

ROBSON DE ASSIS SOUZA

**OBTENÇÃO DE INOCULANTE E DE COQUETEL ENZIMÁTICO
LIGNOCELULOLÍTICO A PARTIR DE COMUNIDADES MICROBIANAS
TERMOFÍLICAS**

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
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S729o
2012

Souza, Robson de Assis, 1985-
Obtenção de inoculante e de coquetel enzimático
lignocelulolítico a partir de comunidades microbianas
termofílicas / Robson de Assis Souza. – Viçosa, MG, 2012.
xii, 56f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Flávia Maria Lopes Passos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 44-53

1. Microorganismos. 2. Enzimas microbianas.
3. Resíduos agrícolas. 4. Celulase. 5. Bagaço de cana.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579

ROBSON DE ASSIS SOUZA

**OBTENÇÃO DE INOCULANTE E DE COQUETEL ENZIMÁTICO
LIGNOCELULOLÍTICO A PARTIR DE COMUNIDADES MICROBIANAS
TERMOFÍLICAS**

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: 17 de fevereiro de 2012.

Valéria Monteze Guimarães

Wendel Batista da Silveira
(Coorientador)

Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

A Deus.
Aos meus pais, José e Regina.
À minha irmã, Claudiane.
À minha namorada, Karina.
À memória de meus avôs, Antônio e Gabriel.

*“Well it is going to fight with determination, embrace life and live with passion.
Lose with class and win with boldness, because the victory belongs to those
who dare more and life is much to be insignificant.”*

Charlie Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), por me abrir as portas de seus laboratórios e permitir a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À Usina Jatiboca, por fornecer o bagaço de cana.

À Professora Flávia Maria Lopes Passos, pela orientação em seu sentido mais amplo, além da amizade, paciência, incentivo, confiança e sábias palavras de otimismo.

Aos Professores Hilário Cuquetto Mantovani, Maria Catarina Megumi Kasuya e Wendel Batista da Silveira, pelas valiosas sugestões.

À Professora Valéria Monteze Guimarães pelo pronto aceite em compor a banca e contribuição ao trabalho.

À minha família, por todo amor, educação e apoio sempre recebidos. O homem que sou hoje, devo a vocês.

À Karina, meu amor, pelo incentivo, paciência, companheirismo, cumplicidade e valiosa ajuda na execução deste trabalho.

Ao Marcus e Danielle, pela acolhida em minha chegada à Viçosa.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos,

Professor Galvão, Dra. Virgínia, Valdilene, Lygia, Raphael Hermano, Lívia, Caio, Cristiane, Kamila, Rafael, Priscila, Luna e João Antônio, pela amizade, descontração e contribuições para este trabalho.

Ao Victor, Paulo, Júlio e Naylor, pela contribuição durante as análises moleculares.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

À Nilcéa, secretária do Programa de Pós-Graduação, pela boa vontade e cooperação na realização da primeira matrícula, e aos demais funcionários do departamento, pelos serviços prestados.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela convivência.

Aos companheiros de república, pelo excelente convívio.

À Dona Tita, pelo exemplo de simplicidade, humildade e amor desinteressado.

Aos que acreditaram que eu havia tomado a decisão certa e me apoiaram.

A todos os “Rosalvos” desse país, que mesmo iletrados, acreditam na Educação e na Ciência como caminho para se construir um Brasil mais justo e soberano.

Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Robson de Assis Souza, filho de José Garcia de Souza e Regina Coeli de Assis Souza, nasceu em 14 de novembro de 1985, na cidade de Campo Belo, Minas Gerais.

Iniciou o curso de Ciências Biológicas, em agosto de 2004, na Universidade Federal de Minas Gerais, no qual se graduou Bacharel com ênfase em Microbiologia em 22 de agosto de 2008.

Em março de 2010, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação em 17 de fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Meio de cultura	11
3.1.1. Preparo do bagaço	11
3.2. Fonte de inóculo	12
3.3. Seleção do consórcio microbiano	12
3.4. Determinação do dia de máxima atividade enzimática	13
3.5. Determinação da atividade enzimática	13
3.5.1 Atividade Carboximetilcelulase (CMCase)	13
3.5.2. Xilanase	14
3.5.3. Lacase e peroxidase	15
3.6. Determinação da proteína total	15
3.7. Batelada alimentada	15
3.8. Efeito do congelamento rápido na expressão das enzimas pela comunidade microbiana	16
3.9. Preparação do extrato enzimático bruto	16
3.10. Estabilidade de CMCase e xilanase na preparação enzimática	17

3.11. Efeito da temperatura na atividade CMCase e xilanase.....	17
3.12. Efeito do pH na atividade CMCase e xilanase	17
3.13. Análise da diversidade microbiana presente nas três comunidades selecionadas	17
3.13.1. Extração do DNA total	17
3.13.2. Amplificação do gene 16S rRNA	18
3.13.3. Amplificação do gene 18S rRNA	18
3.13.4. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	19
3.13.5. Análise de grupos do DGGE <i>fingerprints</i>	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Habilidade das comunidades microbianas de decompor celulose	21
4.2. Determinação do dia de maior produção das enzimas lignocelulolíticas pelas comunidades microbianas	23
4.3. Cultivo da comunidade mista em regime de batelada alimentada	26
4.4. Efeito do congelamento rápido na expressão das enzimas pela comunidade microbiana	28
4.5. Concentração do coquetel enzimático e estabilidade das enzimas na preparação enzimática	30
4.6. Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática	34
4.7. Composição das comunidades microbianas selecionadas	36
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
APÊNDICE.....	54

RESUMO

SOUZA, Robson de Assis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Obtenção de inoculante e de coquetel enzimático lignocelulolítico a partir de comunidades microbianas termofílicas.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani, Maria Catarina Megumi Kasuya e Wendel Batista da Silveira.

Três comunidades microbianas lignocelulolíticas e termofílicas foram selecionadas por subcultivo em meio de enriquecimento a 55 °C. Uma comunidade foi selecionada a partir de esterco de gado em compostagem, outra de bagaço de cana em decomposição e a terceira foi obtida a partir da mistura de alíquotas do meio de cultivo das duas anteriores. Tais comunidades apresentavam a característica de decompor uma fita de celulose em três dias de cultivo. Ao se avaliar o dia de máxima atividade CMCase e xilanase em cada comunidade, verificou-se que os melhores resultados foram encontrados no consórcio misto, com atividade de 0,09 U mg⁻¹ para CMCase no segundo dia de cultivo e 2,86 U mg⁻¹ para xilanase no quarto dia. Essas enzimas foram parcialmente caracterizadas em relação à temperatura e pH ótimos de atuação. Verificou-se que CMCase apresentou maior atividade a 60 °C e pH 5,4, e manteve 80% de sua atividade numa faixa de pH de 4,5 a 6,5. Já para a xilanase, a temperatura ótima foi de 65 °C e nessa mesma faixa de pH manteve uma atividade residual de 97%. O extrato livre de células foi concentrado por ultrafiltração e obteve-se um coquetel enzimático com atividade de CMCase e xilanase maior que no extrato bruto cerca de 25 e 55 vezes, respectivamente. O coquetel foi conservado pela adição de 50% de glicerol. Após 60 dias de armazenamento a 4 °C, a xilanase manteve 80% de sua atividade inicial e a CMCase não apresentou perda de atividade quando mantida a 25 °C pelo

mesmo período. A massa celular da comunidade mista constitui um inoculante capaz de manter o fenótipo celulolítico após congelamento rápido e armazenamento a - 80 °C por 60 dias. Ensaio em batelada alimentada mostrou que essa comunidade apresenta potencial para ser manipulada a fim de se manter continuamente a expressão de enzimas celulolíticas ao longo do tempo. Os resultados mostraram que foi possível obter um coquetel de enzimas a partir do inoculante, cuja atividade celulolítica tolerou variações de pH e temperatura ótima em torno de 60 °C.

ABSTRACT

SOUZA, Robson de Assis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Acquisition of an inoculant and a lignocellulolytic enzymatic cocktail from thermophilic microbial communities.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani, Maria Catarina Megumi Kasuya and Wendel Batista da Silveira.

Three thermophilic lignocellulolytic microbial communities were selected by enriched method with continual subcultivation at 55 °C. One community was selected from cow manure compost, another from decaying sugar cane bagasse, and the last one was obtained by mixing aliquots of the culture suspension from the first two. Those communities were able to degrade a cellulosic strip in three cultivation days. Evaluating the maximal day of CMC_{ase} and xylanase activity, it was observed that the mixed consortium showed the best results, with CMC_{ase} activity of 0.09 U mg⁻¹ at the second day of cultivation, and xylanase activity of 2.86 U mg⁻¹ at the fourth day. These enzymes were partially characterized with relation to temperature and pH of optimal activity. It was observed that CMC_{ase} showed the highest activity at 60 °C and pH 5.4, and kept 80% of its activity in a pH range of 4.5-6.5. On the other hand, the best activity for xylanase was verified at 65 °C, and in that same pH range, the enzyme kept 97% of its residual activity. Cell-free extract was concentrated by ultrafiltration. The enzymatic cocktail obtained showed CMC_{ase} activity 25-fold higher and xylanase activity 55-fold higher than the crude enzymatic extract. The cocktail was conserved by adding 50% glycerol. After storage for 60 days at 4 °C, xylanase kept 80% of the initial activity and CMC_{ase} didn't show loss of activity when kept at 25 °C for the same period. The mixed community cellular mass constitutes an inoculant able to maintain the cellulolytic phenotype after rapid freezing and

storage at - 80 °C for 60 days. Fed-batch essay suggested that this community has potential to be manipulated in order to continuously hold the cellulolytic enzymes expression over time. The results evidenced the acquisition of an enzymatic cocktail from an inoculant which cellulolytic activity supported pH changes and optimal activity around 60 °C.

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 80% de toda energia utilizada no mundo é obtida a partir de combustíveis fósseis. Por representarem uma fonte finita, além de poluente, a produção de bioenergia a partir de fontes alternativas e renováveis surge como uma possibilidade para substituição desses combustíveis.

O etanol, por exemplo, produzido a partir da cana-de-açúcar, teve sua produção intensificada no Brasil na década de 1970, ganhou projeção internacional e é hoje considerado um substituto para a gasolina, colocando o país em uma posição favorável em se tratando de segurança energética.

No entanto, somente um terço de toda energia armazenada na planta, a qual corresponde aos açúcares solúveis, é de fato convertida a etanol, pois os outros dois terços estão nas folhas e bagaço, considerados resíduos da produção. Estes resíduos são constituídos basicamente pela parede celular vegetal, formada por microfibrilas de celulose, hemicelulose e lignina.

Os constituintes destes polímeros podem ser transformados em produtos de alto valor agregado, gerando poucos resíduos e emissões mínimas de poluentes. Como exemplo, a produção de substâncias anti-chamas ou fibras de alta resistência a partir da lignina, resinas e solventes a partir da porção hemicelulósica e biocombustíveis como etanol e iso-butanol a partir da celulose. Mas para que esta conversão ocorra, estes polímeros precisam ter sua estrutura desfeita para que os monômeros que os constituem possam ser aproveitados.

Independente do produto final, qualquer processo de conversão da

biomassa lignocelulósica requer a redução da recalcitrância e cristalinidade, além da despolimerização das fibras vegetais, obtidas a partir da desconstrução da parede celular por processos físico-químicos ou biológicos. O processo biológico, que envolve hidrólise enzimática, é preferido por resultar em maiores taxas de conversão dos polímeros em seus monômeros constituintes e ausência de subprodutos tóxicos que comprometam a etapa seguinte de fermentação. Além disso, os processos físico-químicos geram grandes volumes de resíduos poluentes.

Na natureza, a degradação da biomassa lignocelulósica ocorre pela ação de enzimas de comunidades microbianas presentes nos mais diversos ecossistemas, por exemplo, madeira em decomposição e esterco de gado em compostagem. Dessa forma, estes ambientes representam potenciais fontes destes micro-organismos produtores de enzimas para hidrólise da biomassa de origem vegetal.

Lacase e peroxidase são enzimas que hidrolisam lignina, geralmente sintetizadas por fungos decompositores de madeiras, conhecidos como fungos da podridão branca. Já celulasas e xilanasas, enzimas que despolimerizam a celulose e a hemicelulose, respectivamente, podem ser produzidas por fungos, bem como por bactérias.

A produção de enzimas lignocelulolíticas é útil no processamento de biomassa lignocelulósica nas emergentes biorrefinarias, unidades industriais detentoras de tecnologias sustentáveis para a geração de produtos e energia comercializáveis. Contudo, em escala industrial, a hidrólise enzimática ainda apresenta limitações técnicas e econômicas. Por isso, estudos continuam sendo realizados no sentido de melhorar os métodos de obtenção e aumentar a atividade das enzimas para os diversos substratos lignocelulósicos disponíveis. A formulação de um preparado com mais de uma atividade enzimática visa atender a demanda da indústria de biotransformação. Nesse sentido, o presente trabalho objetiva reproduzir, em laboratório, um inoculante constituído de comunidades microbianas provenientes de ambientes naturais bem como a partir do mesmo, produzir um coquetel enzimático com propriedades de hidrolisar biomassa lignocelulósica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Desde o início da civilização, o homem tem buscado fontes de energia a fim de suprir suas necessidades básicas como alimentação, aquecimento e abrigo. Dentre os recursos utilizados estavam o próprio sol, o vento, a água, a madeira, as culturas agrícolas, a tração animal, entre outros (SOLOMON & KRISHNA, 2011). No entanto, devido a vários fatores como escassez local do recurso, conveniência, poluição, inovação tecnológica, custos, qualidade da energia e armazenamento, a transição de uma fonte de energia por outra é um fenômeno natural que ocorreu algumas vezes ao longo da História (BASHMAKOV, 2007).

