

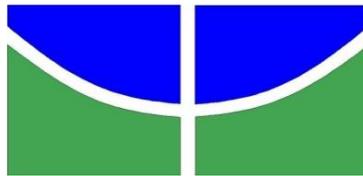
Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Produção de holocelulases por *Clonostachys
byssicola* cultivado em casca de soja - purificação
parcial e caracterização de uma endoglicanase**

Débora Lo Sciuto

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Co-Orientadora: Dra. Leonora Rios de Souza Moreira



**Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em
casca de soja - purificação parcial e caracterização de
uma endoglicanase**

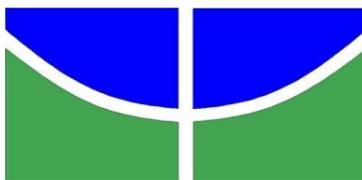
Débora Lo Sciuto

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Co-Orientadora: Dra. Leonora Rios de Souza Moreira

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Biologia Microbiana da Universidade
de Brasília como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre

Brasília, DF – Março de 2015



**Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em
casca de soja - purificação parcial e caracterização de
uma endoglicanase**

Débora Lo Sciuto

Banca Examinadora:

- ✓ Profa. Dra. Janice Lisboa de Marco
- ✓ Dra. Paula Marcela Duque Jaramillo
- ✓ Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha (Suplente)

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho - Orientador

Dra. Leonora Rios de Souza Moreira – Co-Orientadora

Brasília, DF – Março de 2015

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edivaldo Ximenes, por ter me recebido prontamente no laboratório, pela confiança, apoio e ensinamentos; pela ótima orientação e disponibilidade.

À minha co-orientadora, Dra. Leonora Moreira, pelo auxílio no experimento de hidrólise e discussão dos resultados, por me ensinar a utilizar o HPLC e o programa Statistica, por revisar diversas vezes minha dissertação, pela paciência, disposição e ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório: Helder Andrey, Antonielle Monclaro, Caio Gorgulho, Leonora Moreira, Paula Jaramillo, Bárbara Neumann, Juliana Infante, Guilherme Sperandio, Francilene Lopes, Karen Osiro, Brenda Camargo, Alonso Poma, Elaine Nascimento, Pedro Fontes, Pedro Hamann. Agradeço pela amizade, pelos momentos divertidos, pelos ensinamentos, pelas diversas confraternizações que me permitiram conhecê-los melhor e me sentir acolhida no grupo. Vocês são demais!

Agradeço especialmente ao Helder Andrey, pela amizade e auxílio nos diversos experimentos que realizei pela primeira vez.

Às técnicas Marísia e Margarete pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams, pela disposição e auxílio no trabalho com o HPLC.

Aos membros da banca examinadora, por terem prontamente aceito o convite.

À minha família, por todo o apoio e companheirismo. Eu não teria chegado até aqui sem vocês.

Apoio Financeiro

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro da CAPES, por meio de concessão de bolsa de estudos e pelos projetos de pesquisa: Redes Sisbiota (CNPq/563260/2010-6), Rede Centro Oeste (CNPq/563823/2010-0 e FAPDF/193.000.470/2011) Universal (CNPq/470265/2011-6), Pronex (FAPDF/193000584/2009) e INCT do Bioetanol/CNPq.

Sumário

Lista de Figuras	I
Lista de Tabelas	IV
Lista de Abreviaturas	V
Resumo	VI
Abstract	VII
1. Introdução	1
1.1. Composição da parede celular vegetal	2
1.2. Biomassa Lignocelulósica	3
1.2.1. Celulose	4
1.2.2. Hemicelulose	5
1.2.3. Lignina	8
1.2.4. Pectina	9
1.3. Principais enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica	11
1.3.1. Celulases	11
1.3.1.1. Celulossomas	15
1.3.2. Hemicelulases	17
1.3.3. Ligninases	19
1.3.4. Pectinases	19
1.4. Aplicações Tecnológicas de Celulases	20
1.4.1. Produção de Bioetanol	21
1.4.2. Indústria Alimentícia	21
1.4.3. Nutrição Animal	22
1.4.4. Indústria de Polpa e Papel	23

1.4.5. Formulação de Detergentes	24
1.4.6. Indústria Têxtil	24
1.5. <i>Clonostachys</i> spp.	27
1.5.1. <i>Clonostachys byssicola</i>	28
1.6. Casca de Soja	30
2. Justificativa	32
3. Objetivos	33
3.1. Objetivo Geral	33
3.2. Objetivos Específicos	33
4. Materiais e Métodos	34
4.1. Micro-organismo e Condições de Cultivo	34
4.2. Curva de Indução Enzimática	35
4.3. Fonte de Carbono	35
4.4. Substratos	35
4.5. Determinação da Atividade Enzimática	36
4.6. Etapas de Caracterização e Purificação	37
4.6.1. Ultrafiltração	38
4.6.2. Purificação	38
4.6.3. Eletroforese SDS-PAGE e Zimografia	38
4.6.4. Caracterização Enzimática	40
4.6.4.1. Efeito da Temperatura e pH	40
4.6.4.2. Avaliação da Termoestabilidade	40
4.6.4.3. Efeito de compostos fenólicos na atividade de CMC _{ase}	40
4.6.4.4. Efeito de íons metálicos na atividade de CMC _{ase}	41
4.6.4.5. Determinação de parâmetros cinéticos	41

4.7. Ensaio de Hidrólise Enzimática	41
4.7.1. Dosagem de glicose e açúcares redutores totais	42
4.7.2. Análise por HPLC das amostras do ensaio de hidrólise enzimática	43
4.7.3. Análise Estatística	43
5. Resultados e Discussão	44
5.1. <i>Screening</i> enzimático	44
5.2. Curva de Indução Enzimática	45
5.3. Purificação parcial de CMCCase	47
5.4. Efeito da temperatura na atividade de CMCCase	51
5.5. Efeito do pH na atividade de CMCCase	52
5.6. Avaliação da termoestabilidade de CMCCase	55
5.7. Atividade enzimática sobre diferentes substratos	57
5.8. Efeito de compostos fenólicos na atividade de CMCCase	58
5.9. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de CMCCase	62
5.10. Determinação dos parâmetros cinéticos	65
5.11. Ensaio de Hidrólise Enzimática	66
6. Conclusões	77
7. Perspectivas	77
8. Referências Bibliográficas	78
Anexo 1 – Protocolo para Identificação Molecular de <i>Clonostachys byssicola</i>	100

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração esquemática da parede celular vegetal	3
Figura 2. Ilustração esquemática da estrutura da celulose	5
Figura 3. Ilustração esquemática de alguns polímeros de hemicelulose encontrados nas paredes celulares das plantas. "Fer" representa esterificação com ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico)	7
Figura 4. Monolignóis constituintes da lignina	9
Figura 5. Ilustração esquemática dos principais polissacarídeos pécticos	10
Figura 6. Ilustração esquemática da degradação enzimática da celulose	15
Figura 7. Ilustração esquemática da degradação enzimática da hemicelulose	18
Figura 8. Ilustração esquemática do processo de <i>biopolishing</i> e <i>biostoning</i>	26
Figura 9. Visualização macroscópica de <i>Clonostachys byssicola</i> em meio BDA	29
Figura 10. Esquema da purificação parcial de CMCCase produzida por <i>C. byssicola</i>	37
Figura 11. Perfil de holocelulases produzidas por <i>C. byssicola</i> após crescimento por sete dias em meio líquido contendo casca de soja como fonte de carbono	44
Figura 12. Perfil de indução de CMCCase durante o cultivo de <i>C. byssicola</i> em casca de soja	46
Figura 13. Perfil de indução da atividade específica de CMCCase durante o cultivo de <i>C. byssicola</i> em casca de soja	46
Figura 14. Perfil cromatográfico do extrato bruto concentrado aplicado em coluna de exclusão molecular <i>Sephacryl S00</i>	47

Figura 15. Perfil cromatográfico das frações provenientes da cromatografia em coluna <i>Sephacryl</i> S100 em coluna de troca iônica <i>Q Sepharose Fast Flow</i> (QFF)	48
Figura 16. Perfil cromatográfico das frações provenientes da cromatografia em coluna QFF em coluna de troca iônica <i>DEAE Sepharose Fast Flow</i> (DEAE)	48
Figura 17. a) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12 % do extrato bruto concentrado (EBC), frações oriundas da coluna <i>Sephacryl</i> S100 (Cel-S100), <i>Q Sepharose Fast Flow</i> (Cel-QFF) e <i>DEAE Sepharose Fast Flow</i> (Cel-DEAE). b) Zimograma apresentando as atividades de CMCCase	49
Figura 18. Efeito da temperatura na atividade de CMCCase presente no extrato bruto concentrado (EBC), fração Cel-QFF e Cel-DEAE	51
Figura 19. Efeito do pH na atividade de CMCCase presente a) no extrato bruto concentrado; b) fração Cel-QFF e c) fração Cel-DEAE	53
Figura 20. Efeito do tempo de incubação a 40 e 50 °C na atividade de CMCCase presente no extrato bruto concentrado (EBC), fração Cel-QFF e Cel-DEAE	56
Figura 21. Atividade enzimática de β -glicosidase, CMCCase, FPase, mananase, pectinase e xilanase no extrato bruto concentrado (EBC), fração Cel-QFF e Cel-DEAE	57
Figura 22. Estrutura dos compostos fenólicos utilizados na análise de efeitos inibitórios e de desativação na atividade de CMCCase	58
Figura 23. Efeito inibitório e de desativação de compostos fenólicos (1 mg/mL) sobre atividade de CMCCase em a) extrato bruto concentrado; b) fração Cel-QFF e c) fração Cel-DEAE	59
Figura 24. Quantificação de açúcares redutores totais por DNS resultantes da hidrólise de avicel, carboximetilcelulose (CMC), papel de filtro (FP), manana e xilana por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	67

