum</i> DSM 2360 | 3E101 | 96% |
| IZ1RPV407ILH0Q | <i>Desulfonosporus</i> sp. | 6E-160 | 93% |
| IZ1RPV407HY43F | <i>Donkioporia expansa</i> | 4E-122 | 97% |
| IZ1RPV407IA90I | <i>Fusarium oxysporum</i> | 3E-163 | 94% |
| IZ1RPV407H5S2M | <i>Ganoderma lucidum</i> | 2E-126 | 98% |
| IZ1RPV407H1L1T | <i>Geobacillus pallidus</i> | 8E-164 | 96% |
| IZ1RPV407IOXGJ | <i>Gloeophyllum abietinum</i> | 9E-125 | 97% |
| IZ1RPV407ILKX3 | <i>G. sepiarium</i> | 1E-124 | 97% |
| IZ1RPV407H0SF2 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2E-134 | 94% |
| IZ1RPV407IJJNY | <i>Lactobacillus rossiae</i> | 3E-11 | 100% |
| IZ1RPV407IL3RM | <i>Nectria haematococca</i> | 1E-167 | 97% |
| IZ1RPV407IRPB9 | <i>Paenibacillus macerans</i> | 2E-52 | 91% |

continua

| | | | |
|-----------------|--------------------------------------|--------|------|
| IZ1RPV407IPR14 | <i>P. terrae</i> | 5E-17 | 100% |
| IZ1RPV407IPF84 | <i>Pseudohydnum gelatinosum</i> | 2E-100 | 97% |
| IZ1RPV407IGNUR | <i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> | 6E-67 | 96% |
| IZ1RPV407HYDJE | Ruminococcus não cultivável | 2E-12 | 100% |
| IZ1RPV407IJOZ0 | Staphylococcus não cultivável | 2E-15 | 100% |
| IZ1RPV407IQT VX | <i>Symbiobacterium thermophilum</i> | 2E-170 | 95% |
| IZ1RPV407H6OZC | <i>Talaromyces stipitatus</i> | 4E-18 | 95% |
| IZ1RPV407HYABW | Tepidimicrobium não cultivável | 8E-108 | 93% |
| IZ1RPV407HXJYV | <i>Ureibacillus</i> não cultivável | 1E-171 | 94% |