Foi o que aconteceu no início do século XVIII com a Revolução Industrial. Após quase dois séculos, os combustíveis fósseis superaram as outras formas de combustíveis e se tornaram a principal fonte de energia no mundo. Atualmente, o petróleo corresponde a cerca de 80% da matriz energética mundial (FOUQUET, 2010). Contudo, mantendo-se constantes sua produção e consumo, os combustíveis fósseis não podem ser considerados a principal fonte de energia do mundo por mais que duas ou três gerações. Além do problema da depleção, o uso deste recurso gera problemas ambientais, como os relacionados às mudanças climáticas. Finalmente, a segurança energética é outro ponto que tem chamado atenção, principalmente pelo fato de grande parte da produção de petróleo do mundo estar localizada em regiões instáveis politicamente (GOLDEMBERG, 2007).

Ao se deparar com as mudanças climáticas, o aumento da escassez e do preço do petróleo, a comunidade mundial é compelida à mudança para

um sistema energético mais sustentável assim como a um melhor gerenciamento da oferta e demanda energética. Por isso, o desenvolvimento de combustíveis a partir de fontes renováveis, denominados biocombustíveis, tem sido incentivado em todo o mundo (LUO *et al.*, 2009).

Neste contexto, o etanol produzido a partir de produtos agrícolas representa uma alternativa em relação ao uso de gasolina. Ele pode ser misturado à gasolina ou usado como combustível puro, por apresentar um elevado índice de octanagem e um alto ponto de vaporização (CHEN & QIU, 2010). Do ponto de vista ambiental, o uso do etanol como combustível é vantajoso, pois este não apresenta as impurezas encontradas nos derivados do petróleo, tais como os óxidos de enxofre e particulados, que são as principais fontes de poluição nos grandes centros metropolitanos. Além disso, se lavouras e práticas agrícolas adequadas forem adotadas, o etanol reduz a emissão de gases causadores do efeito estufa, por permitir a reciclagem do carbono na atmosfera (GOLDEMBERG, 2007).

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar foi intensificada no Brasil em meados da década de 1970, quando o governo federal criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) para substituir a gasolina (BRASIL, 1975). O objetivo do programa era reduzir a dependência brasileira de petróleo, principalmente em períodos de grande instabilidade política e econômica mundial, como aconteceu em 1973 com o embargo imposto pela Organização dos Países Exportadores de Petróleo ao petróleo arábico (SOLOMON *et al.*, 2007). Com a criação do Proálcool, os estudos agrícolas e tecnológicos foram incentivados, levando o país a uma posição muito favorável em termos de segurança energética (SOCCOL *et al.*, 2010).

Apesar de propiciar as condições para se obter um alto rendimento de produção de etanol por fornecer um caldo contendo quase 20% (p/v) de açúcares totais redutores, somente um terço da biomassa da cana-de-açúcar é destinado à produção de bioenergia. As duas partes não aproveitadas, uma corresponde ao bagaço e o restante, à palha e pontas da planta que são perdidas durante a queima realizada para a colheita (SOCCOL *et al.*, 2010). A colheita mecanizada da cana-de-açúcar e a proibição das queimadas serão implementadas até o ano de 2014, para terrenos com até 12% de declividade, nos estados de São Paulo e Minas

Gerais, dois dos maiores produtores de cana-de-açúcar do país (SÃO PAULO, 2007; MINAS GERAIS, 2008). Com isso, as palhas, atualmente queimadas, serão uma matéria-prima de fácil acesso. E o bagaço, outra parte da cana-de-açúcar não aproveitada para a produção de etanol, subproduto da indústria sucro-alcooleira, é considerado uma matéria-prima barata e abundante. Cerca de 270 kg de bagaço são gerados para cada tonelada de cana colhida (BAUDEL *et al.*, 2005). Parte desta quantidade é suficiente para suprir as caldeiras das usinas e o remanescente pode ser usado, não só para a produção de etanol de segunda geração, mas também de outros produtos com valor agregado.

Essa biomassa lignocelulósica, que não é convertida em bioenergia, corresponde à parede celular da planta. Esta estrutura desempenha importante papel na determinação da integridade estrutural da planta e na defesa contra patógenos e insetos. Sua estrutura, configuração e composição dependem do tipo da planta, tecido, idade, tipo celular e varia também dentro de cada camada (STICKLEN, 2008).

A biomassa lignocelulósica é um dos recursos biológicos renováveis mais abundantes no planeta e, quando comparada com outras matérias-primas (petróleo, gás natural e óleos vegetais) é também a mais barata baseando-se no conteúdo energético. Enquanto que para o petróleo os preços variam de US\$ 7,10 a US\$ 14,20 por gigajoule (GJ) de energia armazenada, a matéria-prima lignocelulósica apresenta um custo máximo de US\$ 3,00 por GJ (ZHANG, 2008). Considerando que no Brasil, o bagaço e as palhas da cana são resíduos agroindustriais, esse valor seria ainda menor.

A estrutura da biomassa lignocelulósica, apresentada na figura 1, é composta por celulose (homopolissacarídeo composto por unidades de β -D-glicopiranoose, unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), no qual a celobiose é a menor unidade repetitiva e pode ser convertida em resíduos de glicose), hemicelulose (um polímero heterogêneo formado por pentoses, tais como D-xilose e D-arabinose, hexoses, como D-manose, D-glicose e D-galactose e ácidos de açúcares) e lignina (uma complexa estrutura polifenólica). A cana-de-açúcar apresenta em sua composição cerca de 45% de celulose, 35% de hemicelulose, 11% de lignina e 9% de cinzas e outras substâncias (SONG &

WEI, 2010). Estima-se que o aproveitamento dessa biomassa possa levar a um aumento da produção de etanol em torno de 50% (RABELO *et al.*, 2010).

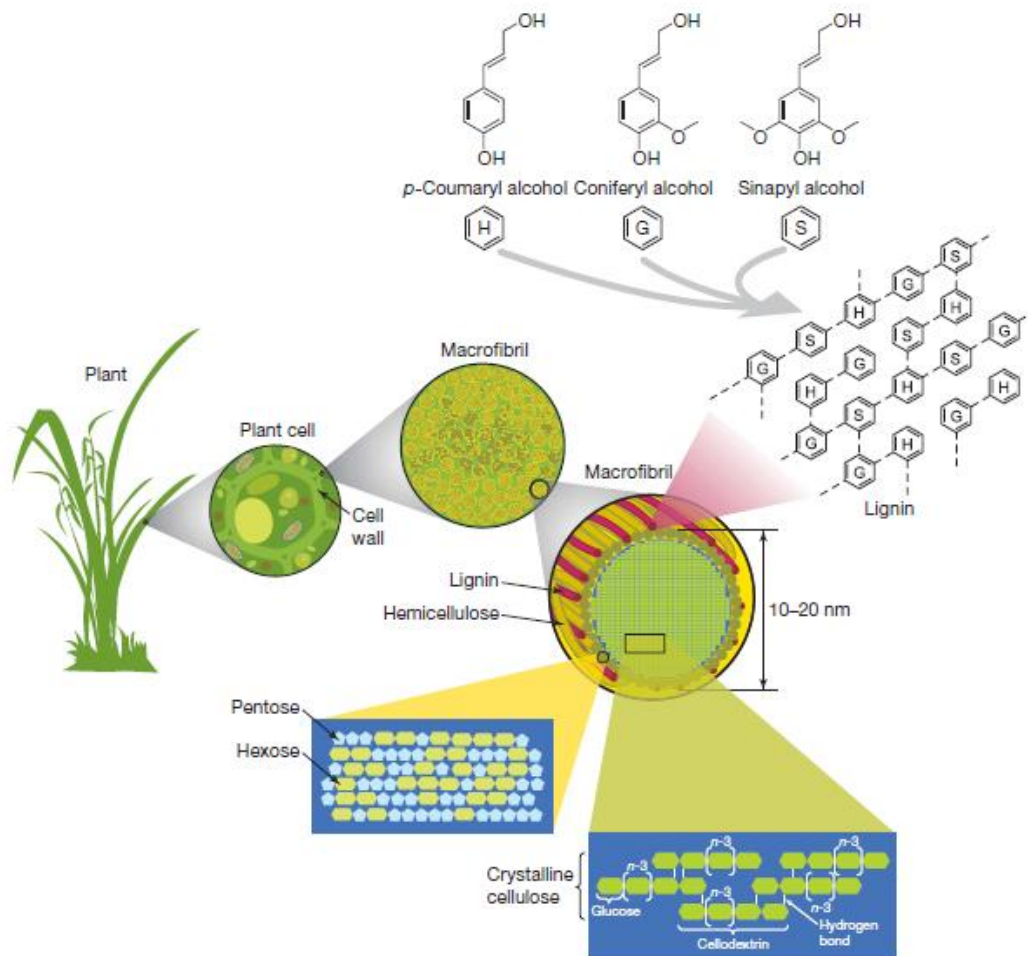


Figura 1. Estrutura da biomassa lignocelulósica. Fonte: Rubin, 2008.

O aproveitamento da biomassa vegetal a partir do fracionamento em seus monômeros constituintes (carboidratos, proteínas, triglicérides, entre outros) para que possam ser convertidos em produtos com valor agregado, como biocombustíveis e químicos, é definido como biorrefinaria. Este termo abrange uma ampla variedade de tecnologias, incluindo seus processos e equipamentos, ligados ao setor de transformação (CHERUBINI, 2010). O conceito de biorrefinaria é análogo ao de uma refinaria de petróleo, a qual produz vários combustíveis e outros produtos a partir do petróleo.

No entanto, devido à sua estrutura química, o material lignocelulósico é muito resistente à bioconversão. A celulose e a hemicelulose estão fortemente associados à lignina e este complexo estrutural cristalino impõe

grande resistência à degradação química ou biológica (HIMMEL *et al.*, 2007). Portanto, o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos requer um processo de conversão, o qual é dividido em três etapas principais. A primeira delas, o pré-tratamento, que pode ser tanto físico, químico ou biológico, é a etapa na qual a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica é convertida em intermediários mais propensos à despolimerização. A segunda etapa, denominada hidrólise, que pode ser da natureza química ou enzimática, é responsável pela despolimerização dos intermediários reativos em açúcares fermentáveis. E finalmente a fermentação, processo pelo qual são produzidos o etanol ou outros químicos pela ação de micro-organismos (CAMASSOLA & DILLON, 2009).

Há décadas, vários estudos buscam estabelecer um processo eficiente de hidrólise dos polímeros encontrados na biomassa lignocelulósica (BALAT, 2011). Diante das duas possibilidades existentes, a hidrólise ácida é eficiente e relativamente barata, mas gera produtos que inibem a fermentação. Além disso, se as condições de operação (temperatura e concentração do ácido) não forem rigidamente controladas, a degradação do produto final pode ocorrer. Devido à especificidade das enzimas, a hidrólise enzimática é considerada mais vantajosa do que a ácida, pois, os produtos finais não são degradados, o que representa maior rendimento de conversão. Além disso, a hidrólise enzimática é considerada uma metodologia mais limpa, pelo fato de gerar menos resíduos poluentes (EL-ZAWAWY *et al.*, 2011).

Apesar de não se saber exatamente quantas enzimas estão envolvidas na desconstrução da parede celular vegetal, três categorias de enzimas são consideradas necessárias: celulases, hemicelulases e enzimas acessórias envolvidas na degradação da lignina (RUBIN, 2008).

As celulases, enzimas que hidrolisam o polímero de celulose, são divididas em três grandes grupos: endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases. Como representantes desses grupos, encontra-se, respectivamente, endo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.4), a qual cliva ligações glicosídicas no interior do polímero; exo-1,4- β -glicano celobio hidrolase (EC 3.2.1.91), que libera unidades de celobiosil das extremidades do polímero de

celulose; β -D-glicosidase (EC 3.2.1.21), que por sua vez libera unidades de glicose de celooligossacarídeos (KUMAR *et al.*, 2008).

O conjunto das hemicelulases é mais variado, entre as quais se encontra enzimas que atuam na cadeia principal do polímero de hemicelulose, como endo-1,4- β -D-xilanase (EC 3.2.1.8), que cliva as ligações internas da cadeia de xilana e β -xilosidase (EC 3.2.1.37), a qual cliva as ligações dos xilooligossacarídeos para liberar xilose. Além delas também se encontra α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.131), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e acetil-xilana-esterase (EC 3.1.1.72) que atuam na clivagem das cadeias laterais (CARVALHO *et al.*, 2009).

Por sua vez, as enzimas envolvidas na degradação da lignina podem ser agrupadas em duas classes distintas: fenoloxidasas e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. Entre as fenoloxidasas pode-se ainda identificar dois subgrupos: enzimas dependentes de peróxido, como lignina peroxidase (EC 1.11.1.7) e manganês peroxidase (EC 1.11.1.13), e enzimas não-dependentes de peróxido, como a lacase (EC 1.10.3.2) (MAJEAU *et al.*, 2010).

Essas enzimas são produzidas naturalmente por uma gama de espécies microbianas. Diversos gêneros de bactérias e fungos já foram relatados como produtores de enzimas lignocelulolíticas, tanto em aerobiose (KAUSAR *et al.*, 2010) quanto em anaerobiose (HARUTA *et al.*, 2002). Entre os gêneros bacterianos produtores de celulases pode-se citar *Pseudomonas* (CHENG & CHANG, 2011), *Bacillus* (TRIVEDI *et al.*, 2011), *Ruminococcus* (NTAIKOU *et al.*, 2009) e *Clostridium* (ALAHUHTA, *et al.*, 2010). Entre os fungos, a expressão destas enzimas pode ocorrer em *Trichoderma* (AHAMED & VERMETTE, 2008), *Penicillium* (CAMASSOLA & DILON, 2009) e *Fomitopsis* (DESWAL *et al.*, 2011), entre outros. A expressão de hemicelulases, por exemplo, já foi relatada em *Clostridium* (RANI & NAND, 2000), *Streptomyces* (TECHAPUN *et al.*, 2002) e *Bacillus* (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2000), além dos fungos *Trichoderma* (LIU *et al.*, 2006), *Acremonium* (HIDENO *et al.*, 2011) e *Aspergillus* (NCUBE *et al.*, 2012), entre tantos outros. No entanto, a produção de enzimas relacionadas com a degradação da lignina, como lacases, é atribuída aos fungos da podridão

branca, principalmente ao gênero *Pleurotus* (YOUN *et al.*, 1995; FONSECA *et al.*, 2010).