Figura 25. Quantificação de açúcares redutores totais por DNS resultantes da hidrólise da casca de soja 1 % e bagaço de cana de açúcar 1 % por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	68
Figura 26. Identificação e quantificação dos celossacarídeos liberados durante hidrólise de CMC 4 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	69
Figura 27. Identificação e quantificação dos celossacarídeos liberados durante hidrólise CMC 1 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	70
Figura 28. Identificação e quantificação dos celossacarídeos liberados durante hidrólise de papel de filtro em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	71
Figura 29. Identificação e quantificação dos manossacarídeos liberados durante hidrólise de manana 1 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	71
Figura 30. Identificação e quantificação dos xilossacarídeos liberados durante hidrólise de xilana 1 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	72
Figura 31. Identificação e quantificação dos sacarídeos liberados durante hidrólise de casca de soja 1 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	75
Figura 32. Identificação e quantificação dos sacarídeos liberados durante hidrólise de bagaço de cana de açúcar 1 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF	76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição bromatológica da casca de soja	31
Tabela 2. Resumo das etapas de purificação parcial de CMCase de <i>C. byssicola</i>	50
Tabela 3. Temperatura e pH descritos para maior atividade de CMCases produzidas por diferentes micro-organismos	54
Tabela 4. Efeito de íons metálicos e EDTA na concentração de 1 mM na atividade de CMCase do extrato bruto concentrado (EBC), frações Cel-QFF e Cel-DEAE	63
Tabela 5. Efeito de íons metálicos e EDTA na concentração de 10 mM na atividade de CMCase do extrato bruto concentrado (EBC), frações Cel-QFF e Cel-DEAE	64
Tabela 6. Efeitos de íons metálicos e EDTA na atividade de CMCase relatados na literatura ..	65

Lista de Abreviaturas

4-HB: 4-hidroxibenzóico

AA: atividade auxiliar

CBH: celobiohidrolase

CBM: módulo de ligação ao carboidrato

CDH: celobiose desidrogenase

Cel-DEAE: fração reunida da cromatografia utilizando coluna *HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow*

Cel-QFF: fração reunida da cromatografia utilizando coluna *HiTrap Q Sepharose Fast Flow*

Cel-S100: fração reunida da cromatografia utilizando coluna *Sephacryl S100*

CMC: carboximetilcelulose

CMCase: carboximetilcelulase

Dha: ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico

DNS: ácido 3,5-dinitro-salicílico

EB: extrato bruto

EBC: extrato bruto concentrado

EC: *Enzyme Commission*

EG: endoglicanase

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FP: papel de filtro

FPase: atividade sobre papel de filtro

GH: glicosídeo hidrolase

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

Kdo: ácido 2-keto-3-desoxi-D-mano-2-octulosônico

LPMO: polissacarídeo mono-oxigenase lítica

PS: parede secundária

SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida

UI: Unidade Internacioal

ρNPG: ρ-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo

Resumo

O fungo filamentoso *Clonostachys byssicola* foi cultivado por sete dias em meio líquido contendo casca de soja 1 % (m/v) como única fonte de carbono. A capacidade do fungo em secretar enzimas holocelulolíticas foi avaliada, sendo observadas atividades de CMCCase, FPase, mananase, pectinase e xilanase no extrato bruto. CMCCase (0,904 UI/mL) foi escolhida como principal alvo de investigação. O extrato bruto foi concentrado por ultrafiltração em membrana com retenção de 10 kDa, e CMCCase presente no extrato concentrado foi parcialmente purificada utilizando coluna cromatográfica de exclusão molecular (*Sephacryl S100*) e de troca iônica (*Q Sepharose* e *DEAE Sepharose Fast Flow*). CMCCase presente no extrato concentrado e frações reunidas oriundas das colunas de troca iônica foram caracterizadas. A enzima semi purificada apresentou maior atividade a 60-70 °C e pH 5,0, sendo termoestável a 40 °C e 50 °C e possui massa molecular de aproximadamente 48 kDa. Compostos fenólicos (vanilina, ácidos tânico, 4-hidroxibenzoico, ferúlico, ρ -coumárico e cinâmico) não tiveram efeito inibitório e de desativação sobre a atividade celulolítica. Os íons Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} na concentração de 10 mM inibiram atividade de CMCCase em até 70 %, 94 %, 100 % e 44 %, respectivamente; o íon Co^{2+} (10 mM) ativou a atividade enzimática das frações Cel-QFF e Cel-DEAE em 21 % e 25 %, respectivamente. Os valores de k_M e $V_{\text{máx}}$ de CMCCase foram 24,93 mg/mL e 2,14 UI/mL (no extrato concentrado); e 15,81 mg/mL e 0,59 UI/mL (na fração Cel-DEAE), respectivamente. Foram realizados ensaios de hidrólise enzimática de avicel, CMC, papel de filtro, manana e xilana e substratos lignocelulósicos (casca de soja e bagaço de cana de açúcar) com enzimas do extrato concentrado e fração Cel-QFF. Os principais produtos de hidrólise enzimática de CMC e papel de filtro foram glicose, celopentaose e celohexaose. A hidrólise enzimática de casca de soja liberou maior quantidade de açúcar que a hidrólise de bagaço de cana de açúcar, sugerindo que as enzimas secretadas durante o crescimento de *C. byssicola* possuem atividade enzimática mais proeminente sobre o substrato utilizado como fonte de carbono.

Abstract

The filamentous fungus *Clonostachys byssicola* was cultivated for seven days in liquid medium containing soybean hulls 1 % (w/v) as the sole carbon source. The fungus's ability to secrete holocellulolytic enzymes was evaluated and activities of CMCCase, FPase, mannanase, pectinase and xylanase were observed in the crude extract. CMCCase (0.904 IU/mL) was chosen as the main target of research. The crude extract was concentrated by ultrafiltration membrane with retention of 10 kDa, and CMCCase present in the concentrated fraction was partially purified using molecular exclusion (Sephacryl S100) and ion exchange chromatography columns (Q Sepharose and DEAE Sepharose Fast Flow). CMCCase present in the concentrated fraction and pooled fractions from the ion exchange columns were characterized. The semi purified enzyme exhibited higher activity at 60-70 °C and pH 5.0, being thermostable at 40 °C and 50 °C and has a molecular mass of approximately 48 kDa. Phenolic compounds (vanillin, tannic, 4-hydroxybenzoic, ferulic, ρ -coumaric and cinnamic acids) had no inhibitory and deactivation effects on cellulolytic activity. Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+} at a concentration of 10 mM inhibited CMCCase activity by 70 %, 94 %, 100 % and 44 %, respectively; Co^{2+} (10 mM) activated enzyme activity of the Cel-QFF and Cel-DEAE fractions by 21 % and 25 %, respectively. K_M and V_{max} values of CMCCase were found to be 24.93 mg/mL and 2.14 IU/mL (concentrated fraction); and 15.81 mg/mL and 0.59 IU/mL (Cel-DEAE fraction), respectively. Enzymatic hydrolysis of avicel, CMC, filter paper, xylan and mannan and lignocellulosic substrates (soybean hulls and sugar cane bagasse) were performed with enzymes of the concentrated fraction and Cel-QFF fraction. The main enzymatic hydrolysis products of CMC and filter paper were glucose, cellopentaose and cellohexaose. Enzymatic hydrolysis of soybean hulls released higher sugar amount than the hydrolysis of sugarcane bagasse, suggesting that the enzymes secreted during the growth of *C. byssicola* have more prominent enzyme activity on the substrate used as a carbon source.

1. Introdução

A preocupação com o esgotamento dos recursos de combustíveis fósseis e mudanças climáticas atribuídas a emissões antropogênicas de dióxido de carbono está levando a um forte interesse global na utilização de fontes de energia renováveis e neutras, como insumos químicos derivados de fontes vegetais (Doherty *et al.*, 2011); em especial resíduos lignocelulósicos não alimentícios como: bagaço de cana de açúcar; sabugo de milho; cascas de arroz, soja e aveia; palha de trigo, milho, sorgo; entre outros. A partir desta ideia de sustentabilidade, um conceito importante é o da biorrefinaria, o qual pode ser definido como uma instalação que integra processos de conversão de biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, rações e energia. O objetivo de uma biorrefinaria é otimizar o uso de recursos e minimizar os efluentes, maximizando os benefícios e o lucro (Embrapa Agroenergia, 2015).

A celulose é o recurso biológico natural renovável mais abundante na natureza. A produção de bioprodutos e bioenergia a partir de materiais lignocelulósicos renováveis menos onerosos é importante para o desenvolvimento sustentável dos seres humanos (Zhang *et al.*, 2006), uma vez que as reservas de combustíveis fósseis são limitadas e a queima destes combustíveis contribui significativamente para o aquecimento da atmosfera.

Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para o crescimento microbiano e produção de enzimas industriais. As celulasas são enzimas induzíveis, que são sintetizadas por micro-organismos durante o seu crescimento em materiais celulósicos (Rawat e Tewari, 2012). Vários tipos de micro-organismos podem produzir celulasas, incluindo fungos e bactérias. Em fungos filamentosos, a produção de enzimas que degradam a parede celular da planta (celulasas, hemicelulasas, pectinases e ligninases) é regulada principalmente em nível transcricional. Os genes são induzidos na presença de polímeros ou moléculas derivadas destes e reprimidos por condições de crescimento onde a produção destas enzimas não é necessária, tal como em presença de glicose (Aro *et al.*, 2005).

A maior parte das misturas de glicosídeo hidrolases comerciais utilizadas atualmente provém de espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* spp., em que *T. reesei* é a fonte mais explorada de celulasas e hemicelulasas para fins industriais. Enzimas novas, mais eficientes ou alternativas estão, contudo, no âmbito de contínua pesquisa, a fim de melhorar a eficiência

econômica da hidrólise enzimática, objetivando a redução da carga proteica, melhor estabilidade e reciclagem da enzima (Marjamaa *et al.*, 2013).

A aplicação biotecnológica de enzimas fúngicas para a degradação de resíduos agrícolas agrega valor à matéria-prima antes inutilizada, promovendo o estímulo à reciclagem desses materiais e criando novas perspectivas de produção de insumos industriais de maneira menos tóxica ao meio ambiente (Siqueira, 2010).

1.1. Composição da parede celular vegetal

A parede celular da planta é uma rede fibrilar da célula vegetal, responsável pelo suporte estrutural e mecânico, proteção contra patógenos e desidratação, sendo composta por celulose, hemiceluloses, lignina, pectina, enzimas e proteínas estruturais (McCann e Carpita, 2008; Siqueira e Filho, 2010). As composições destes componentes variam entre as espécies de plantas, bem como entre os distintos tipos de células.