Esses e vários outros micro-organismos, muitos dos quais ainda nem identificados, atuam de forma co-operativa na degradação da biomassa lignocelulósica, permitindo assim, o ciclo do carbono na biosfera. Tentativas de utilizar co-culturas de micro-organismos conhecidos para a biodegradação da biomassa vegetal baseando-se em suas relações metabólicas já foram feitas. No entanto, a biodegradação é tão complexa que a co-operação metabólica não é a única relação envolvida (GENG *et al.*, 2010). Esse sinergismo encontrado na natureza não pode ser completamente reconstruído pela simples mistura de micro-organismos previamente estabelecidos.

Por isso o uso de comunidades microbianas naturais na biodegradação da biomassa vegetal foi proposta como uma abordagem eficiente para aplicação biotecnológica, uma vez que se evita os problemas de regulação por retroalimentação e repressão catabólica, fenômenos que geralmente acontecem em isolados de uma única espécie (WONGWILAIWALIN *et al.*, 2010). E para se obter tais comunidades com características específicas, a técnica de cultura de enriquecimento tem se mostrado uma ferramenta interessante. Comunidades obtidas com essa técnica apresentam uma composição mais próxima daquelas que atuam na natureza (NICHOLS *et al.*, 2008).

Como a produção de enzimas lignocelulolíticas é um processo oneroso (STICKLEN, 2008), métodos menos dispendiosos para sua produção ajudariam a viabilizar a produção em larga escala de etanol de segunda geração ou outras substâncias químicas a partir de resíduos agroindustriais, como bagaço e palha de cana-de-açúcar. Assim, o cultivo de comunidades microbianas é um procedimento no qual é possível obter grande diversidade de enzimas lignocelulolíticas. Os extratos enzimáticos brutos, obtidos diretamente do meio de cultivo dessas comunidades, são inclusive considerados mais eficientes para a hidrólise do que as enzimas purificadas (MAI *et al.*, 2004). Além disso, como os materiais lignocelulósicos apresentam diferenças em sua composição, é desejável que esses

coquetéis enzimáticos apresentem propriedades adequadas para cada tipo de matéria-prima (ALVIRA *et al.*, 2010).

Desta forma, há o interesse de se obter um sistema misto de enzimas com atividade lignocelulolítica a partir de comunidades microbianas naturais. Este sistema atuará como uma valiosa plataforma para estudos das interações enzimáticas produzidas por várias espécies microbianas, além de possuir uma potencial aplicação biotecnológica na conversão deste tipo de biomassa na promissora indústria da biorrefinaria.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meio de cultura

Os experimentos destinados a promover o crescimento de comunidades microbianas lignocelulolíticas, foram conduzidos no meio de enriquecimento Solução Peptona-Celulose (PCS) acrescida de 1% (p/v) de bagaço de cana de açúcar conforme proposto por Wongwilaiwalin *et al.* (2010). O bagaço passou por um preparo prévio, conforme descrito a seguir. A PCS é composta por 0,1% (p/v) de extrato de levedura, 0,5% (p/v) de peptona, 0,5% (p/v) CaCO₃, 0,5% (p/v) NaCl e pH 7,7. Além disso, foi adicionada uma tira de papel filtro Whatman[®] n° 1 (General Electric Company, CT, EUA) de 2,0 x 7,0 cm como indicador da ação de celulases.

3.1.1. Preparo do bagaço

Cerca de 10 kg de bagaço, resultantes da moagem da cana-de-açúcar para retirada do caldo para produção de açúcar e álcool, foram coletados no pátio da Usina Jatiboca (Urucânia/MG). A fim de se reduzir o efeito da sacarose na seleção dos micro-organismos, todo o bagaço foi lavado três vezes em água corrente, cozido em água fervente por 30 minutos e lavado por mais três vezes em água corrente. Em seguida, o bagaço foi seco em estufa a 60 °C por 120 horas (SONG & WEI, 2010), para posterior utilização na formulação do meio de cultura.

3.2. Fonte de inóculo

Duas fontes de inóculos foram investigados: esterco de gado e resíduo de bagaço no campo. O esterco de gado, em fase termofílica de compostagem que se encontrava a temperatura de 65 °C, foi coletado próximo ao estábulo do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa e transportado em caixa térmica para o laboratório a fim de ser utilizado como inóculo.

Uma porção de bagaço de cana-de-açúcar moído foi coletada na região central de uma pilha de bagaço deixados nos campos da Usina Jatiboca, na qual a temperatura se encontrava a 55 °C. Este material foi acondicionado em caixa térmica e transportado para o laboratório assepticamente, onde se realizaram as inoculações.

3.3. Seleção do consórcio microbiano

Cada um dos dois inóculos (esterco e bagaço de cana) foi adicionado separadamente, em três frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio PCS. Os frascos foram incubados em BOD a 55 °C em condições estáticas de aeração (HARUTA *et al.*, 2002). Os cultivos foram observados diariamente e ao se verificar a degradação da fita de papel, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um novo frasco com o mesmo meio esterilizado.

Este regime de batelada sequencial foi repetido por 10 vezes a fim de se determinar em qual frasco o tempo de degradação da fita era menor. Um frasco com a comunidade microbiana oriunda do esterco e outro com comunidade proveniente do bagaço foram escolhido e os demais frascos foram descartados. Essas duas comunidades foram denominadas Comunidade do Esterco e Comunidade do Bagaço, respectivamente. Uma terceira comunidade, denominada Mista, foi obtida a partir da mistura de alíquotas de 1,0 mL de cada cultivo escolhido em um novo frasco com meio esterilizado com o intuito de se obter uma comunidade microbiana com a habilidade de decompor a fita de papel com grande eficiência.

O cultivo em batelada sequencial foi mantido para as três comunidades.

3.4. Determinação do dia de máxima atividade enzimática

Ao longo de sete dias do cultivo em batelada, foram coletados diariamente 5,0 mL do meio em suspensão. Este material foi centrifugado a 12.000 *g* por 5 minutos e o sobrenadante (denominado extrato bruto) foi utilizado para determinação da atividade das enzimas extracelulares. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5. Determinação da atividade enzimática

3.5.1 Atividade Carboximetilcelulase (CMCase)

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

A mistura reacional foi adaptada de Ghose (1987). Cada tubo de reação continha 750 μ L da solução de substrato, que era composta por carboximetilcelulose (CMC) na proporção de 1% (p/v) em solução tampão citrato-fosfato 0,2 M, pH 5,0, e 250 μ L 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 μ L desta mistura foram transferidos para outro tubo de ensaio contendo 500 μ L de DNS. Este tubo foi incubado em banho fervente por 5 minutos com posterior adição de 3,5 mL de água destilada. A cor desenvolvida é proporcional à quantidade de açúcar redutor presente no meio e a absorbância da mistura é medida sob o comprimento de onda de 540 nm. A absorbância do tempo inicial da reação (T_0) foi medida a partir de um tubo com 750 μ L 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 μ L da solução foram transferidos para outro tubo já contendo 500 μ L de DNS e receberam o mesmo tratamento dos tubos de T_f . Os procedimentos

descritos para determinação da absorbância no T_f e T_0 constituem o ensaio padrão para determinação da atividade CMCase.

O ensaio controle foi realizado conforme o ensaio padrão, porém o extrato bruto foi previamente fervido por 5 minutos. No branco da reação, o extrato bruto foi substituído pelo mesmo volume da solução tampão citrato-fosfato 0,2 M, 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 de proteína presente no extrato bruto nas condições descritas (U mg^{-1}).

3.5.2. Xilanase

A atividade de xilanase também foi determinada por método espectrofotométrico a partir da liberação de açúcares redutores e reação com DNS.

A mistura reacional foi adaptada a partir do proposto por Bailey *et al.* (1992) e como substrato foi utilizado 750 μL de uma solução de xilana *birchwood* 1% (p/v) em tampão citrato-fosfato 0,2 M, pH 5,0. Da diluição adequada do extrato bruto, foram utilizados 250 μL para a realização do ensaio enzimático. 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, foram adicionados 10 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 . 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 de proteína presente no extrato bruto nas condições descritas (U mg^{-1}).

3.5.3. Lacase e peroxidase

Para se determinar a atividade das enzimas lacase e peroxidase, primeiramente foi determinada a oxidação total de 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-sulfonato (ABTS) em reação contendo a diluição adequada da enzima em solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,03% do substrato e 0,05 mL 2,0 mM H₂O₂. A oxidação do ABTS foi medida monitorando-se o aumento da absorbância a 420 nm, após 2 horas de incubação a 39 °C. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto por miligrama de proteína presente no extrato bruto, considerando o valor de extinção molar para o ABTS totalmente oxidado como sendo de $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUSWELL *et al.*, 1995). A concentração do substrato oxidado foi calculada a partir da Equação de Lambert-Beer.

A atividade da lacase foi determinada como descrito para a oxidação total do ABTS usando água destilada ao invés de peróxido de hidrogênio. Já a atividade da peroxidase foi calculada como sendo a diferença entre os valores obtidos para a oxidação total do ABTS e a atividade da lacase.

3.6. Determinação da proteína total

A quantidade de proteína presente no sobrenadante da cultura foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Bradford (1976), sob o comprimento de onda de 595 nm e usando uma curva padrão de albumina de soro bovino (concentração variando de 2,5 a 20 μg mL⁻¹).

3.7. Batelada alimentada

A comunidade mista foi cultivada em 300 mL do meio PCS nas condições já descritas. Ao se verificar a degradação da fita de papel, no terceiro dia, uma alíquota de 10 mL passou a ser retirada diariamente do cultivo e em contrapartida, outros 10 mL de meio esterilizado eram adicionados. O perfil da atividade das enzimas lignocelulolíticas foi acompanhado ao longo de 10 dias de cultivo.

3.8. Efeito do congelamento rápido na expressão das enzimas pela comunidade microbiana

Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas da cultura mista, no terceiro dia de cultivo em batelada, colocadas em tubos de microcentrífuga de mesmo volume e centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o material decantado foi ressuspenso em 800 µL de PCS sem bagaço e fita de papel. Em seguida, adicionou-se 200 µL de glicerol com posterior homogeneização. Os frascos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos, em *ultrafreezer*, a - 80 °C. Após 30 e 60 dias de estocagem, a massa celular congelada foi transferida para um Erlenmeyer contendo 100 mL do mesmo meio, incubado a 55 °C em condições estáticas de aeração, e a atividade das enzimas lignocelulolíticas foi determinada, como descrito, ao longo de sete dias.

3.9. Preparação do extrato enzimático bruto

A comunidade mista foi cultivada em 500 mL do meio PCS nas condições já descritas. Ao se verificar a degradação da fita de papel, toda a cultura foi coletada e centrifugada por duas vezes a 8.000 g por 10 minutos. 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 com auxílio da bomba de vácuo. Após estas etapas, foi obtido um volume de 390 mL de extrato bruto, o qual foi concentrado por ultrafiltração. O processo foi realizado usando-se uma célula de ultrafiltração, sob pressão de 1,08 atm em uma câmara a 18 °C sob constante agitação. Foram utilizadas membranas de celulose regenerada com limite nominal de peso molecular de 3.000 Da (Millipore, MA, EUA). A atividade das enzimas lignocelulolíticas e a concentração de proteínas foram determinadas nas frações concentrada e filtrada.

3.10. Estabilidade de CMCase e xilanase na preparação enzimática

Ao extrato enzimático concentrado, foi adicionado glicerol na proporção de 50% e a estabilidade das enzimas celulolíticas foi avaliada após 10, 20, 30, 45 e 60 dias de estocagem a - 80 °C, - 20 °C, 4 °C e 25 °C. A atividade enzimática foi determinada conforme descrição anterior, com a exceção de serem usadas duplicatas, e não triplicatas, da mistura de reação. As médias das atividades enzimáticas determinadas após o armazenamento foram comparadas em relação ao valor encontrado no concentrado enzimático pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

3.11. Efeito da temperatura na atividade CMCase e xilanase

O efeito da temperatura na atividade CMCase e xilanase foi determinado na faixa de 20 °C a 80 °C. Os ensaios foram realizados conforme o ensaio padrão. As atividades enzimáticas foi medida no sobrenadante da comunidade mista no terceiro dia de cultivo em batelada.

3.12. Efeito do pH na atividade CMCase e xilanase

O efeito do pH na atividade CMCase e xilanase foi determinado na faixa de 4,0 a 7,0 em solução tampão citrato-fosfato 0,2 M. No ensaio da primeira atividade enzimática, a temperatura de incubação foi de 60 °C e no da segunda, 65 °C. Estas temperaturas foram definidas com base no ensaio anterior. A atividade enzimática foi medida no sobrenadante da Comunidade Mista no terceiro dia de um cultivo em batelada. Salvo essas alterações, a atividade enzimática foi determinada conforme o ensaio padrão.

3.13. Análise da diversidade microbiana presente nas três comunidades selecionadas

3.13.1. Extração do DNA total

Um volume de 10 mL do cultivo de cada uma das três comunidades

microbianas foi centrifugado e o material decantado, ressuspendido em 300 μ L de água. A partir das suspensões, foi feita a extração do DNA total de cada amostra usando o *kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep*[®] (Zymo Research Corporation, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

3.13.2. Amplificação do gene 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA foi obtida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os *primers* universais para o domínio *Bacteria*, F984-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') e R1378 (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'). Um dos *primers* apresenta um grampo GC (sequencia sublinhada) a fim de se obter uma eficiente separação na eletroforese em gel com gradiente desnaturante. A reação, que foi feita em um volume total de 25 μ L, apresentava as seguintes proporções dos reagentes: 20 ng de DNA, tampão de reação *GoTaq*[®] *Green* 1X (1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3) (Promega Corporation, WI, EUA), 0,2 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 3,75 mM MgCl₂, 5% (v/v) de formamida, 2,5 ng de BSA, 0,2 μ M de cada *primer* e 2 U/ μ L de *GoTaq*[®] DNA polimerase (Promega Corporation, WI, EUA). A reação de PCR iniciou-se com uma etapa de desnaturação inicial a 93 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos termais de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 minutos (HEUER *et al.*, 1997). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2 % (p/v), corados com *GelRed*[®] (Biotium Corporate, CA, EUA) e visualizados em luz ultravioleta (UV).

3.13.3. Amplificação do gene 18S rRNA

A amplificação por PCR foi realizada em duas etapas. A primeira foi realizada usando a combinação dos *primers* NS1 *forward* (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') e EF3 *reverse* (5'-TCC TCT AAA TGA CCA AGT TTG-3'). A reação foi realizada em um volume de 25 μ L que continha,

aproximadamente, 15 ng de DNA, tampão de reação *GoTaq*[®] *Green* 1X (1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3), 0,2 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 3,75 mM MgCl₂, 0,2 μM de cada *primer* e 2 U/ μL de *GoTaq*[®] DNA polimerase. A reação incluía um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos termais de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 47 °C e 3 minutos 72 °C e um passo de extensão final a 72 °C por 10 minutos (OROS-SICHLER *et al.*, 2006).

Os amplicons da primeira reação foram diluídos e usados como molde para a segunda reação. Nesta reação também foi utilizado outro par de *primers*, sendo eles o FF390 (5'-CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3') e o FR1-GC (5'-CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GGG GCG GGG GCA CCG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T-3'). A sequência sublinhada correspondente ao grampo GC. A reação também foi realizada em 25 μL seguindo as mesmas proporções dos reagentes usados para a primeira. No início da segunda reação também houve um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclo termais de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 72 °C e um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos (VAINIO & HANTULA, 2000). Os amplicons foram analisados da mesma forma que os do gene 16S rRNA.

3.13.4. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os fragmentos com as sequências do gene 16S rRNA foram analisadas no *DCode*[®] *Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Monique, Alemanha) usando um gel de 7,5 % (p/v) de acrilamida/bisacrilamida na proporção de (37,5:1). O gradiente desnaturante utilizado foi a faixa de 35 % a 55 %, no qual 100 % de desnaturação corresponde a uma solução de ureia 7 M e 40 % de formamida deionizada. A eletroforese se desenvolveu em solução tampão TAE 1x (40 mM Tris/Acetato, pH 8; 1 mM EDTA) em uma temperatura constante de 60 °C por 20 horas sob uma diferença de potencial de 70 V. Os fragmentos foram visualizados sob iluminação por luz ultravioleta após a adição do agente intercalante *GelRed*[®].

Os fragmentos com as sequências do gene 18S rRNA foram

analisados da mesma forma como descrito acima, com a diferença de que o gradiente desnaturante do gel correspondia a faixa de 40 % a 60 %.

3.13.5. Análise de grupos do DGGE *fingerprints*

A análise das comunidades bacterianas e fúngicas presentes nos cultivos através do DGGE *fingerprints* foram realizadas com o *software BioNumerics*[®] (Applied Maths, Ghent, Bélgica) de acordo com as instruções do fornecedor. O fundo da imagem foi removido e as canaletas foram normalizadas. Os dendogramas obtidos foram baseados nos índices de correlação de Pearson para cada par de canaletas no gel. A análise de grupo foi realizada pelo método de pareamento em grupos não ponderados usando médias aritméticas (UPGMA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Habilidade das comunidades microbianas de decompor celulose

A estratégia adotada nesse trabalho, envolvendo enriquecimento de culturas obtidas de esterco em compostagem e bagaço de cana-de-açúcar em fase de deterioração, foi capaz de selecionar consórcios microbianos termofílicos com a habilidade de decompor a biomassa lignocelulósica. Conforme já alertado, por exemplo, por CHENG *et al.* (2009), o processo de degradação da biomassa na natureza é complexo e envolve a ação sinérgica de vários micro-organismos, sinergismo este que não pode ser completamente reconstituído pela simples mistura de micro-organismos conhecidos em laboratório.

Três comunidades selecionadas neste trabalho foram capazes de decompor a fita de celulose, em três dias de cultivo em meio PCS, incubadas a 55 °C em condições estáticas de aeração.

A figura 2 ilustra a degradação da fita de papel filtro pela Comunidade Mista prevalecente ao longo de três dias de cultivo. Uma fita controle (A), no mesmo meio esterilizado, foi incubada nas mesmas condições que os demais. O mesmo resultado também foi observado para comunidades microbianas provenientes do esterco e do bagaço de cana. No primeiro dia de cultivo observou-se que a fita permaneceu íntegra (B), mas a partir do segundo dia (C), observou-se que o manuseio da mesma já se tornou difícil, pois ela se desfaz facilmente. O resíduo remanescente que ainda sobra da fita, é totalmente degradado ao final do terceiro dia (D).

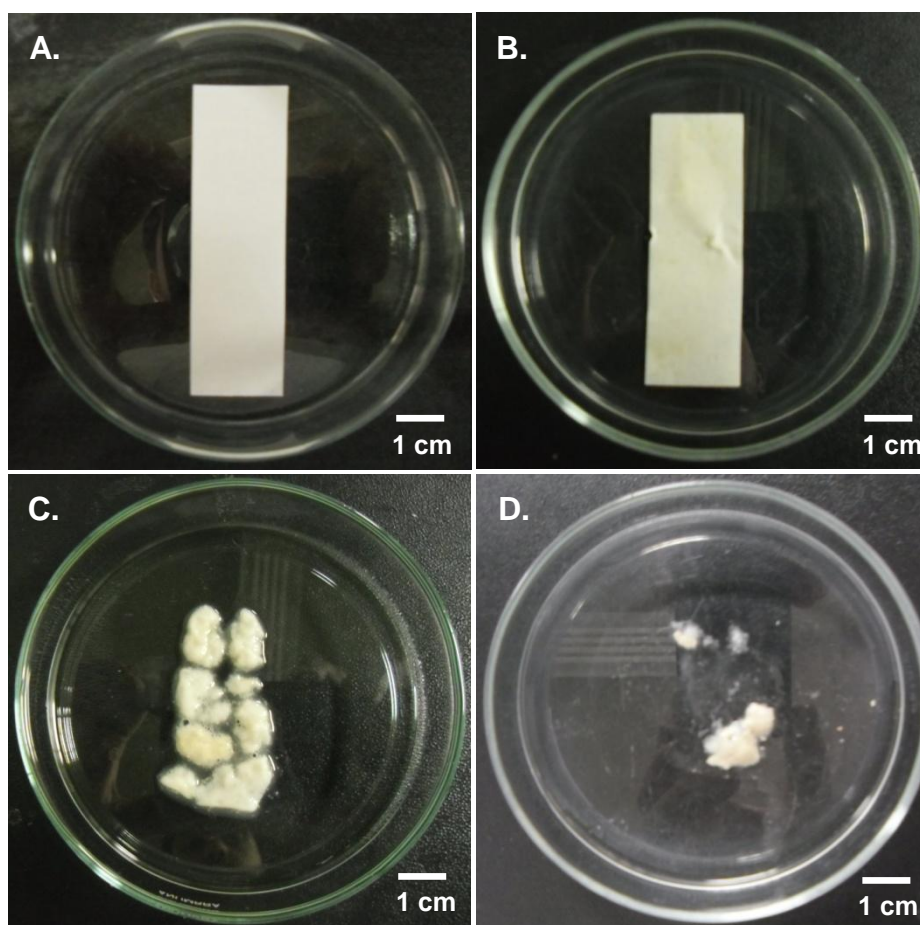


Figura 2. Degradação da fita de papel filtro pela comunidade mista. Fita controle (A). Fita ainda íntegra no primeiro dia do cultivo (B). Fita, no segundo dia do cultivo, já parcialmente degradada (C). Fita, no terceiro de cultivo, prestes a se decompor totalmente (D).

Feng *et al.* (2011), trabalhando com dois consórcios microbianos selecionados a partir de solo de bosques na China, observaram que os consórcios degradaram a fita de papel em um tempo maior em relação ao observado neste trabalho. Com incubação por oito dias a 40 °C, verificaram uma degradação em torno de 50% para uma comunidade e próximo a 80% para a outra.

Já Wongwilaiwalin *et al.* (2010) verificaram que a comunidade microbiana selecionada a partir de fezes de aves, suínos e bovinos, foi capaz de degradar cerca de 50% do papel com um dia a menos, mas com incubação a 50 °C. Haruta *et al.* (2002), selecionaram um consórcio microbiano também a partir de fezes de animais que a 50 °C, degradou em torno de 50% da fita de papel em quatro dias.

No entanto, ao se trabalhar com comunidades microbianas

selecionadas a partir de ambientes naturais, nos quais a degradação lignocelulósica ocorre pela ação conjunta de enzimas de diferentes microorganismos, o desejável é que a degradação da fita de papel, que não apresenta a mesma recalcitrância das fibras vegetais, ocorra em um prazo menor (WANG *et al.*, 2011). As três comunidades selecionadas neste trabalho atendem a este requisito, uma vez que todas foram capazes de consumir a fita no período de três dias de cultivo.

4.2. Determinação do dia de maior produção das enzimas lignocelulolíticas pelas comunidades microbianas

Nos três consórcios microbianos selecionados, as enzimas lacase e peroxidase não tiveram sua atividade detectada. A atividade da xilanase foi maior do que a atividade da CMCase em todos os cultivos. Como a estratégia de seleção microbiana foi baseada no tempo de degradação da fita de papel, a qual apresenta composição celulósica, a expressão das enzimas lacase e peroxidase pode não ter sido favorecida ou pode não ter ocorrido no período avaliado.

A atividade CMCase, ao longo do tempo nas três comunidades, é apresentada na figura 3. A comunidade proveniente do bagaço apresentou valores crescentes de atividade dessa enzima ao longo do tempo, com tendência de se estabilizar após o sexto dia de cultivo. No entanto, a máxima atividade enzimática ($0,07 \text{ U mg}^{-1}$) foi inferior aos valores apresentados pelas outras duas comunidades. Na comunidade proveniente do esterco, o perfil de atividade enzimática foi diferente, apresentando máximo no quarto dia ($0,10 \text{ U mg}^{-1}$) e decaindo nos dias subsequentes. Já na comunidade mista, foi observada uma tendência semelhante à apresentada pela comunidade do esterco. No entanto, o máximo de atividade ($0,09 \text{ U mg}^{-1}$) já foi verificado logo no segundo dia de cultivo.

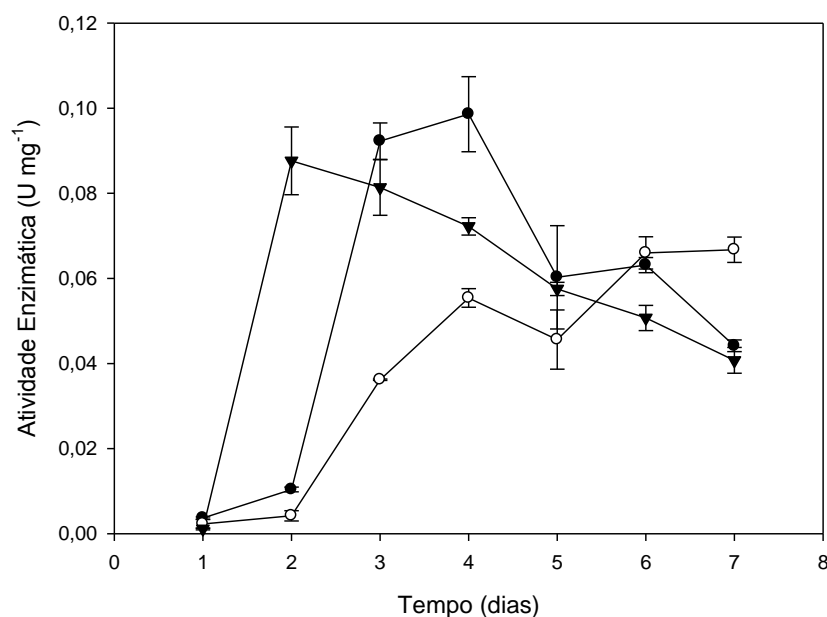


Figura 3. Atividade específica de CMCase ao longo de sete dias de cultivo em batelada. Comunidade do bagaço (○), comunidade do esterco (●) e comunidade mista (▼).

Na figura 4 pode-se observar a atividade de xilanase nos três cultivos. Verifica-se que a Comunidade do Bagaço também apresenta, para esta atividade, um perfil diferente das demais. O perfil de atividade de xilanase nesta comunidade é crescente e não há uma tendência a estabilização. No entanto, o valor de atividade no dia de máxima atuação ($1,70 \text{ U mg}^{-1}$) ainda é menor que os valores apresentados pelos outros consórcios selecionados. Assim como para a CMCase, a Comunidade do Esterco também apresenta o quarto dia de cultivo como o de máxima atividade para xilanase ($2,02 \text{ U mg}^{-1}$). E é neste mesmo dia que a atividade desta enzima atinge seu máximo na Comunidade Mista ($2,86 \text{ U mg}^{-1}$).