A parede celular vegetal é subdividida em parede primária e secundária. A distribuição de celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre estas camadas (Figura 1). Ademais, a parede secundária é composta de PS1 (Parede Secundária 1), PS2 e PS3, onde PS2 é geralmente mais espessa que as outras e contém a maior parte da biomassa celulósica. A lamela média, que liga as células adjacentes, é composta principalmente de compostos pécticos e proteínas (Abramson *et al.*, 2010; Siqueira e Filho, 2010) e lignina (Pandey, 2009).

A parede primária é depositada durante o crescimento celular e precisa ser mecanicamente estável e suficientemente flexível para permitir a expansão das células, evitando a ruptura destas pela sua pressão de turgescência. A parede celular secundária é formada no interior da parede primária quando o crescimento celular cessa. A parede pode tornar-se espessa e mais forte, adquirindo uma forma distinta e propriedades especializadas. Cada tipo de célula vegetal madura tem uma parede secundária adaptada para sua função específica. A parede secundária é mais densa e menos hidratada em relação à parede primária; é composta de celulose e hemicelulose, sendo, muitas vezes, impregnada com lignina (Siqueira e Filho, 2010; Reiter, 2002).

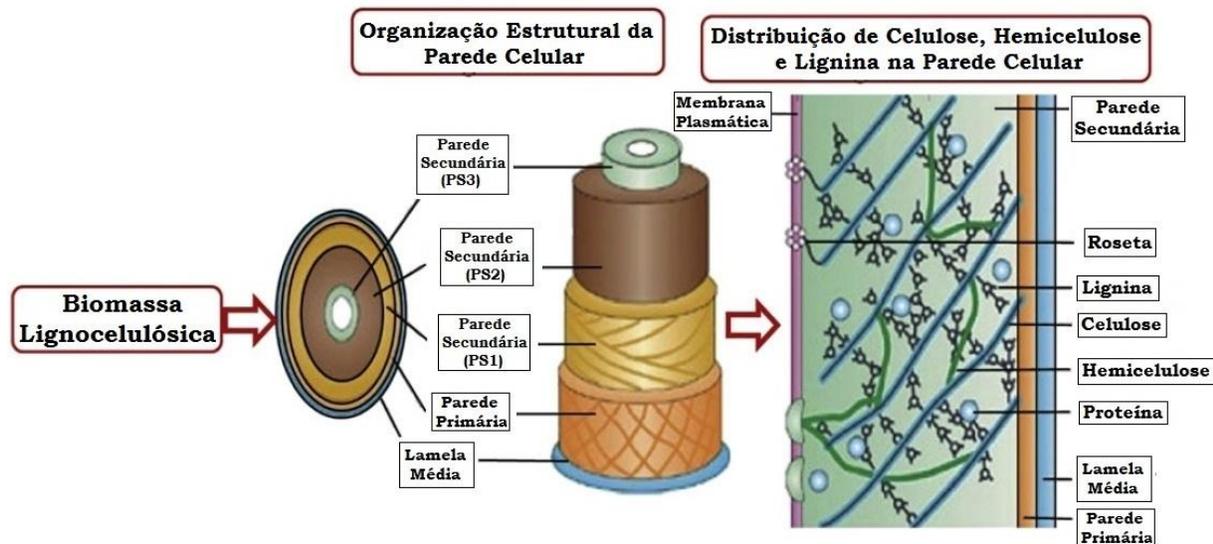


Figura 1. Ilustração esquemática da parede celular vegetal. Adaptado de Menon e Rao, 2012.

Os polissacarídeos da parede celular são sintetizados ao longo de várias vias e em diferentes subcompartimentos celulares. Resumidamente, a celulose é sintetizada em complexos hexagonais associados à membrana plasmática, contendo cada um, 36 módulos da celulose sintase, uma estrutura do tipo roseta. Após a sua síntese, a celulose é montada e integrada no interior da parede celular por meio de estreitas interações físicas com hemiceluloses, modificações enzimáticas e reticulação polimérica (ligação cruzada entre os polímeros). Uma rede altamente compacta de microfibrilas é montada e unida através de ligações de hidrogênio para formar a celulose cristalina (Abramson *et al.*, 2010). Estas microfibrilas servem como um arcabouço para a deposição de outros componentes da parede, tais como hemicelulose e pectina. Em contraste com a celulose, a maioria dos outros componentes da matriz é produzida no complexo de Golgi e levada à parede em vesículas secretoras (Lerouxel *et al.*, 2006; Abramson *et al.*, 2010).

1.2. Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o composto orgânico mais abundante e renovável na biosfera, constituída por três grandes grupos de macromoléculas: celulose, hemicelulose e lignina. Componentes menores são pectina, proteínas, lipídios, açúcares solúveis e minerais. A

quantidade de cada componente, a relação entre eles e o tipo de hemicelulose é largamente dependente do tipo de matéria-prima. A biomassa sob a forma de resíduos agroindustriais é produzida em grandes quantidades, gerando problemas ambientais e perda de recursos potencialmente valiosos (Lee, 1997; Pauly e Keegstra, 2008; Schirmer-Michel *et al.*, 2008).

Os materiais lignocelulósicos podem ser classificados em quatro grupos, baseados na sua fonte: 1) resíduos florestais, 2) resíduos sólidos urbanos, 3) resíduos de papel, e 4) resíduos de colheitas (Balat, 2011).

Como dito anteriormente, a composição estrutural e química de materiais lignocelulósicos é muito variável devido a influências genéticas, ambientais e suas interações. A composição química típica de materiais lignocelulósicos é de 48 % Carbono, 45 % Oxigênio e 6 % Hidrogênio em peso, sendo a matéria inorgânica um componente minoritário (Molina-Sabio e Rodríguez-Reinoso, 2004; Lee *et al.*, 2007).

1.2.1. Celulose

A celulose, uma fonte de bioenergia renovável, é o polissacarídeo mais abundante na natureza e o principal componente da parede celular da planta. É um polímero linear que consiste em resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Figura 2). Os resíduos de glicose consecutivos ao longo das cadeias de celulose são invertidos 180°, o que significa que o dissacarídeo (celobiose) é a unidade de repetição. Esta rotação faz com que a celulose seja altamente simétrica, uma vez que cada um dos lados da cadeia tem um número igual de grupos hidroxila. O acoplamento de moléculas de celulose adjacentes por ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals* resultam em um alinhamento paralelo e uma estrutura cristalina e insolúvel. Ademais, a celulose tende a conter regiões desordenadas, mais amorfas, além das regiões cristalinas (Zhang e Lynd, 2004; Horn *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

O alto peso molecular e ordenada estrutura terciária tornam a celulose natural insolúvel em água. As regiões cristalinas de celulose são mais resistentes à biodegradação que as partes amorfas, sendo que a celulose com baixo grau de polimerização é mais suscetível à ação de enzimas celulolíticas (Menon e Rao, 2012).

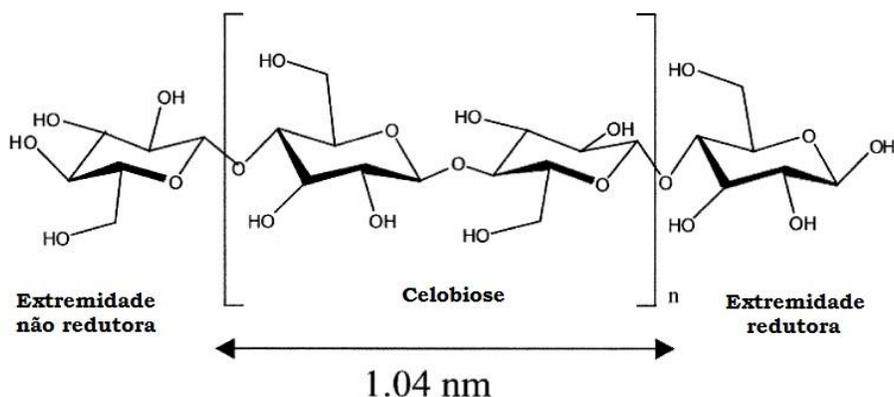


Figura 2. Ilustração esquemática da estrutura da celulose. *Adaptado de Zhang e Lynd, 2004.*

A molécula de celulose é estável, com uma meia vida de 5 a 8 milhões de anos para clivagem da ligação β -glicosídica a 25 °C na ausência de enzimas, de modo que a atividade microbiana é responsável pela maior parte da rotatividade do carbono na celulose. O fogo também desempenha um papel nesta rotatividade ao liberar CO₂, CO e CH₄ através da combustão do polímero durante as queimadas (Zhang *et al.*, 2006; Wilson, 2011; Liamayem e Ricke, 2012). De acordo com Deguchi *et al.* (2006), a celulose requer 320 °C, bem como uma pressão de 25 MPa, para que sua estrutura cristalina seja alterada para uma estrutura amorfa em água; esta transformação está associada com mudanças nas propriedades mecânicas e químicas da celulose nestas condições.

Os principais organismos produtores de celulose são as plantas superiores e algas, mas a produção deste polímero por algumas espécies de bactérias, fungos, invertebrados marinhos, micetozoários e amebas já foi documentada (Lynd *et al.*, 2002; Zhang e Lynd, 2004).

1.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose é uma estrutura amorfa e variável, constituída por diversos heteropolímeros formados por hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), bem como pentoses (D-xilose e L-arabinose) e pode conter ácidos de açúcar (ácidos urônicos), nomeadamente, ácido D-glicurônico, D-galacturônico e metilgalacturônico (Figura 3). Outros

açúcares, como L-ramnose e L-fucose, podem também estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxila dos açúcares podem ser parcialmente substituídos com grupos acetil. As hemiceluloses são geralmente classificadas de acordo com os principais resíduos de açúcar na cadeia principal do polímero (Aro *et al.*, 2005; Moreira e Filho, 2008; Gírio *et al.*, 2010; Liamayem e Ricke, 2012). Hemiceluloses comuns são xilanas, abundantes em gramíneas e angiospermas (madeira de bétula e álamo); mananas, abundantes em gimnospermas (pinheiros); e xiloglicano, abundante em muitas angiospermas (Horn *et al.*, 2012).