A comunidade mista, originada da mistura de alíquotas das outras duas comunidades, mantém o perfil enzimático da Comunidade do Esterco, indicando um domínio dos micro-organismos deste consórcio em relação àqueles provenientes do bagaço. Mesmo assim, verifica-se que a atividade enzimática específica nesta comunidade é maior do que nas outras duas isoladamente, talvez, pelo efeito aditivo das duas comunidades microbianas.

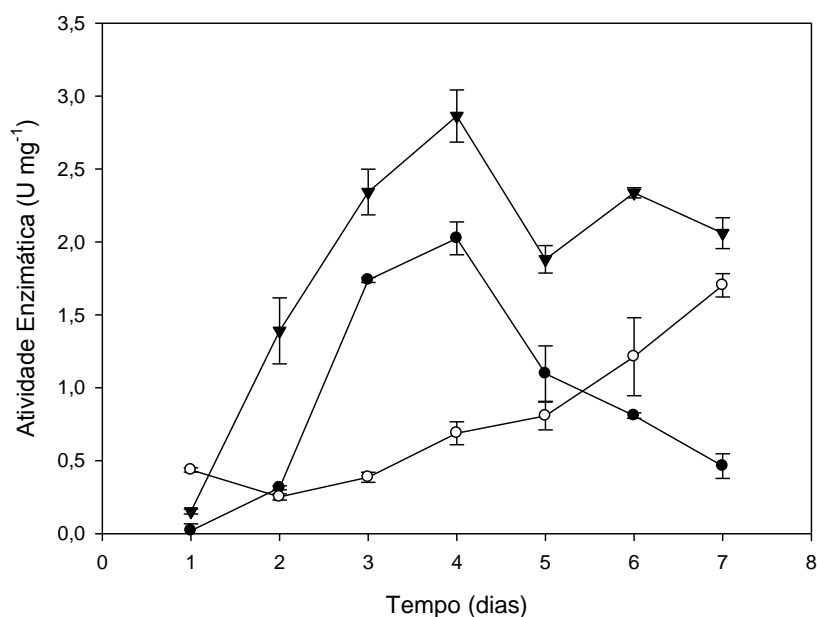


Figura 4. Atividade específica de xilanase ao longo de sete dias de cultivo em batelada. Comunidade do bagaço (○), comunidade do esterco (●) e comunidade mista (▼).

Lv *et al.* (2008), ao caracterizar as celulasas de uma comunidade microbiana mesofílica oriunda de bagaço de cana em decomposição, verificaram a atividade específica máxima de 0,03 U mg⁻¹ para CMCase no terceiro dia de cultivo. Este valor é o mesmo observado aqui no terceiro dia de cultivo da comunidade do bagaço, comunidade esta que apresentou menor atividade CMCase em relação às outras duas. No sobrenadante da comunidade mista, foi observado um valor de atividade quase três vezes maior já no segundo dia de cultivo.

Para uma comunidade selecionada a partir de fezes de aves, suínos e bovinos, Wongwilaiwalin *et al.* (2010), verificaram que, para ambas as atividades, o dia de máxima atuação ocorre no segundo dia de cultivo. A atividade CMCase da Comunidade Mista, obtida neste trabalho, apesar de possuir o máximo também no segundo dia, com atividade de 0,09 U mg⁻¹, é inferior a 0,24 U mg⁻¹ detectada no trabalho citado. No entanto, a atividade xilanase detectada no quarto dia de cultivo da comunidade mista, foi quase o dobro do valor reportado no dia de máxima atividade pela comunidade do referido trabalho.

Por apresentar um perfil enzimático diferenciado, com maior atividade CMCase logo no segundo dia e maior atividade de xilanase no quarto dia, a

comunidade mista se mostra como um consórcio microbiano interessante para aplicações biotecnológicas. É possível explorar um intervalo de três dias (do segundo ao quarto dia de cultivo) para se obter proporções distintas destas enzimas, com atividade específica maior que nas outras comunidades. Sendo assim, o referido consórcio foi escolhido para os estudos seguintes.

4.3. Cultivo da comunidade mista em regime de batelada alimentada

Na tentativa de manter a produção das enzimas nas condições de máxima atividade das mesmas a batelada foi diariamente alimentada com meio fresco ao mesmo tempo em que parte da cultura era removida, mantendo-se o volume constante. A taxa de diluição empregada foi na ordem de $0,013 \text{ h}^{-1}$. Devido à heterogeneidade do meio PCS, esse fluxo não pode ser bombeado de forma automatizada, portanto foi realizada sob a forma de uma troca diária de 10 mL de meio. O baixo valor da taxa de diluição foi escolhido para se tentar manter a comunidade na fase pré-estacionária, fase de estresse, na qual muitas células respondem melhor a estímulos do meio e a expressão de genes que codificam enzimas de utilização de fontes de carbono alternativas costuma ser maior (WHITE, 2000), mesmo que tal fase seja difícil de ser determinada quando se tem um consórcio composto por diferentes espécies microbianas.

A figura 5 apresenta o perfil das atividades CMCCase e xilanase obtidas por cultivo em batelada e cultivo com alimentação. Observa-se para a CMCCase (A) uma tendência de estabilização da atividade por mais três dias após o início da alimentação, com diminuição da atividade enzimática a partir do quinto dia de cultivo. Comportamento este, bem diferente do detectado no cultivo em batelada, no qual a queda na atividade CMCCase se inicia no terceiro dia.

Já para xilanase (B), mesmo com o início da alimentação no segundo dia de cultivo, a Comunidade Mista apresentou valores de atividade enzimática crescentes até o quarto dia, considerado o de máxima atividade. Apesar de apresentar atividade um pouco maior do que no cultivo em

batelada, a atividade enzimática no cultivo em batelada alimentada seguiu a mesma tendência do primeiro cultivo.

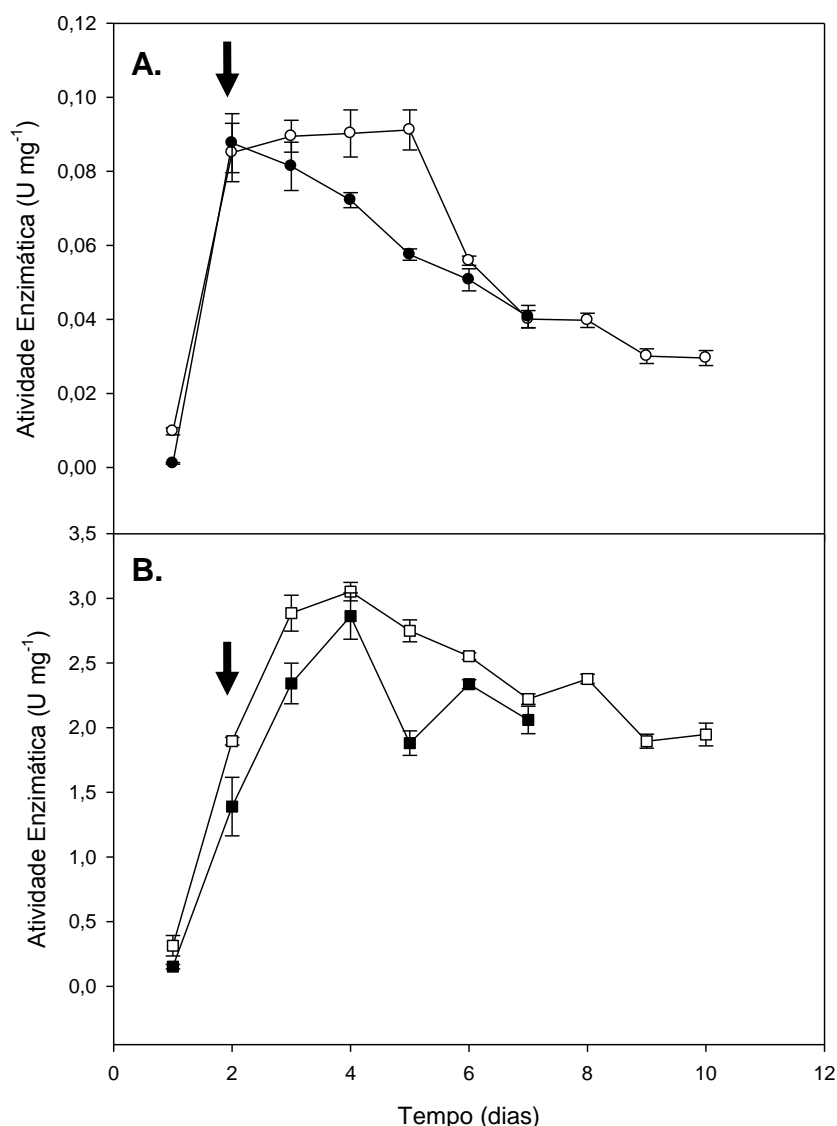


Figura 5. Perfil de atividade das enzimas CMCase e xilanase da comunidade mista ao longo do tempo. Atividade de CMCase (A) no cultivo em batelada simples (●) e em batelada alimentada (○). Atividade de xilanase (B) no cultivo em batelada simples (■) e em batelada alimentada (□). As setas indicam o dia do início da alimentação, com um fluxo de $4,16 \times 10^{-4} \text{ L h}^{-1}$ o que equivale a uma taxa de diluição de $0,013 \text{ h}^{-1}$.

Embora tenha sido analisada somente uma taxa de diluição, verifica-se que a cultura da comunidade mista exibiu uma resposta distinta quanto à expressão das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, comprovando a hipótese de que ela pode ser manipulada para se obter e manter a expressão dessas enzimas ao longo do tempo. No entanto, novos estudos devem ser feitos, incluindo outras taxas de diluição para se avaliar em que

condição a expressão das enzimas e manutenção de sua atividade são otimizadas.

4.4. Efeito do congelamento rápido na expressão das enzimas pela comunidade microbiana

Após congelamento por 30 e 60 dias, verifica-se que houve uma alteração no perfil de atividade enzimática tanto para CMCase quanto para xilanase (figura 6).

Para a atividade CMCase, ocorreu um atraso no dia de máxima atividade do segundo para o terceiro dia, independente do tempo de congelamento das células. No entanto, a atividade enzimática neste terceiro dia foi maior do que a verificada no segundo dia de cultivo da comunidade não-congelada.

Já para xilanase, houve uma diminuição no tempo para se atingir o máximo de atividade enzimática do quarto dia, na comunidade mista inicial, para o terceiro dia, para as células que foram congeladas por 30 e 60 dias.

Diferentes autores que estudaram comunidades microbianas lignocelulolíticas também avaliaram o efeito do congelamento sobre as comunidades. Esta avaliação, porém, foi feita de formas distintas nos diferentes casos. Haruta *et al.* (2002) avaliaram a habilidade do consórcio microbiano em continuar degradando palha de arroz após o descongelamento. Wongwilaiwalin *et al.* (2010) optaram por acompanhar a presença dos micro-organismos, antes e após o congelamento, por DGGE.

No presente trabalho, o acompanhamento foi feito com base no fenótipo da comunidade. Após análise da atividade enzimática, verifica-se que, mesmo com uma pequena mudança no tempo da atividade da CMCase, o que reflete a perda da viabilidade de parte das células devido ao congelamento, a expressão das enzimas é recuperada, com valores mais elevados de atividade do que os valores máximos exibidos pela comunidade mista antes do congelamento.

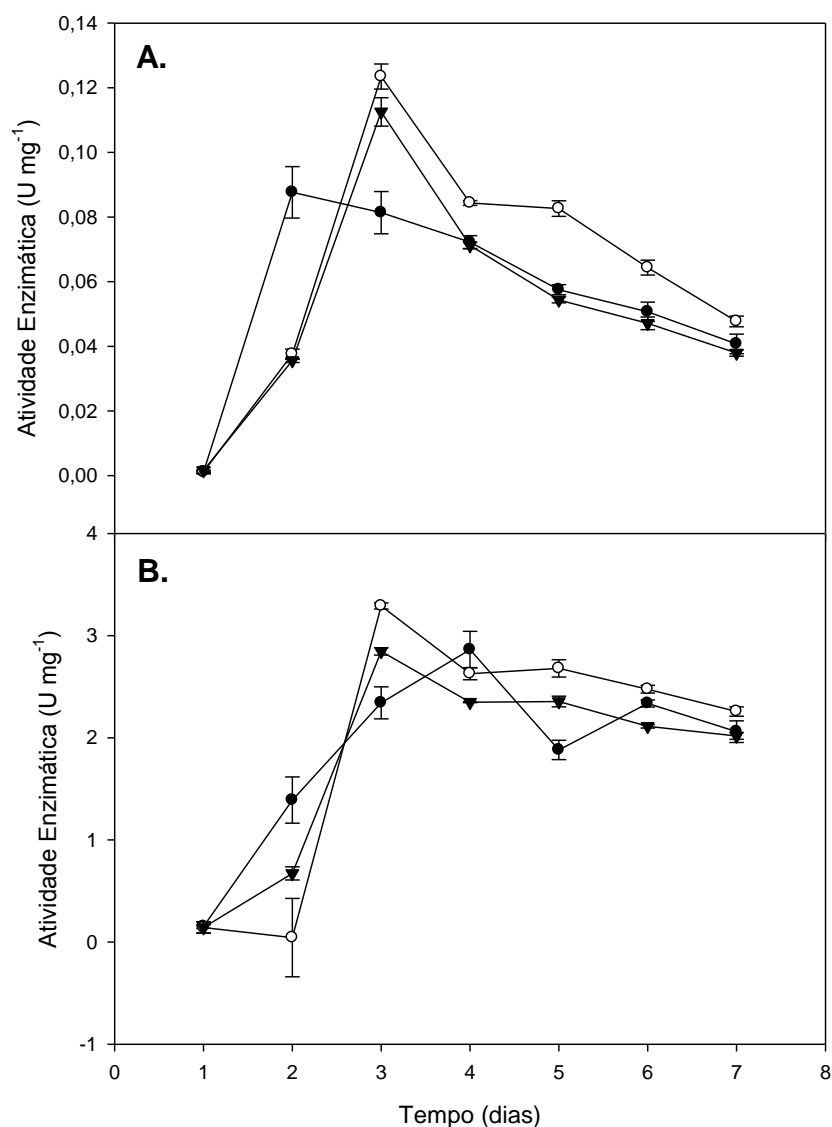


Figura 6. Atividade específica de CMCase (A) e xilanase (B), ao longo do tempo, na comunidade mista não-congelada (●) e após congelamento rápido e estocagem por 30 (○) e 60 dias (▼).