As xilanas compreendem cadeias lineares de resíduos de D-xilose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4; podem ser encontradas como glucuronoxilana, arabinoxilana, glucuronoarabinoxilana ou homoxilana. Glucuronoxilanas apresentam o mesmo esqueleto central da xilana, em que alguns resíduos de xilose contêm um grupo acetil nos carbonos C-2 ou C-3, bem como resíduos de ácidos urônicos (ácidos 4-O-metil-glicurônico ou glicurônico) unidos por ligações α -1,2. Ademais, as xilanas e glucuronoxilanas podem apresentar resíduos de L-arabinose, sendo então denominadas arabinoxilanas e glucuroarabinoxilanas, respectivamente (Polizeli *et al.*, 2005, Gírio *et al.*, 2010, Scheller e Ulvskov, 2010). Xiloglicano consiste de um esqueleto central formado por resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, em que 75 % destes resíduos estão ligados pelo C-6 a unidades de D-xilose; L-arabinose e D-galactose podem estar associados aos resíduos de xilose, formando cadeias laterais di- ou triglicosiladas (Caffall e Mohnen, 2009; Gírio *et al.*, 2010). Além disso, podem ser encontrados resíduos de ácido ferúlico esterificados em O-5 em algumas unidades de arabinose (Scheller e Ulvskov, 2010).

As mananas podem ser classificadas em quatro subfamílias: mananas lineares, glicomananas, galactomananas e as galactoglicomananas. Cada um destes polissacarídeos apresenta uma cadeia central contendo resíduos de manose (mananas lineares) ou uma combinação de resíduos de glicose e manose (glicomananas) unidos por ligações glicosídicas β -1,4. Além disso, a cadeia principal de manana e glicomanana pode ser substituída com cadeias laterais de galactose (galactomananas e galactoglicomananas, respectivamente) unidas por ligações do tipo α -1,6 (Moreira e Filho, 2008; Caffall e Mohnen, 2009).

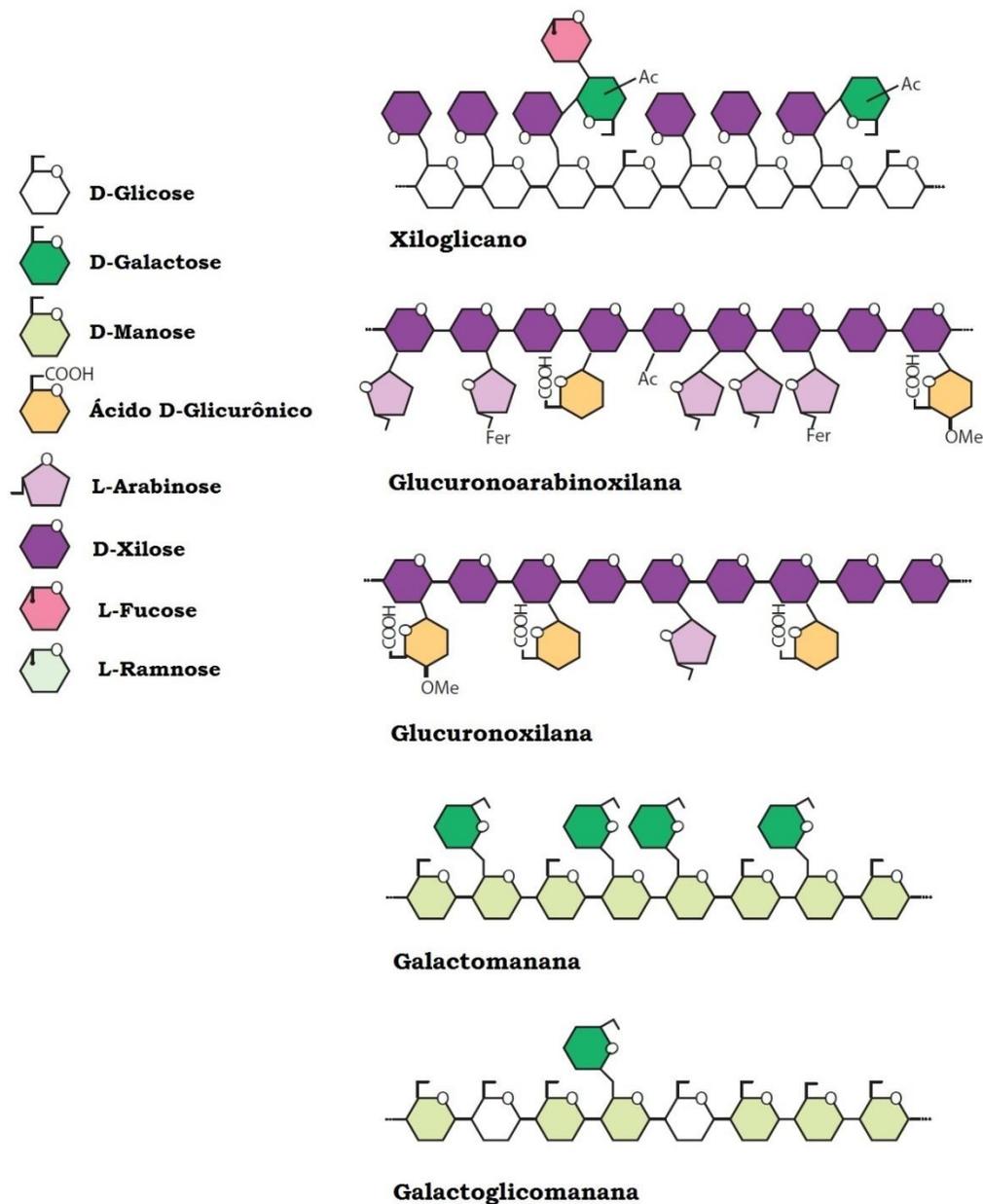


Figura 3. Ilustração esquemática de alguns polímeros de hemicelulose encontrados nas paredes celulares das plantas. "Fer" representa esterificação com ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico). Adaptado de Scheller e Ulvskov, 2010.

As hemiceluloses são normalmente ligadas a outros componentes da parede celular, tais como celulose, proteínas da parede celular, lignina e compostos fenólicos por ligações covalentes

e de hidrogênio, assim como por interações iônicas e hidrofóbicas (Peng *et al.*, 2012). A maioria das hemiceluloses são moléculas relativamente pequenas, contendo de 70 a 200 resíduos monossacarídeos, embora as hemiceluloses de angiospermas (*hardwood*) sejam moléculas maiores, com 150-200 resíduos (Filho, 1998).

1.2.3. Lignina

A lignina é o terceiro biopolímero terrestre mais abundante, representando cerca de 30 % do carbono da biosfera; é sintetizada por quase todas as plantas terrestres e algumas algas, proporcionando suporte estrutural e proteção contra o ataque de micro-organismos (Abramson *et al.*, 2010; Buranov e Mazza, 2008; Doherty *et al.*, 2011).

Há três grupos principais de lignina: 1) as ligninas de gimnospermas (*softwood*), 2) de angiospermas (*hardwood*) e 3) de gramíneas (não-lenhosas ou culturas herbáceas) (Buranov e Mazza, 2008).

A lignina é um complexo fenólico relativamente hidrofóbico e aromático, consistindo em três monolignóis, metoxilados a vários graus: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool ρ -cumarílico (Figura 4). Estes monolignóis são incorporados na lignina sob a forma de guaiacil (G), siringil (S) e ρ -hidroxifenil (H), respectivamente. As quantidades relativas destes monolignóis variam entre as diferentes fontes de lignina. Gimnospermas têm lignina dominada por G, enquanto que lignina de angiospermas é uma mistura de G e S. A lignina de gramíneas normalmente contém todos os três tipos de monolignóis (Horn *et al.*, 2012).

Durante o processo de lignificação, estes monolignóis produzem um complexo polímero tridimensional amorfo através de diversos tipos de ligações, o qual carece das unidades de repetição regulares e ordenadas encontradas em outros polímeros, tais como celulose e proteínas. Na biomassa lignocelulósica, a lignina é reticulada com carboidratos por ligações éter ou éster (Buranov e Mazza, 2008; Doherty *et al.*, 2011).

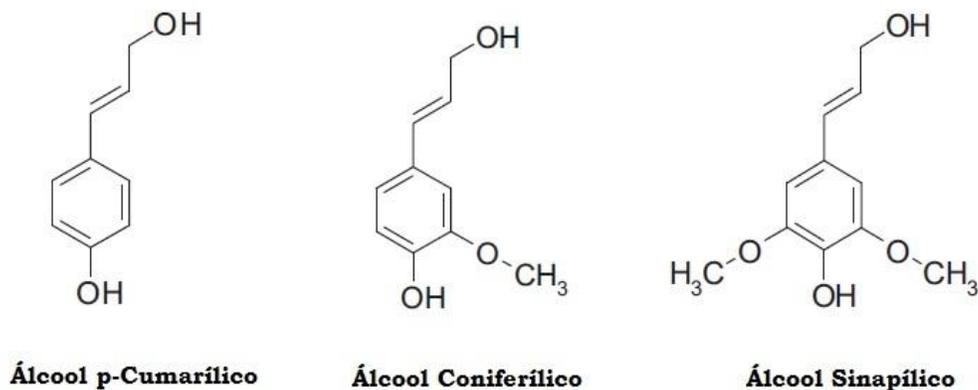


Figura 4. Monolignóis constituintes da lignina. *Adaptado de Doherty et al., 2011.*

1.2.4. Pectina

O polissacarídeo péctico, um polímero altamente complexo e heterogêneo, é composto principalmente por unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações α -1,4 que podem ser metilesterificadas ou acetiladas (Figura 5). As pectinas são mais abundantes nas paredes celulares primárias de plantas e lamela média; incluem homogalaturonana, ramnogalacturonana I, ramnogalacturonana II, apiogalacturonana e xilogalacturonana (Caffall e Mohnen, 2009; Agoda-Tandjawa *et al.*, 2012).

O polissacarídeo péctico mais abundante é a homogalaturonana, um homopolímero linear composto de unidades de ácido galacturônico, as quais podem ser metilesterificadas em C-6 ou acetiladas em O-2 ou O-3 (Mohnen, 2008; Caffall e Mohnen, 2009).