Outra característica fenotípica avaliada foi a degradação da fita de papel. Após reativação das células congeladas em meio PCS, verifica-se que o tempo de degradação da fita permanece o mesmo, ou seja, três dias, tanto para células congeladas a 30 ou 60 dias. Isso significa que a comunidade mista, uma vez selecionada, pode ser conservada ao longo de pelo menos 60 dias e reativada para obtenção das enzimas celulolíticas.

Análises moleculares de comunidades congeladas por um ano mostraram que não há alteração da microbiota que as compõem (WONGWILAIWALIN *et al.*, 2010). Pelo fato de não haver alterações

expressivas no perfil de expressão enzimática pela comunidade microbiana reativada com 30 ou 60 dias após o congelamento, pode-se confirmar o fato de que o congelamento rápido com posterior estocagem a - 80 °C representa um método efetivo para estocagem de comunidades microbianas termofílicas, sem perdas de suas características, por longos períodos.

4.5. Concentração do coquetel enzimático e estabilidade das enzimas na preparação enzimática

Após a ultrafiltração de 400 mL do sobrenadante da cultura mista, foram obtidos cerca de 8 mL de concentrado, correspondente a 50 vezes o volume inicial. As atividades CMCase e xilanase, determinada no concentrado, não foi detectada na porção filtrada. A membrana utilizada com limite nominal de peso molecular de 3.000 Da foi capaz de impedir a passagem destas enzimas, uma vez que as enzimas que compõe o complexo lignocelulolítico apresentam massa molecular maior do que o limite utilizado (LI *et al.*, 2009; KO *et al.*, 2010).

Como esperado, os valores de atividade específica de ambas as enzimas no concentrado foi maior do que o encontrado no meio extracelular inicial. A atividade CMCase, que era de 0,05 U mg⁻¹ no extrato bruto, atingiu 1,19 U mg⁻¹ após a ultrafiltração. Já a atividade xilanase aumentou de 2,22 U mg⁻¹ no extrato bruto para 123,55 U mg⁻¹ no concentrado. Isto representa uma concentração de quase 25 vezes para CMCase e mais de 55 vezes para xilanase. Uma hipótese para essa concentração diminuída de CMCase é o fato de a membrana utilizada ser de celulose regenerada. Pode ser que parte das CMCases tenham se adsorvido a mesma e não tenham sido totalmente eluídas após a filtração.

Com o intuito de verificar a atividade dessas enzimas após armazenamento, o extrato concentrado, previamente acrescido com glicerol na proporção de 50% (p/v), foi conservado sob quatro temperaturas distintas. Para a enzima CMCase (Tabela 1), verifica-se uma tendência de aumento de atividade ao longo do tempo de armazenamento. Esse aumento é mais evidente após o 45° dia. No entanto, esse acréscimo de atividade só é significativo quando o coquetel enzimático foi conservado a 4 °C e - 80 °C.

Esse é um fenômeno interessante e pouco discutido. Várias substâncias podem inibir ou inativar a atividade de celulasas, como açúcares solúveis, compostos derivados do furano, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (KIM *et al.*, 2011). Possivelmente, algum composto inibidor presente no concentrado tenha sido degradado ou modificado durante o armazenamento, permitindo assim uma maior atividade da enzima. Além disso, as baixas temperaturas podem ter alterado as interações hidrofóbicas da estrutura protéica, modificando assim sua conformação espacial e aumentando sua atividade, ou ainda, essas baixas temperaturas podem ter favorecido o fenômeno de crioprecipitação de outras proteínas presentes no coquetel, aumentando assim a atividade relativa de CMCase.

Já a xilanase (Tabela 2) apresentou um comportamento oposto, porém esperado. Logo no 10º dia de armazenamento já foi verificada uma perda de atividade significativa em todas as temperaturas. Porém esta redução se mantém praticamente constante. Os valores de atividade observados no 60º dia são próximos dos detectados após 10 dias de armazenamento. Esses dados indicam que a xilanase da comunidade mista tem uma perda inicial de atividade nos 10 primeiros dias e depois tende a se estabilizar por cerca de dois meses.

Com base nesses resultados, verifica-se que o coquetel enzimático obtido a partir da comunidade mista pode ser conservado em condições brandas de refrigeração/congelamento. Tanto a 4 °C quanto a - 20 °C, apesar de sofrer uma redução significativa, a xilanase mantém cerca de 80% de sua atividade inicial. A atividade CMCase não apresenta redução mesmo quando o extrato enzimático é conservado sobre a bancada, com temperatura próxima dos 25 °C.

Tabela 1. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento na atividade de CMCase presente no coquetel enzimático

		Atividade de CMCase (U mg ⁻¹)				
Temperatura de Armazenamento	Atividade inicial no concentrado	Tempo de Armazenamento (dias)				
		10	20	30	45	60
25 °C		1,02 ± 0,09	1,06 ± 0,01	1,01 ± 0,02	1,43 ± 0,20	1,38 ± 0,04
4 °C	1,20 ± 0,13	1,33 ± 0,04	1,46 ± 0,08	1,54* ± 0,08	1,61* ± 0,12	1,60* ± 0,04
- 20 °C		1,12 ± 0,12	1,42 ± 0,16	1,57 ± 0,06	1,35 ± 0,04	1,47 ± 0,15
- 80 °C		1,15 ± 0,06	1,45 ± 0,09	1,40 ± 0,08	1,54* ± 0,90	1,62* ± 0,04

Os valores de atividade são média de duas réplicas, seguidas pelo respectivo desvio-padrão.

Médias seguidas de (*) apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett entre a atividade inicial antes do armazenamento e o valor correspondente.

Tabela 2. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento na atividade de xilanase presente no coquetel enzimático

		Atividade de Xilanase (U mg ⁻¹)				
Temperatura de Armazenamento	Atividade inicial no concentrado	Tempo de Armazenamento (dias)				
		10	20	30	45	60
25 °C	123,55 ± 0,32	80,22* ± 0,92	76,76* ± 2,08	72,34* ± 1,20	91,99* ± 5,02	73,70* ± 0,98
4 °C		95,74* ± 3,63	98,97* ± 0,95	104,84 ± 0,16	108,67 ± 7,66	97,63* ± 12,11
- 20 °C		103,43* ± 5,05	104,68* ± 3,41	108,94* ± 3,50	103,43* ± 3,97	89,14* ± 1,29
- 80 °C		98,17* ± 5,55	102,09* ± 4,79	117,46 ± 2,68	108,96* ± 5,11	102,14* ± 1,39

Os valores de atividade são média de duas réplicas, seguidas pelo respectivo desvio-padrão.

Médias seguidas de (*) apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett entre a atividade inicial antes do armazenamento e o valor correspondente.

4.6. Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática

O complexo de enzimas celulolíticas secretado pela Comunidade Mista foi parcialmente caracterizado pela determinação do pH e temperatura ótimos de atividade. A figura 7 apresenta o efeito da temperatura na atividade CMCase e xilanase. O perfil típico da relação de Arrhenius é observado em ambos os casos.

Observa-se que a atividade CMCase foi máxima a 60 °C, mas ainda mantém 95% de atividade a 50 °C, enquanto que acima de 60 °C, há uma rápida perda de atividade. Já a xilanase possui uma temperatura ótima de 65 °C, mas em uma faixa de 5 °C acima ou abaixo deste ponto ótimo ela ainda mantém cerca de 95% de sua atividade relativa.

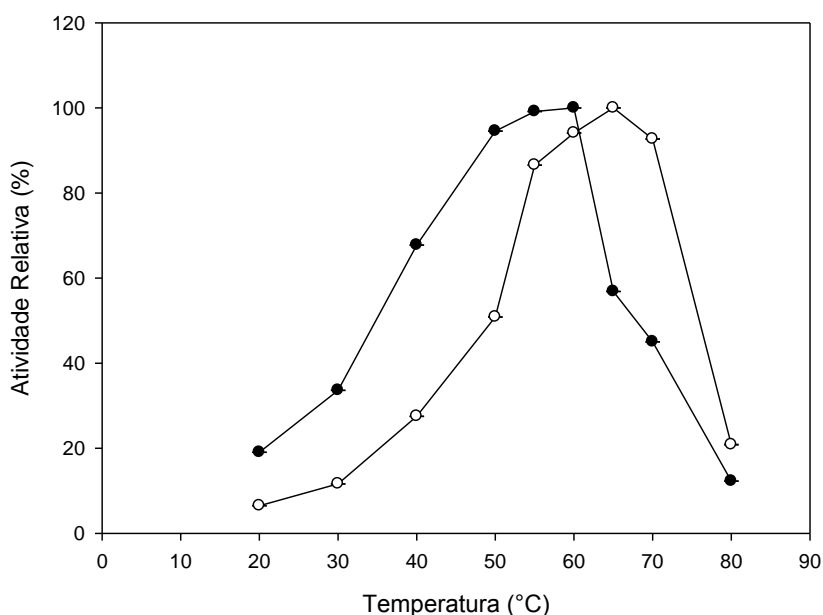


Figura 7. Efeito da temperatura (em pH 5,0) na atividade das enzimas CMCase (●) e xilanase (○) produzidas pela comunidade mista. A atividade residual é expressa como porcentagem da atividade máxima. Cada ponto é uma média de três repetições.

As metodologias empregadas para a determinação da atividade de CMCase (GHOSE, 1987) e xilanase (BAILEY *et al.*, 1992) recomendavam uma temperatura reacional de 50 °C. No entanto, talvez pelo fato de serem sintetizadas por uma comunidade microbiana termofílica, essas enzimas apresentam maior atividade em temperaturas acima da recomendada. A 50 °C a atividade CMCase manteve 95% de sua atividade

máxima, mas para a xilanase, sua atividade nesta temperatura foi de apenas 50% da atividade máxima.

O efeito do pH na atividade dessas enzimas foi determinado na temperatura ótima para cada uma e está representado na figura 8.

O perfil de resposta da atividade de ambos complexos enzimáticos foi mais amplo que aquele comum de enzimas puras. Atividade máxima pode ser observada em pH 5,4, sendo consideradas portanto, como enzimas acidófilas. A CMCCase mantém acima de 80% de sua atividade máxima numa faixa de pH de 4,5 a 6,5. Esta é uma característica semelhante à relatada por Rastogi *et al.* (2010), trabalhando com linhagens de *Bacillus* e *Geobacillus* isoladas de compostagens em fase termofílica. No entanto, a xilanase da comunidade mista parece ser mais resistente à mudança de pH. Esta enzima preserva cerca de 97% de sua atividade máxima no mesmo intervalo. É também evidente que essas enzimas mantêm mais de 50% de sua atividade em pH neutro.

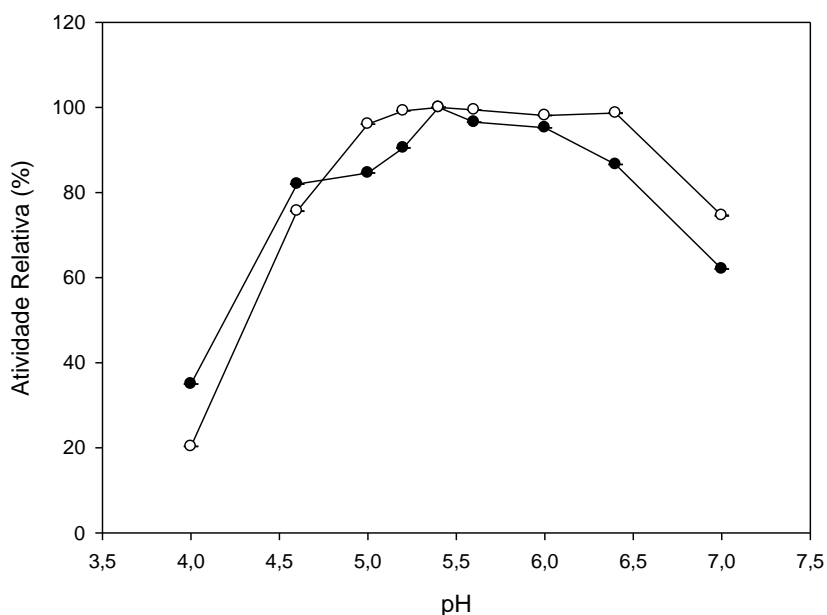


Figura 8. Efeito do pH na atividade das enzimas CMCCase (●) a 60 °C e xilanase (○) a 65 °C. A atividade relativa é expressa como porcentagem da atividade máxima. Cada ponto é média de três repetições.

Yang *et al.* (2011), ao caracterizar parcialmente a CMCCase e a xilanase produzidas por uma comunidade mesofílica oriunda de sorgo, quanto aos efeitos da temperatura e pH na atividade, verificaram máxima

atividade para ambas a 60 °C. Quanto ao pH, observaram que na faixa de 4,5 a 6,5 a CMCase mantém 80% de sua atividade, com pH ótimo também em 5,4. Já a xilanase mostrou-se mais sensível à mudança de pH, pois manteve 95% de sua atividade em uma faixa bem mais estreita (5,5 a 6,5).

As enzimas sintetizadas pela comunidade mista estão ativas a temperaturas mais elevadas e suportam ampla variação no pH, características interessantes para aplicação na biodegradação enzimática da biomassa vegetal, uma vez que a falta de enzimas celulolíticas robustas torna-se um obstáculo no desenvolvimento de novas tecnologias (RASTOGI *et al.*, 2010).

4.7. Composição das comunidades microbianas selecionadas

O perfil de bandas do gene 16S rRNA, amplificado das três comunidades selecionadas neste trabalho, nos permite observar a predominância de sete grupos bacterianos na Comunidade do Bagaço e oito nas comunidades provenientes do esterco e mista (figura 9).

A análise da estrutura das comunidades por PCR-DGGE, assim como outras técnicas moleculares, apresenta certas limitações. Contudo, tem a vantagem específica de monitorar as espécies microbianas predominantes no cultivo. O número de bandas encontradas é bem inferior as 14 bandas detectadas por Wang *et al.* (2011) e próximo das seis encontradas por Haruta *et al.* (2002). Contudo, enquanto a comunidade com 14 bandas leva oito dias para degradar 80% da fita de papel filtro, as comunidades selecionadas neste trabalho precisam de apenas três dias para degradar totalmente a fita. Isto prova que não é a diversidade de micro-organismos presentes no cultivo que determina a atividade de degradação do papel, mas sim a eficiência de certas espécies em secretar enzimas mais eficientes e robustas.

O fato de a comunidade mista manter o perfil de atividade enzimática da Comunidade do Esterco ao longo do cultivo em batelada pode ser explicado pela sobreposição parcial dos micro-organismos do esterco em relação aos provenientes do bagaço. O dendrograma construído com base no índice de correlação de Pearson a partir do DGGE *fingerprints* das

comunidades revela que há cerca de 94% de similaridade entre as comunidades do esterco e mista, estando as duas agrupadas e separadas da comunidade do bagaço. Geralmente, valores acima de 80% indicam amostras de mesma origem, enquanto que amostras de diferentes locais apresentam similaridade máxima de 70% (OROS-SICHLER *et al.*, 2006).

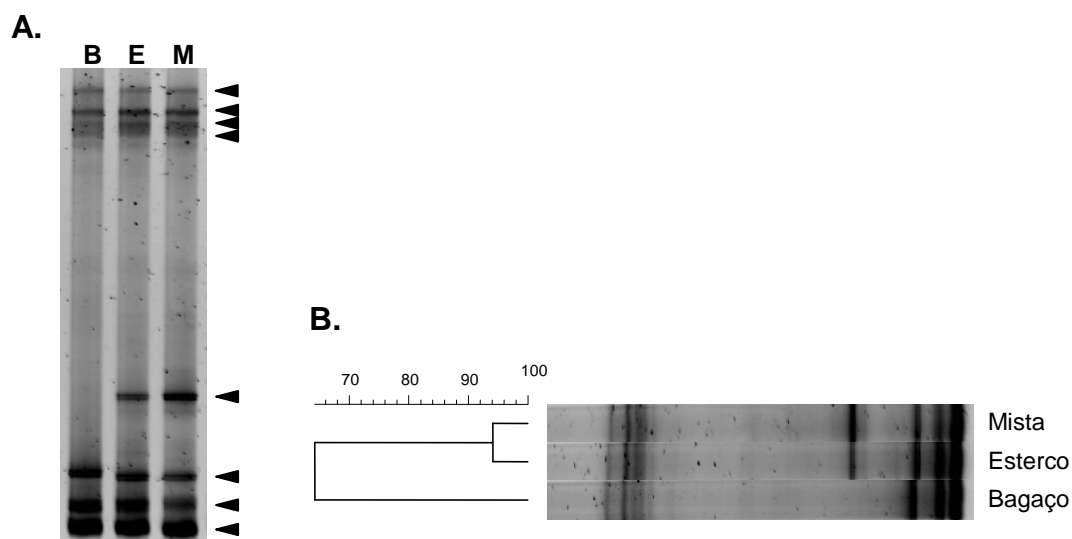


Figura 9. DGGE *fingerprints* das três comunidades selecionadas. **A)** Perfil de bandas do gene 16S rRNA nas Comunidades do Bagaço (B), Esterco (E) e Mista (M). As setas indicam as bandas analisadas. **B)** Dendrograma construído a partir do DGGE *fingerprints* das comunidades.

A presença de fungos em consórcios microbianos obtidos através de cultura de enriquecimento foi relatada por Yang *et al.* (2011). No trabalho com comunidade obtida de sorgo, duas espécies foram encontradas, *Fusarium sporotrichioides* e *Fusarium poae*, espécies fitopatogênicas, normalmente encontradas no campo e associadas à produção de micotoxinas em grãos (STENGLEIN, 2009). Porém, o consórcio em questão era mesofílico, cultivado a 30 °C, temperatura permissiva ao desenvolvimento da maioria dos fungos.

Os demais trabalhos que selecionaram comunidades termofílicas, não apresentavam entre os seus integrantes, micro-organismos eucariotos (HARUTA *et al.*, 2002; WONGWILAIWALIN *et al.*, 2010). Surpreendentemente, após as duas etapas de PCR para amplificação de parte do gene 18S rRNA, bandas de DNA foram observadas para amostras das comunidades do bagaço e do esterco (figura 10). A ausência de fungos na comunidade mista, originada da mistura de alíquotas das outras duas

comunidades, pode ser explicada pela competição interespecífica. Como os fungos geralmente apresentam taxas de crescimento menores que as bactérias, pode ser que eles não tenham conseguido se estabelecer nesta nova comunidade.

Alguns fungos filamentosos são termofílicos e podem sintetizar hidrolases caracterizadas por propriedades interessantes, como termoestabilidade, atividade ótima em temperaturas mais elevadas e altas taxas de hidrólise de substrato (GOMES *et al.*, 2000). *Thermoascus aurantiacus* foi descrito como produtor de enzimas celulolíticas quando cultivado em cultura pura tanto em estado sólido, quanto submerso (KALOGERIS *et al.*, 2003) e *Thermomyces lanuginosus*, como produtor de xilanases notadamente termoestáveis e ativas em uma ampla faixa de pH (SU *et al.*, 2011). O que se verifica nos relatos, é o cultivo destes microorganismos separadamente, não em comunidades microbianas.

É possível perceber pelo menos três bandas para cada comunidade, o que permite inferir que mais de uma espécie fúngica co-habita em cada comunidade. Quanto à análise do dendrograma, verifica-se uma similaridade inferior a 60%, o que comprova a diferença nos perfis de atividade enzimática apresentado por cada comunidade.

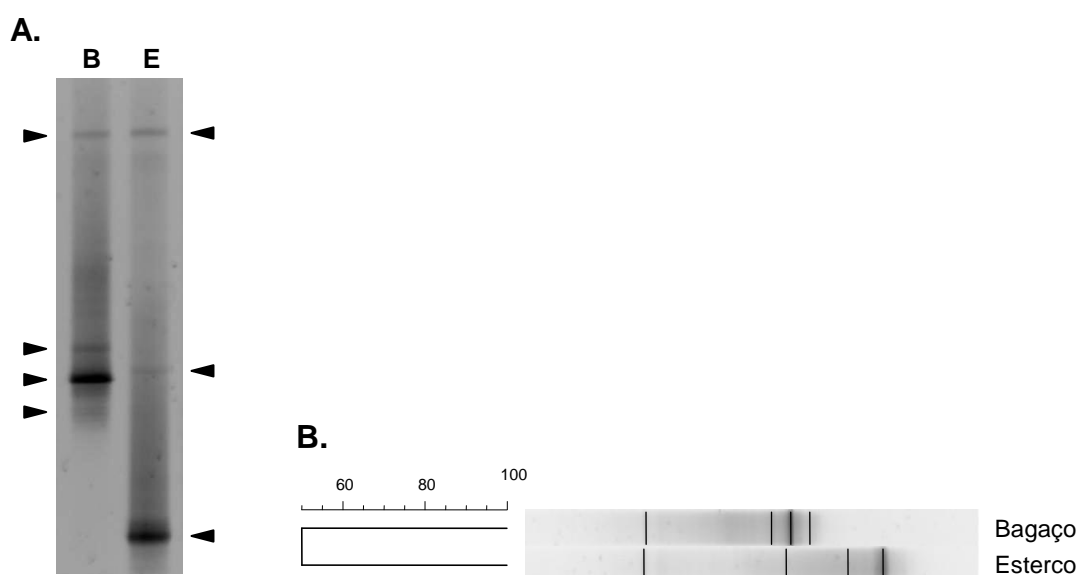


Figura 10. DGGE *fingerprints* de duas comunidades selecionadas. **A)** Perfil de bandas do gene 18S rRNA nas Comunidades do Bagaço (B) e Esterco (E). As setas indicam as bandas analisadas. **B)** Dendrograma construído a partir do DGGE *fingerprints* das comunidades.

No entanto, como não há fungos na comunidade mista e é nela que ocorrem as maiores atividades das enzimas analisadas, pode ser que os fungos detectados nas Comunidades do Bagaço e do Esterco não estivessem atuando diretamente na degradação da biomassa lignocelulósica. Poderiam, simplesmente, ter se adaptado às comunidades nas quais as bactérias secretavam as enzimas responsáveis pela liberação de açúcares no meio a partir da hidrólise do bagaço e da fita de papel.

A atividade da enzima lacase, encontrada na maioria dos fungos, não foi detectada em nenhuma comunidade. Apesar de, em duas delas, esses micro-organismos estarem presentes, pode ser que não expressavam essa enzima, devido à ausência de um indutor, ou era expressa em níveis não detectados. A lacase está associada à estruturação do corpo de frutificação, à formação de pigmentos durante o desenvolvimento assexual e à patogênese (LETTERA *et al.*, 2010). O fato dessa enzima não ser encontrada no concentrado enzimático obtido a partir da comunidade mista é justamente pela ausência de fungos neste consórcio.

A seleção de comunidades microbianas lignocelulolíticas por enriquecimento e sob aeração restrita tem sido utilizada com maior frequência nos últimos anos com evidente eficiência (FENG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011; WONGWILAIWALIN *et al.*, 2010).

Algumas comunidades lignocelulolíticas tiveram seus integrantes identificados, e entre eles encontram-se bactérias pertencentes a diferentes filos, como *Firmicutes* e *Proteobacteria* (WANG *et al.*, 2011). Organismos pertencentes a estes grupos são comumente encontrados em compostagens com palha de arroz (MATSUYAMA *et al.*, 2007), madeira em decomposição (ZHANG *et al.*, 2008) e rúmeme (WANG *et al.*, 2010) o que sugere a importância desses tipos de bactérias na degradação de materiais lignocelulósicos.

Contudo, a diversidade de gêneros e espécies é bem maior, sendo possível encontrar micro-organismos com os mais distintos metabolismos convivendo na mesma cultura. Bactérias estritamente aeróbias, tais como *Ureibacillus thermosphaericus* (WANG *et al.*, 2011), *Bordetella* sp. e *Brevibacillus* sp. (HARUTA *et al.*, 2002) podem existir na superfície do meio. Bactérias anaeróbias facultativas, como as pertencentes à família

Rhodocyclaceae, encontradas no trabalho de Wongwilaiwalin *et al.* (2011), podem ser os micro-organismos chave que consomem o oxigênio disponível na região superior do líquido na fase inicial de cultivo, desencadeando a depleção desse gás no sistema. Por consequência, o cenário torna-se favorável para o desenvolvimento de anaeróbios estritos, como *Clostridium* sp. (FENG *et al.*, 2011), gênero que apresenta celulosomas, que são complexos enzimáticos celulolíticos bem conhecidos em bactérias anaeróbias que degradam celulose.

Acredita-se que a co-existência desses micro-organismos é importante para uma efetiva degradação do material lignocelulósico que se faz por uma complexa interação metabólica. O balanço de vários tipos de relações metabólicas é considerado essencial para a existência harmoniosa dos membros na comunidade, o que resulta em uma eficiente degradação da biomassa vegetal (KATO *et al.*, 2008).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho resultou em dois produtos de interesse agroindustrial: inoculante de culturas microbianas mistas termofílicas produtoras de enzimas celulolíticas e um coquetel de enzimas com atividades de hidrólise de celulose e hemicelulose.

- A técnica de cultura de enriquecimento com posterior subcultivo, aeração reduzida e alta temperatura, mostrou-se uma estratégia eficiente para a seleção de comunidades microbianas termofílicas com produção extracelular de enzimas celulolíticas;
- A Comunidade Mista, selecionada da mistura das comunidades previamente obtidas de esterco e de bagaço de cana em decomposição apresentou máximo de atividade de CMC_{Case} com menos tempo de cultivo e maior atividade de xilanase em relação a duas comunidades separadamente;
- A composição da Comunidade Mista é, provavelmente, uma sobreposição parcial dos micro-organismos da Comunidade do Esterco em relação aos provenientes do bagaço, uma vez que na Comunidade Mista não foram detectados fungos, organismos presentes nas outras comunidades;
- A Comunidade Mista apresenta potencial para ser explorada como inoculante para a produção de enzimas celulolíticas termofílicas por

batelada alimentada ou cultura contínua;

- O inoculante mantém seu fenótipo de expressão de enzimas celulolíticas mesmo após ter sido congelada por até 60 dias;
- As enzimas com atividade CMCase e xilanase produzidas pelo inoculante apresentam potencial para aplicação industrial, pois mantêm sua atividade numa faixa de pH de 5,0 a 6,5, além de exibirem maior atividade sob temperaturas de 60 °C e 65 °C, respectivamente;
- O coquetel enzimático obtido pode ser conservado sob temperaturas mais brandas de refrigeração/congelamento, uma vez que não há perdas na atividade de CMCase, além manter mais de 80% da atividade inicial de xilanase quando conservada a 4 °C ou - 20 °C.