A cadeia principal da estrutura de ramnogalacturonana I é formada por unidades intercaladas de ácido galacturônico e ramnose; pode ser linear, como na mucilagem das sementes, ou ramificada nos resíduos de ramnose em C-4 por cadeias laterais de arabinana, galactana ou arabinogalactana (Caffall e Mohnen, 2009).

A estrutura de ramnogalacturonana II é muito complexa, com 12 tipos diferentes de resíduos glicosídicos, incluindo ácido acérico, ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico (Dha) e ácido 2-keto-3-desoxi-D-mano-2-octulosônico (Kdo). Moléculas de ramnogalacturonana II são

conhecidas por se autoassociar, formando dímeros através de ligação diéster-borato (Caffall e Mohnen, 2009; Palin e Geitmann, 2012).

Xilogalacturonana é caracterizada pela substituição por xilose e xilobiose em C-3 nos resíduos de ácido galacturônico da cadeia central; apiogalacturonana, pela substituição por apiose ou apibiose em C-2 (Caffall e Mohnen, 2009).

As moléculas de pectina são sintetizadas no complexo de Golgi e inseridas dentro da matriz extracelular por exocitose mediada por vesícula. A pectina é o polissacarídeo mais complexo estruturalmente e funcionalmente nas paredes celulares das plantas; possui funções no crescimento da planta, morfologia, desenvolvimento e defesa, servindo também como um polímero gelificante e estabilizador em alimentos diversos e produtos especializados. Além disso, apresenta efeitos positivos sobre a saúde humana e múltiplos usos biomédicos (Mohnen, 2008; Palin e Geitmann, 2012).

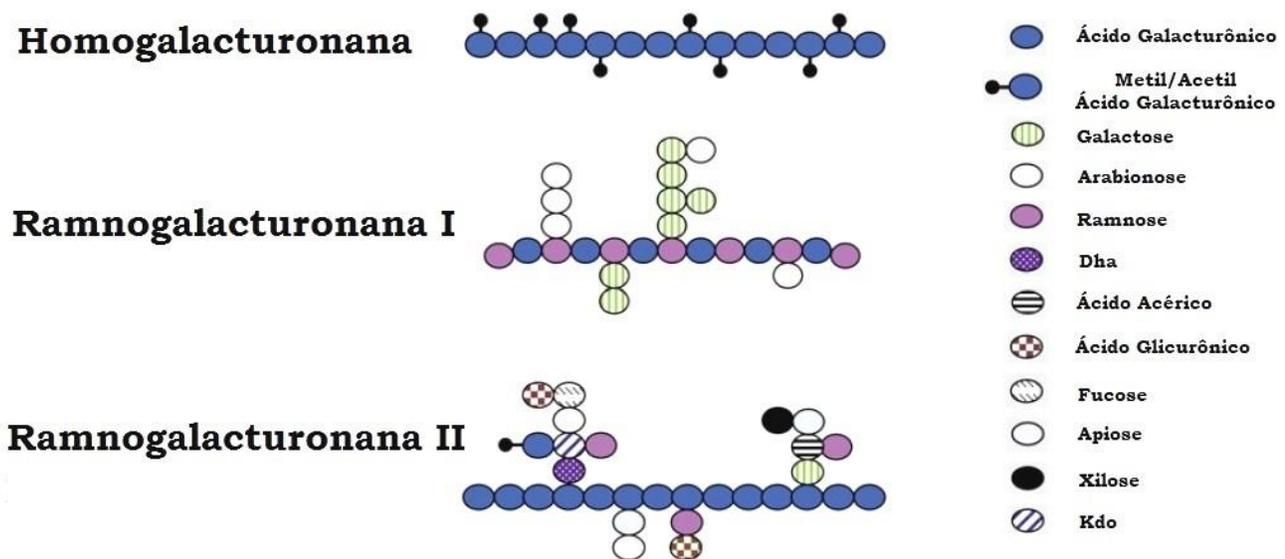


Figura 5. Ilustração esquemática dos principais polissacarídeos pécnicos. *Adaptado de Palin e Geitmann, 2012.*

1.3. Principais enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica

As enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica são agrupadas em quatro grupos principais: 1) celulases, 2) hemicelulases, 3) ligninases e 4) pectinases, de acordo com o substrato em que atuam.

1.3.1. Celulases

As celulases são produzidas por diversos micro-organismos, como fungos, leveduras e bactérias, bem como por alguns insetos, moluscos, nematoides e protozoários (Watanabe e Tokuda, 2001).

Baseado em suas propriedades estruturais, os componentes do sistema celulolítico podem ser classificados em três tipos principais: endoglicanases (EC 3.2.1.4), exoglicanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21), que atuam de forma sinérgica para degradar a celulose. O sinergismo é dito ocorrer quando a atividade exibida por misturas de componentes é maior do que a soma da atividade destes componentes avaliadas separadamente. O sinergismo entre endoglicanases e exoglicanases é mais amplamente estudado e está entre os mais importantes quantitativamente para hidrólise da celulose cristalina (Zhang e Lynd, 2004; Rawat e Tewari, 2012).

No processo de degradação da celulose, as endoglicanases clivam as ligações do tipo β -1,4 localizadas nas porções amorfas internas da cadeia de celulose, ao passo que as exoglicanases (celobiohidrolases) efetuam a clivagem dessas ligações a partir das extremidades do polímero, podendo atuar sobre as terminações redutoras (celobiohidrolase I) ou não redutoras (celobiohidrolase II) das cadeias glicosídicas. Tanto as endoglicanases quanto as exoglicanases liberam celobiose e outros oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. Vários autores relatam que estes oligossacarídeos podem inibir ambas as enzimas, diminuindo a taxa de sacarificação (Holtzapple *et al.*, 1990; Andrić *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2010; Kont *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2013). β -Glicosidases catalisam a hidrólise de celobiose e outros oligossacarídeos, gerando monômeros de glicose. Assim, ao reduzir a quantidade dos produtos inibitórios (oligossacarídeos), β -glicosidases permitem que as enzimas celulolíticas funcionem mais eficientemente (Chen *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

Existem vários fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose, a saber: substratos, nível da atividade celulolítica, condições de reação (temperatura, pH) e inibição pelo produto. Para melhorar o rendimento e velocidade de hidrólise enzimática, pesquisas têm sido focadas na otimização do processo de hidrólise e aumento da atividade de celulase. Além dos fatores citados acima, a taxa de hidrólise enzimática é dependente de vários aspectos estruturais da celulose; as características conhecidas por afetar esta taxa incluem: 1) estrutura molecular da celulose, 2) cristalinidade, 3) área de superfície da fibra, 4) grau de tumefação da fibra, 5) grau de polimerização e 6) presença de lignina ou outros materiais associados (Balat, 2011).

É importante notar que os sistemas enzimáticos celulolíticos muitas vezes contêm várias enzimas que podem ter preferências por diferentes formas de celulose (cristalina / amorfa; faces cristalinas específicas). Variação na afinidade para as diversas formas de celulose pode ser, em parte, consequência da variação na presença de Módulos de Ligação ao Carboidrato (CBMs - *Carbohydrate-Binding Modules*) (Horn *et al.*, 2012). Existem CBMs que reconhecem e se ligam à celulose cristalina, celulose não cristalina, quitina, β -1,3-glicanos, xilana, manana, galactana ou amido. CBMs que se ligam às superfícies cristalinas de polissacarídeos (módulo tipo A) podem estar anexados a uma variedade de glicosídeo hidrolases. Em contrapartida, CBMs que interagem com cadeias simples de polissacarídeos (tipo B) são anexos de enzimas que atuam sobre o polissacarídeo em questão. Por exemplo, celulases, xilanases e mananases podem conter CBMs tipo B que se ligam à celulose, xilana e manana, respectivamente. Dessa forma, o módulo tipo B mantém proximidade com o substrato alvo dentro de estruturas macromoleculares complexas, tais como a parede celular vegetal (Boraston *et al.*, 2004).

Quase todas as enzimas que degradam substratos insolúveis contêm um domínio de ligação ao substrato, o qual é normalmente associado ao domínio catalítico através de um peptídeo ligante flexível. No caso das celulases, em que esse tipo de domínio foi inicialmente descoberto, o domínio foi originalmente denominado “Domínio de Ligação à Celulose” e, em seguida, o nome foi alterado para “Módulo de Ligação ao Carboidrato”, de forma a incluir os outros tipos de domínios de ligação a polissacarídeos. Semelhantes aos domínios catalíticos de glicosídeo hidrolases, CBMs são divididos em famílias com base na similaridade de sequência de aminoácidos; desempenham uma função importante no reconhecimento do substrato pela enzima, direcionando e aproximando o domínio catalítico desta de forma a potencializar sua

atividade (Wilson, 2011; Menon e Rao, 2012; Gilbert *et al.*, 2013). CBMs também podem alterar a estrutura cristalina da celulose utilizando mecanismo não hidrolítico (Arantes e Saddler, 2010).

Sistemas celulolíticos podem estar associados em complexos multienzimático (chamados celulosomas) ou não associados, como enzimas individuais. Em ambos os casos, as enzimas possuem uma estrutura modular. As enzimas não associadas consistem geralmente de um domínio catalítico, responsável pela reação de hidrólise, e de um domínio de ligação à celulose, o qual medeia a ligação das enzimas ao substrato. Os dois domínios estão ligados por um peptídeo ligante, que deve ser suficientemente longo e flexível para permitir eficiente orientação e operação de ambos os domínios (Carrard *et al.*, 2000).

Ademais, celobiose desidrogenase (CDH), uma enzima que possui atividade oxidativa, participa do complexo celulolítico de vários fungos que degradam madeira. Esta enzima catalisa a oxidação de dissacarídeos unidos por ligações do tipo β -1,4 e polissacarídeos (celulose cristalina) aos seus ácidos aldônicos correspondentes. Os elétrons desta reação de oxidação são transferidos a aceptores de elétrons, como quinonas, radicais fenoxi e catiônicos, citocromo *c*, oxigênio molecular, Fe^{3+} , Cu^{2+} , entre outros (Baminger *et al.*, 1999; Henriksson *et al.*, 2000).