Como perspectivas de melhorar e manter a expressão das enzimas celulolíticas pelo consórcio microbiano selecionado, sugere-se a avaliação de diferentes taxas de diluição em ensaios de batelada alimentada ou cultura contínua. Além disso, outros resíduos agroindustriais podem ser utilizados como possíveis indutores para a expressão dessas enzimas. A lactose, dissacarídeo presente em soro de queijo, induz a expressão de enzimas celulolíticas em fungos e pode também induzir a expressão no inoculante obtido. Esse substrato, comparado a celulose, é mais facilmente manipulado no preparo do meio e operação da cultura.

Outras enzimas podem ter sua atividade analisadas no coquetel, como β -glicosidase, uma vez que o complexo celulolítico é formado por diferentes enzimas que atuam sinergicamente na degradação da biomassa vegetal.

Finalmente, os consórcios microbianos selecionados podem ter seus componentes identificados a fim de se determinar os micro-organismos que atuam de maneira decisiva na desconstrução da fibra vegetal. Além disso, duas das três comunidades termofílicas obtidas nesse trabalho apresentam

fungos em sua constituição, fato ainda não observado por autores que estudam comunidades microbianas lignocelulolíticas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 399-407, 2008.

ALAHUHTA, M.; XU, Q.; BOMBLE, Y. J.; BOMBLE, Y. J.; BRUNECKY, R. ADNEY, W. S.; DING, S. Y.; HIMMEL, M. E., LUNIN, V. V. The unique binding mode of cellulosomal CBM4 from *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase A. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, p. 374-387, 2010.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

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

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

BASHMAKOV, I. Three laws of energy transitions. **Energy Policy**, v. 35, p.

3583-3594, 2007.

BAUDEL, H. M.; ZAROR, C.; ABREU, C. A. M. Improving the value of sugarcane bagasse via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 309-315, 2005.

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

BRASIL. Decreto nº 76.593, de 14 de novembro de 1975. Institui o Programa Nacional do Álcool e dá outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 nov. 1975. Seção 1, p. 15257, 1975.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 642-647, 2009.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CHEN, H.; QIU, W. Key technologies for bioethanol production from lignocelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 556-562, 2010.

CHENG, C. L.; CHANG, J. S. Hydrolysis of lignocellulosic feedstock by novel cellulases originating from *Pseudomonas* sp. CL3 for fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8628-8634, 2011.

CHENG, Y. F.; EDWARDS, J. E.; ALLISON, G. G.; ZHU, W. Y.; THEODOROU, M. K. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in

consecutive batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4821-4828, 2009.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 1412-1421, 2010.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; 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.

EL-ZAWAWY, W. K.; IBRAHIM, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; MAHMOUD, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocelulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 865-871, 2011.

FARINA, C. S.; LOYO, M. M.; BARALDO JR., A.; TARDIOLI, P. W.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 810-815, 2010.

FENG, Y.; YU, Y.; WANG, X.; QU, Y.; LI, D.; HE, W.; KIM, B. H. Degradation of raw corn stover powder (RCSP) by an enriched microbial consortium and its community structure. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 742-747, 2011.

FONSECA, M. I.; SHIMIZU, E.; ZAPATA, P. D.; VILLALBA, L. L. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 534-539, 2010.

FOUQUET, R. The slow search for solutions: lessons from historical energy transitions by sector and service. **Energy Policy**, v. 38, p. 6586-6596, 2010.

GENG, A.; HE, Y. L.; QIAN, C. L.; YAN, X.; ZHOU, Z. H. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium*

thermocellum and *Clostridium thermopalmarium*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4029-4033, 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p. 808-810, 2007.

GOMES, I.; GOMES, J.; GOMES, D. J.; STEINER, W. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 461-468, 2000.

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

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2011.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass Recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOUS, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KATO, S.; HARUTA, S.; CUI, Z. J.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 403-411, 2008.

KAUSAR, H.; SARIAH, M.; MOHD SAUD, H.; ZAHANGIR ALAM, M.; RAZI ISMAIL, M. Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 594-600, 2010.

KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 408-415, 2011.

KO, C. H.; TSAI, C. H.; TU, J.; LEE, H. Y.; KU, L. T.; KUO, P. A.; LAI, Y. K. Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1638-1644, 2010.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

LETTERA, V.; PISCITELLI, A.; LEO, G.; BIROLO, L.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G. Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. **Fungal Biology**, v. 114, p. 724-730, 2010.

LI, Y.; YIN, Q.; DING, M.; ZHAO, F. Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- β -1,4-glucanase AC-EG65 from the

mollusc *Ampullaria crossean*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 153, p. 149-156, 2009.

LIU, J.; YUAN, X.; ZENG, G.; SHI, J.; CHEN, S. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2347-2351, 2006.

LUO, L.; VAN DER VOET, E.; HUPPES, G. Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1613-1619, 2009.

LV, Z.; YANG, J.; WANG, 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.

MAI, C.; KUES, U.; MILITZ, H. Biotechnology in the wood industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 477-494, 2004.

MAJEAU, J. A.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331-2350, 2010.

MATSUYAMA, T.; NAKAJIMA, Y.; MATSUYA, K.; IKENAGA, M.; ASAKAWA, S.; KIMURA, M. Bacterial community in plant residues in a Japanese paddy field estimated by RFLP and DGGE analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 463-472, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Protocolo de Intenções Agro-sócio-ambiental do Setor Sucroalcooleiro**. Belo Horizonte, 2008. 7p.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 118-123, 2012.

NICHOLS, D.; LEWIS, K.; ORJALA, J.; MO, S.; ORTENBERG, R.; O'CONNOR, P.; ZHAO, C.; VOUIROS, P.; KAEBERLEIN, T.; EPSTEIN, S. S. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4889-4897, 2008.

NTAIKOU, I.; KOUTROS, E.; KORNAROS, M. Valorisation of wastepaper using the fibrolytic/hydrogen producing bacterium *Ruminococcus albus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5928-5933, 2009.

OROS-SICHLER, M.; GOMES, N. C. M.; NEUBER, G.; SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 1, p. 63-75, 2006.

RABELO, S. C.; AMEZQUITA FONSECA, N. A.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2600-2607, 2011.

RANI, D. S.; NAND, K. Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absornum* CFR-702. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 355-362, 2000.

RASTOGI, G.; BHALLA, A.; ADHIKARI, A.; BISCHOFF, K. M.; HUGHES, S. R.; CHRISTOPHER, L. P.; SANI, K. R. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8798-8806, 2010.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature Reviews**, v. 454, p.

841-845, 2008.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado de Meio Ambiente. **Protocolo Agro-Ambiental do Setor Sucroalcooleiro Paulista**. São Paulo, 2007. 3p.

SOLOMON, B. D.; KRISHNA, K. The coming sustainable energy transition: History, strategies, and outlook. **Energy Policy**, v. 39, p. 7422-7431, 2011.

SONG, J. M.; WEI, D. Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass & Bioenergy**, v. 34, p. 1930-1934, 2010.

STENGLEIN, S. A. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 25-36, 2009.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews: Genetics**, v. 9, p. 433-443, 2008.

SU, Y.; ZHANG, X.; HOU, Z.; ZHU, X.; GUO, X.; LING, P. Improvement of xylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 using response surface methodology. **New Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 40-46, 2011.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Cellulase-free xylanase from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 1, p. 1-7, 2000.

TECHAPUN, C.; CHAROENRAT, T.; WATANABE, M.; SASAKI, K.; POOSARAN, N. Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulose-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 2, p. 99-105, 2002.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase. **Chemosphere**, v. 83, n. 5, p. 706-712, 2011.

VAINIO, E. J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, n. 8, p. 927-936, 2000.

WANG, A.; GAO, L.; REN, N.; XU, J.; LIU, C.; LEE, D. J. Enrichment strategy to select functional consortium from mixed cultures: consortium from rumen liquor for simultaneous cellulose degradation and hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 13413-13418, 2010.

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

WHITE, D. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**. 2nd ed. New York: Oxford University Press. 2000. 565p.

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

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

YOUN, H. D.; HAH, Y. C.; KANG, S. O. Role of laccase in lignin degradation

by white-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, n. 3, p. 183-188, 1995.

ZHANG, H. B.; YANG, M. X.; TU, T. Unexpectedly high bacterial diversity in decaying wood of a conifer as revealed by a molecular method. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 471-474, 2008.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulosic biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 367-375, 2008.

APÊNDICE

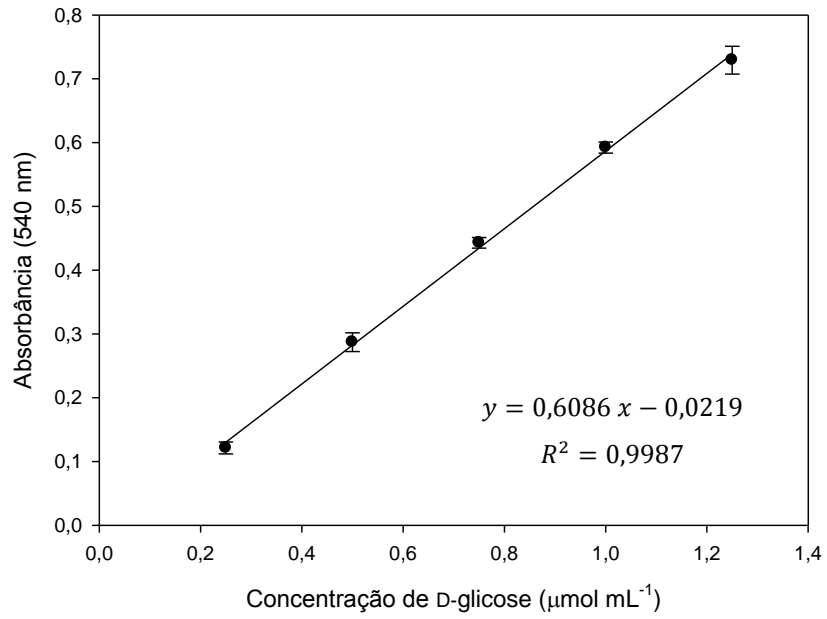


Figura 1A. Curva padrão de D-glicose.

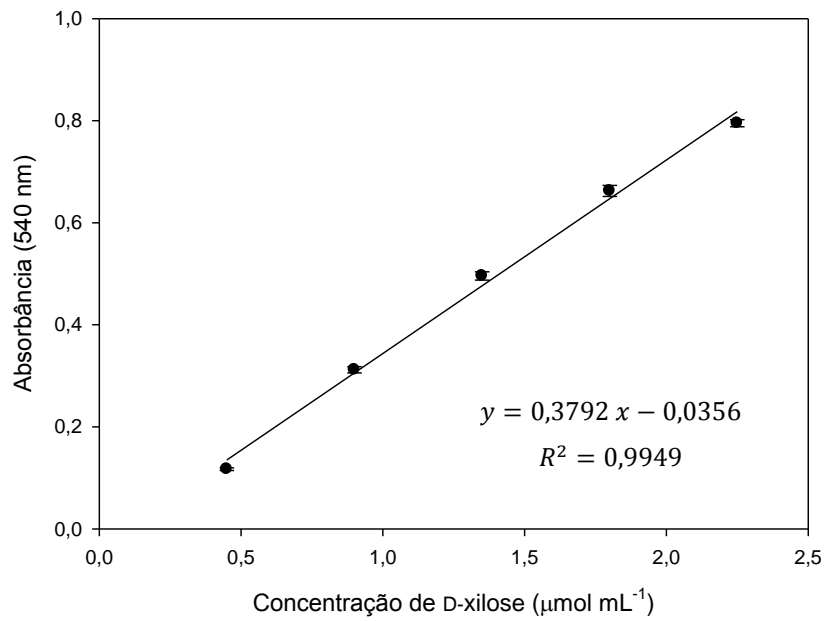


Figura 2A. Curva padrão de D-xilose.

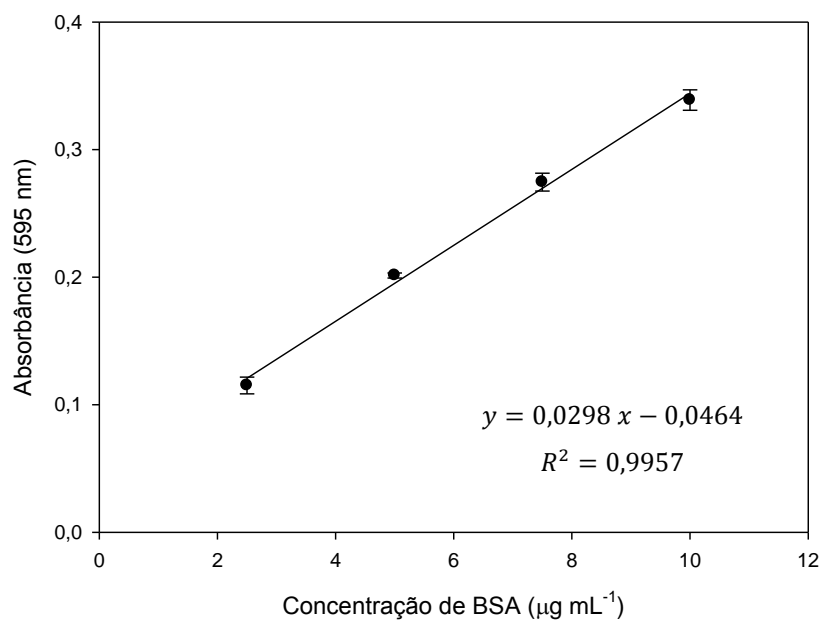


Figura 3A. Curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).