Um dos principais obstáculos encontrados pelas enzimas celulolíticas é o limitado acesso a grande parte do substrato que se encontra no interior das microfibrilas de celulose, as quais são altamente ordenadas e empacotadas. Tem sido sugerido que estas regiões inacessíveis são rompidas, dispersadas ou afrouxadas por proteínas não hidrolíticas, aumentando, assim, a área de superfície da celulose, tornando-a mais acessível para o complexo celulolítico. Esta fase inicial da sacarificação enzimática da celulose tem sido denominada amorfogênese. CBMs, expansinas, swolleninas e polissacarídeo mono-oxigenases fazem parte deste grupo de proteínas não hidrolíticas responsáveis pelo processo de amorfogênese da celulose (Arantes e Saddler, 2010; Gourlay *et al.*, 2012; Ekwe *et al.*, 2013).

Devido ao forte empacotamento das microfibrilas de celulose, a existência de outros fatores que tornam o substrato mais acessível às enzimas tem sido sugerida desde a década de 1950, por Reese (1956). Recentes estudos de proteínas bacterianas, classificadas como família CBM33 (*Carbohydrate-Binding Module 33*) e de proteínas fúngicas, classificadas como família GH61 (Glicosídeo Hidrolase 61) mostraram que o esquema clássico endo / exoglicanase é

apenas um modelo simplificado da degradação da celulose. Estas proteínas têm superfícies de ligação ao substrato planas e são capazes de clivar as cadeias de polissacarídeos na sua forma cristalina utilizando um mecanismo oxidativo, que depende da presença de íons metálicos divalentes e um doador de elétrons (como o ácido ascórbico ou a enzima CDH). Diversos estudos mostraram que as GH61 oxidam as unidades de glicose nos carbonos C-1, C-4 e até C-6. Genes de codificação de CBM33 e GH61 são abundantes nos genomas de micro-organismos que convertem biomassa e estas enzimas oxidativas representam um novo paradigma para a degradação de polissacarídeos recalcitrantes que podem ser de grande importância para o futuro da biorrefinaria (Horn *et al.*, 2012).

A recente descoberta de que os membros das famílias GH61 e CMB33 são, na verdade, polissacarídeo mono-oxigenases líticas (LPMO - *Lytic Polysaccharide Monooxygenase*) cobre-dependentes (embora possam utilizar outros íons metálicos divalentes) (Quinlan *et al.*, 2011; Horn *et al.*, 2012), exigiu uma reclassificação dessas famílias em uma categoria adequada. O banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes*, 2015) acomodou estas proteínas em uma nova classe, denominada Atividades Auxiliares (AA - *Auxiliary Activities*). Dessa forma, as GH61 e CMB33 foram classificadas em AA9 e AA10, respectivamente. A figura 6 apresenta uma ilustração esquemática da degradação enzimática da celulose.

Além disso, de forma geral, as expansinas compreendem uma família de proteínas vegetais que medeiam o relaxamento e afrouxamento da parede celular; apresentam vários papéis na fisiologia e desenvolvimento da planta, incluindo a expansão celular e amolecimento dos frutos; acredita-se que atuem pelo rompimento de interações não covalentes entre os componentes da parede celular. Ademais, novos tipos de proteínas têm sido descritos recentemente, um dos quais é a swolenina de *T. reesei*. Swolenina tem similaridade de aminoácidos com as expansinas vegetais, as quais alteram as fibras celulósicas sem apresentar atividade hidrolítica. Tem sido sugerido que a ação de swolenina tornaria as fibras de celulose mais acessíveis para a atuação de celulasas (Saloheimo *et al.*, 2002; Georgelis *et al.*, 2014). Proteínas funcionalmente similares também já foram encontradas em outros fungos (*Trichoderma pseudokoningii* e *Penicillium oxalicum*) (Zhou *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013), nematoide (*Globodera rostochiensis*) (Qin *et al.*, 2004) e bactérias (*Bacillus subtilis*, *Hahella chejuensis* e *Pseudomonas oryzihabitans*) (Kim *et al.*, 2009b, Lee *et al.*, 2010a; Qin *et al.*, 2013).

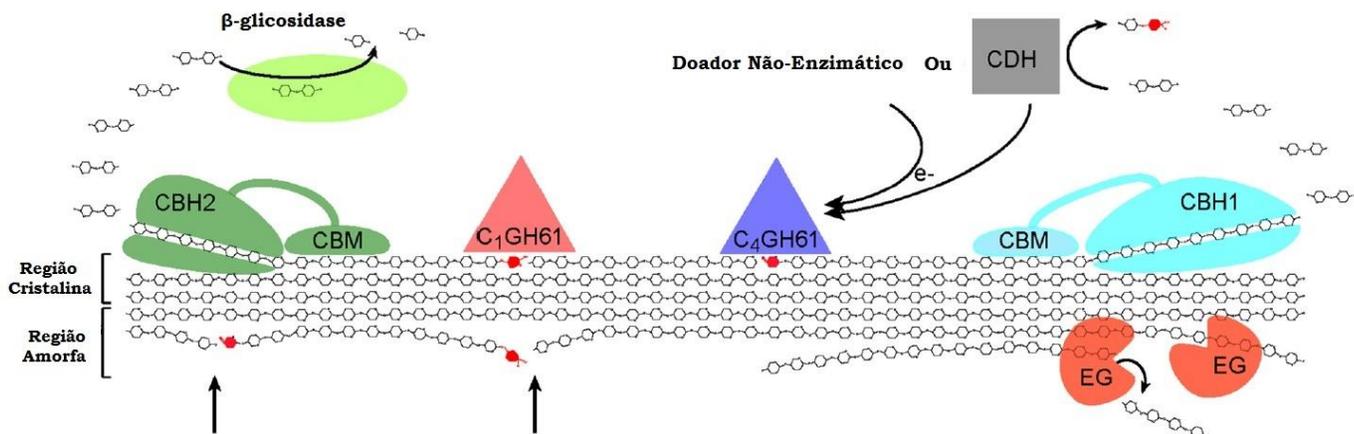


Figura 6. Ilustração esquemática da degradação enzimática da celulose. Abreviações: EG (endoglicanase); CBH (celobiohidrolase); CBM (módulo de ligação ao carboidrato); CDH (celobiose desidrogenase); GH61 (glicosídeo hidrolase 61). Açúcares oxidados estão coloridos em vermelho. As setas indicam novos pontos de ataque para CBHs, criados pelas GH61. *Adaptado de Horn et al., 2012.*

1.3.1.1. Celulossomas

O conceito de celulossoma foi inicialmente proposto utilizando o sistema celulolítico da bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum*. Este complexo enzimático é encontrado em algumas bactérias e fungos anaeróbicos, possuindo massa molecular de mais de 2 MDa e contendo cerca de 20 subunidades catalíticas diferentes, que variam em tamanho de cerca de 40 a 180 kDa. O celulossoma é formado por uma proteína estrutural (*scaffoldin*) que integra as várias subunidades catalíticas no complexo através de interações entre os domínios *cohesin* e *dockerin*, presentes na proteína estrutural e na subunidade catalítica, respectivamente. Além disso, esta proteína estrutural contém um CBM (responsável pela ligação do complexo ao substrato), sendo acoplada a célula (bacteriana ou fúngica) através de um conjunto de proteínas de superfície celular. Em *C. thermocellum*, o componente catalítico mais abundante no celulossoma é a celobiohidrolase CelS de 82 kDa, a qual atua de forma sinérgica com outras subunidades para degradar a celulose cristalina (Bayer *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2002; Bayer *et al.*, 2007).

Celulossomas de fungos anaeróbicos possuem tamanho e quantidade de polipeptídeos semelhantes ao celulossoma de *C. thermocellum*, porém o domínio de ancoragem (*dockerin*) das enzimas fúngicas não apresenta homologia de sequência em relação ao análogo bacteriano (Steenbakkers *et al.*, 2001). A diferença bioquímica mais acentuada entre o complexo enzimático bacteriano e fúngico é o produto final formado durante a hidrólise de celulose cristalina. A degradação da celulose pelo primeiro resulta na produção de celobiose, a qual é absorvida pela célula e, então, hidrolisada a glicose. Em contrapartida, celulossoma dos fungos *Piromyces* sp. E2, *Piromonas communis* P e *Neocallimastix frontalis* geram apenas glicose durante a degradação da celulose, não ocorrendo acúmulo significativo de oligossacarídeos, o que indica eficiente atividade de β -glicosidases (Schwarz, 2001; Steenbakkers *et al.*, 2003).

Além disso, os dois tipos de celulossoma diferem nas famílias de glicosídeo hidrolases (GH) presentes como componentes catalíticos. O celulossoma de *C. thermocellum*, amplamente caracterizado, contém celulasas de cinco famílias: GH 5 (CelG, CelB, CelE, CelH), GH 8 (CelA), GH 9 (CelD, CelF, CelK, cbhA, CelJ), GH 44 (CelJ) e GH 48 (CelS). Os celulossomas fúngicos, menos caracterizados, contêm enzimas classificadas como GH 5, GH 9, GH 48, GH 6 e GH 45, sendo as duas últimas não identificadas no complexo bacteriano (Steenbakkers *et al.*, 2003).

Resch *et al.* (2013) compararam o desempenho de enzimas livres (produzidas pelo fungo *T. reesei*) e de celulossoma da bactéria *C. thermocellum*. Foram observadas diferenças marcantes na sacarificação da celulose por estes dois sistemas na mesma carga proteica: as enzimas livres são mais ativas em biomassa pré-tratada termoquimicamente, enquanto o celulossoma apresentou notável vantagem na degradação de celulose pura cristalina (como avicel e papel de filtro). Quando combinados, estes sistemas exibem acentuada sinergia na degradação da celulose. De forma geral, este estudo destaca novas propostas para mistura destes dois sistemas a fim de aprimorar o desempenho enzimático nas diversas indústrias.

1.3.2. Hemicelulases

As hemicelulases facilitam a hidrólise da celulose ao expor as fibras desta, tornando-as mais acessíveis. Hemicelulases são proteínas de multi-domínio e, geralmente, contém os módulos catalíticos e não catalíticos estruturalmente distintos. Com base na sequência de aminoácidos de seus módulos catalíticos, as hemicelulases são glicosídeo hidrolases (GHs), que hidrolisam ligações glicosídicas, ou carboidrato esterases (CEs), que hidrolisam ligações éster de grupos substituintes ligados à cadeia central, sendo agrupadas em várias famílias de acordo com homologia de sequência (Shallom e Shoham, 2003; Menon e Rao, 2012).

As principais enzimas para a degradação da xilana a monômeros são as endoxilanases (EC 3.2.1.8), que clivam a cadeia principal de xilana em oligossacarídeos mais curtos, e β -xilosidase (EC 3.2.1.37), que cliva xilo-oligossacarídeos em xilose. Do mesmo modo, as principais enzimas para a degradação da manana são as endomananases (EC 3.2.1.78), β -manosídeses (EC 3.2.1.25) e β -glicosídeses (EC 3.2.1.21) (atua nas glicomananas) (Figura 7). No entanto, as xilanas e mananas geralmente possuem vários substituintes diferentes ligados à cadeia principal, tais como arabinose, ácido glicurônico, ácido ferúlico e p -cumárico (ligados à xilana); galactose (ligada à manana) e acetil (ligado a ambas). Dessa forma, é necessária a atuação de um grande número de enzimas auxiliares para a remoção destes substituintes laterais, a fim de dar acesso às enzimas que degradam a cadeia central. Algumas dessas enzimas auxiliares são α -L-arabinofuranosídeses, α -glicuronídeses, α -galactosídeses, acetilxilana / acetilmanana esterase, ácido ferúlico esterase, ácido p -cumárico esterase (Saha, 2003; Polizeli *et al.*, 2005, Chávez *et al.*, 2006; Van Dyk e Pletschke, 2012).

Curiosamente, β -manosídeses também são encontradas em animais superiores e estão envolvidas na degradação de glicoproteínas nos lisossomos. A deficiência dessas enzimas em humanos e ruminantes (denominado β -manosídeses) leva a retardo mental e anormalidades esqueléticas (Shallom e Shoham, 2003).

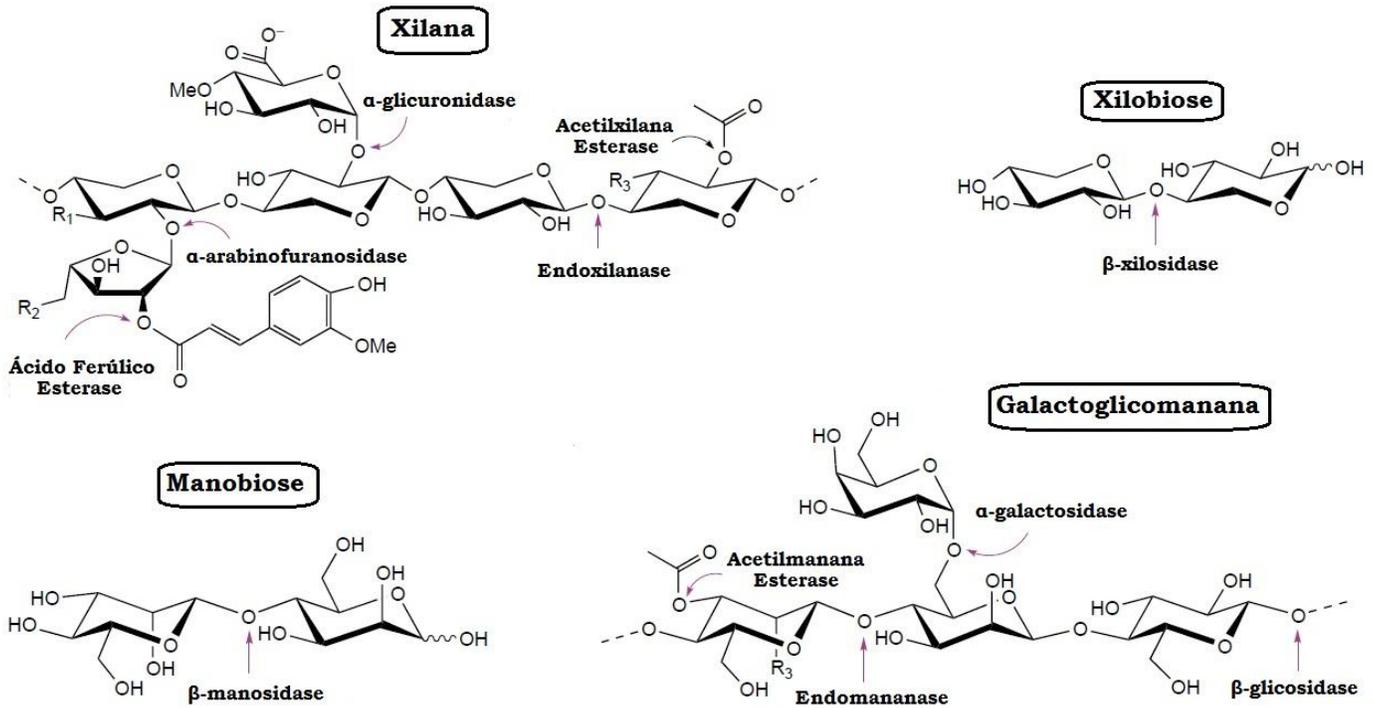


Figura 7. Ilustração esquemática da degradação enzimática da hemicelulose. Adaptado de Shallom e Shoham, 2003.

Muitas endoglicanases têm sido relatadas por hidrolisar xiloglicano como um substrato análogo a celulose. No entanto, poucas endoglicanases possuem uma elevada atividade em relação ao xiloglicano, com baixa ou nenhuma atividade em celulose ou derivados de celulose. Estas enzimas (EC 3.2.1.151) são denominadas xiloglicanase, xiloglicano hidrolase ou endoglicanase xiloglicano-específico (Menon e Rao, 2012).

Em geral, a maioria dos sistemas hemicelulolíticos é induzível, e os indutores moleculares são os correspondentes monossacarídeos ou dissacarídeos (por exemplo, xilose / manose ou xilobiose / manobiose), ou oligossacarídeos maiores. Um nível basal de expressão de algumas enzimas extracelulares e permeases deve existir para permitir a absorção dos indutores correspondentes. Em muitos micro-organismos, alguns dos genes relacionados com hemicelulases são expressos constitutivamente em níveis reduzidos (Shallom e Shoham, 2003).

1.3.3. Ligninases

Fungos da podridão-branca, como espécies pertencentes ao gênero *Phanerochaete* spp., são os micro-organismos que degradam a lignina de madeiras de forma mais eficiente. Considera-se que as enzimas inicialmente expressas por fungos durante o catabolismo da lignina sejam lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase e peroxidase versátil (possui ambas as atividades de manganês e lignina peroxidase) (Crestini *et al.*, 2011; Janusz *et al.*, 2013).

Devido à massa molecular relativamente elevada, lacase (60 – 80 kDa), manganês peroxidase (30 – 62,5 kDa) e lignina peroxidase (38 – 42 kDa) são demasiado grandes para penetrar a estrutura da madeira. Dessa forma, a degradação enzimática da lignina é ponderada ocorrer com a ajuda de vários compostos de baixa massa molecular, chamados mediadores (Pérez *et al.*, 2002; Janusz *et al.*, 2013).

Manganês peroxidase preferencialmente oxida íons de manganês Mn^{2+} , presentes em madeira e solos, em Mn^{3+} altamente reativo, que é estabilizado por agentes quelantes de fungos, tais como o ácido oxálico. O quelato Mn^{3+} atua como um mediador redox difusível de baixo peso molecular, o qual atua nas estruturas fenólicas da lignina dando origem à formação de radicais livres instáveis que tendem a se desintegrar espontaneamente (Hofrichter, 2002).

Lacases fúngicas são fenol-oxidases multi-cobre que catalisam a oxidação de numerosos compostos fenólicos e aminas aromáticas, utilizando oxigênio molecular como um aceptor terminal de elétrons. O núcleo fenólico é oxidado por remoção de um elétron, gerando radicais livres, os quais podem levar a clivagem do polímero (Pérez *et al.*, 2002; Janusz *et al.*, 2013).

Enzimas ligninolíticas são produzidas principalmente durante o metabolismo secundário, o qual é acionado em fungos da podridão-branca por depleção de nutrientes nitrogênio e/ou carbono (Janusz *et al.*, 2013).

1.3.4. Pectinases

As enzimas pectinolíticas são amplamente distribuídas em plantas superiores e micro-organismos, sendo de primordial importância para as plantas, pois ajudam na extensão da parede

celular e amolecimento de alguns tecidos vegetais durante a maturação e armazenamento (Jayani *et al.*, 2005).

Devido à grande diversidade na estrutura das pectinas, as enzimas pectinolíticas podem ser agrupadas em duas categorias: I) enzimas que atuam sobre as "regiões lisas", pouco ramificadas (homogalacturonana) e II) enzimas que atuam sobre regiões mais ramificadas (ramnogalacturonana) (Yadav *et al.*, 2009).

O grupo de enzimas que está envolvido na degradação da "região lisa" inclui: 1) enzimas de-esterificantes, isto é, pectina metil-esterase e pectina acetil-esterase, que removem resíduos metil e acetil da cadeia principal, respectivamente; 2) enzimas despolimerizantes, que catalisam a clivagem da ligação α -1,4 entre os resíduos de ácido galacturônico. As enzimas despolimerizantes atuam por dois mecanismos diferentes: a) hidrólise (poligalacturonases) e b) via mecanismo de trans-eliminação (pectina liases). Dependendo do padrão de ação, ou seja, aleatório ou pela extremidade não-redutora, estas enzimas são denominadas endo ou exo, respectivamente (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2009).

Os grupos de enzimas que estão envolvidas na degradação da região mais ramificada da pectina são ramnogalacturonana hidrolase, ramnogalacturonana liase, ramnogalacturonana ramnohidrolase e ramnogalacturonana galactohidrolase (Yadav *et al.*, 2009).

Ademais, há outras enzimas acessórias envolvidas na degradação das cadeias laterais de pectinas, incluindo α -arabinofuranosidase, endoarabinase, β -galactosidase, endogalactanase, β -xilosidase e diversas esterases (Yadav *et al.*, 2009; van den Brink e de Vries, 2011).

1.4. Aplicações Tecnológicas de Celulases

As enzimas celulolíticas, empregadas isoladamente ou em conjunto com outras enzimas (hemicelulases, pectinases, proteases, amilases), têm sido utilizadas em diversas aplicações tecnológicas, como: sacarificação da biomassa lignocelulósica, indústria alimentícia, nutrição animal, indústria de polpa e papel, formulação de detergentes e sabão em pó, indústria têxtil, entre outras.

1.4.1. Produção de Bioetanol

A sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos como bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho, cascas e palhas de diversos cereais, serragem e resíduos florestais para produção de biocombustíveis é uma das aplicações de celulases mais notórias atualmente (Kuhad *et al.*, 2011).

Os resíduos lignocelulósicos representam o recurso renovável mais abundante disponível para a humanidade, mas a sua utilização é limitada devido à falta de tecnologias de custo eficaz. A bioconversão destes materiais ajudaria a aliviar a escassez de alimentos e rações animais, auxiliar o problema de descarte de resíduos e diminuir a dependência do homem em relação aos combustíveis fósseis ao fornecer uma fonte conveniente e renovável de energia sob a forma de glicose (Sukumaran *et al.*, 2005).

O processo de sacarificação pode ser dividido em duas etapas: hidrólise primária e secundária. A hidrólise primária envolve a ação de endoglicanases e celobiohidrolases e ocorre na superfície do substrato sólido liberando açúcares solúveis, com grau de polimerização igual ou inferior a 6. Este passo de despolimerização é o passo limitante de todo o processo de hidrólise da celulose. A hidrólise secundária ocorre na fase líquida, envolvendo a hidrólise de celobiose e outros oligossacarídeos a monômeros de glicose por β -glicosidases (Binod *et al.*, 2011).

Desta forma, o processo de produção de bioetanol compreende: 1) a hidrólise enzimática (principalmente por celulases) da estrutura lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, 2) fermentação dos açúcares e 3) destilação do caldo fermentado. A etapa inicial é uma fase crucial, que determina principalmente a eficiência global do processo (Binod *et al.*, 2011).

1.4.2. Indústria Alimentícia

As enzimas celulolíticas são utilizadas na indústria alimentícia, principalmente na fabricação de bebidas ao auxiliarem a produção de sucos, vinhos e cervejas. Celulases e pectinases são comumente usadas no processo de maceração da fruta, aumentando o rendimento

do suco e extração de substâncias importantes da polpa, além de reduzir o tempo de processamento (Bhat, 2000; Karmakar e Ray, 2011).

β -Glicosidases aprimoram a qualidade organoléptica de produtos derivados de frutas através da hidrólise de precursores glicosídicos flavorizantes, melhorando o aroma, textura e sabor de sucos e vinhos. No caso de sumos cítricos, α -ramnosidase e β -glicosidase catalisam a hidrólise do glicosídeo naringina, responsável, em parte, pelo amargor do suco (Gunata *et al.*, 2000). Celulases também são utilizadas na clarificação e redução da viscosidade de sucos e vinhos, além de aumentar a eficiência da fermentação na fabricação de cerveja e panificação (Fukasawa *et al.*, 2007).

Endoglicanases hidrolisam β -glicanas, que são os principais polissacarídeos não amiláceos de cereais. Dessa forma, estas enzimas são empregadas para melhorar o processo de maltagem e brassagem (maceração) da cevada (e outros cereais) ao reduzir a viscosidade do mosto, uma vez que a viscosidade é decorrente do alto teor de β -glicana. Este tratamento, por sua vez, melhora a filtrabilidade do mosto, facilitando o preparo da cerveja (James *et al.*, 1975; Blum *et al.*, 2013).

Ademais, celulases, juntamente com pectinases, são utilizadas para extração de carotenoides, utilizados como corante de alimentos (Çinar, 2005)

1.4.3. Nutrição Animal

As celulases tem potencial aplicação na indústria de alimentação animal consumida por aves domésticas, suínos, ruminantes, bem como animais de estimação e peixes (para piscicultura) (Bhat, 2000; Karmakar e Ray, 2011).

Preparações enzimáticas contendo celulase, hemicelulase e pectinase são utilizadas para melhorar o valor nutricional de forragens. Diversos componentes vegetais como dextrinas, inulina, lignina, pectina, β -glicana e oligossacarídeos podem agir como fatores antinutricionais para diversos animais. Dessa forma, as enzimas atuam na hidrólise destes componentes, gerando substâncias facilmente absorvíveis e, assim, melhorando o ganho de peso, saúde e desenvolvimento dos animais (Kuhad *et al.*, 2011).

Como dito no tópico anterior, a presença de β -glicana é um fator que contribui para a viscosidade do conteúdo intestinal e, assim, pode afetar negativamente a digestibilidade do alimento, absorção de nutrientes e taxa de crescimento de alguns animais. Endoglicanases hidrolisam este polissacarídeo, diminuindo a viscosidade do conteúdo no trato digestivo, além de auxiliar o processo de digestão (Blum *et al.*, 2013).

1.4.4. Indústria de Polpa e Papel

Na indústria de polpa e papel, celulasas têm sido empregadas na polpação biomecânica, modificação das propriedades da polpa e folhas de papel e remoção de tintas de fibras recicladas, além de melhorar a drenagem (*freeness*), refinamento (*beatability*) e operabilidade (*runnability*) de fábricas de papel (Bhat, 2000; Sukumaran *et al.*, 2005). A taxa de drenagem de uma polpa (taxa de perda de água durante a fabricação do papel) determina a velocidade de operação da máquina, de forma que maior drenabilidade permite maior velocidade de funcionamento do moinho, reduzindo o tempo e custo do processo de polpação (Kamaya, 1996; Kirk e Jeffries, 1996; Bhat, 2000).

O pré-tratamento da polpa com celulasas pode reduzir o tempo necessário para a obtenção da polpa com o grau de refino desejado, resultando assim em uma economia de energia de cerca de 20 %, com consequente redução do custo do processo, sem prejuízo das propriedades do material (Bhardwaj *et al.*, 1996; Kamaya, 1996). As endoglicanases desempenham papel fundamental na melhora do refinamento e drenagem da polpa, sendo essenciais para o aprimoramento de fibras recicladas, as quais possuem propriedades inferiores em relação às fibras virgens (Kamaya, 1996; Oksanen *et al.*, 2000; Dienes *et al.*, 2004).

As enzimas celulolíticas também são utilizadas para liberar as partículas de tinta ligadas às fibras celulósicas, as quais são posteriormente removidas por flotação. Neste processo, importante para a reciclagem de papéis, são empregadas celulasas neutras ou alcalinas juntamente com surfactantes e ação mecânica (Kirk e Jeffries, 1996; Karmakar e Ray, 2011). A utilização das celulasas no processamento da polpa deve ser realizada de forma moderada a fim de evitar a despolimerização excessiva da celulose (Kirk e Jeffries, 1996).

1.4.5. Formulação de Detergentes

Diferentes enzimas celulolíticas capazes de modificar a estrutura das fibras celulósicas são adicionadas a formulações de sabão em pó e detergentes a fim de melhorar o brilho da cor, alvura, maciez da roupa e remoção de partículas de sujeira aprisionadas no interior da rede de microfibrilas (Bhat, 2000; Rähse, 2014). Endoglicanase III (EG III) e, em menor dosagem, Celobiohidrolase I (CBH I) de *Trichoderma* spp. são comumente utilizadas em detergentes para limpeza e melhor acabamento de tecidos (Kottwitz e Schambil, 2005). Clarkson *et al.* (1995) relataram a capacidade de EG III de restaurar a cor em tecidos de algodão; a restauração do brilho e coloração ocorre pela remoção das fibrilas superficiais desbotadas e danificadas que se acumulam sobre o vestuário com o tempo.

1.4.6. Indústria Têxtil

A aplicação de celulases no processamento têxtil começou no final dos anos 1980 (Araújo *et al.*, 2008). As celulases têm alcançado o sucesso mundial na indústria têxtil e de lavanderia por sua capacidade de modificar fibras celulósicas de uma maneira controlada e desejada, de modo a melhorar a qualidade dos tecidos. *Biostoning* (bioestonagem) e *biopolishing* (biopolimento) são as aplicações têxteis mais conhecidas de celulases (Bhat, 2000).

Tradicionalmente, o processo de *stonewashing* (estonagem) tem sido realizado com pedras-pomes a fim de se obter uma aparência desgastada desejável do denim, aumentando sua suavidade e flexibilidade. No entanto, a utilização de pedras-pomes na lavagem destes vestuários possui desvantagens, uma vez que a sobrecarga destas pode resultar em sérios danos físicos aos equipamentos (desgaste rápido das máquinas e entupimento dos locais de drenagem pelo material particulado proveniente das pedras) e peças de vestuário (perda excessiva da resistência do tecido devido à forte abrasão gerada neste tipo de lavagem), além da necessidade de remoção manual das pedras dos bolsos e pregas das roupas (Bhat, 2000; Heikinheimo *et al.*, 2000, Moreira *et al.*, no prelo 2015). Em decorrência das desvantagens apresentadas por este tradicional processo de lavagem, as pedras-pomes têm sido substituídas por enzimas celulolíticas. A lavagem realizada com o auxílio das celulases (*biostoning*) produz a aparência

desejada e um acabamento mais suave, além de permitir até 50 % maior carga de jeans na máquina, em substituição à carga de pedras (Belghith *et al.*, 2001).

O aspecto envelhecido e desbotado do denim é obtido pela remoção não homogênea do corante índigo aderido às microfibrilas superficiais presentes no tecido, resultando em um contraste entre vários tons de azul. No processo de *biostoning*, utilizado para obtenção de tal efeito, as celulases atuam sobre as fibras superficiais presentes no tecido de algodão, enfraquecendo-as. A ação mecânica no ciclo de lavagem remove estas fibras enfraquecidas, liberando o corante índigo aderido e revelando a camada de fibras interna não corada (Cavaco-Paulo, 1998; Csiszár *et al.*, 1998; Bhat, 2000). Heikinheimo *et al.* (2000) relataram que endoglicanase II (EG II) purificada de *Trichoderma reesei* é muito eficaz na remoção do corante do denim, produzindo um bom efeito desbotado no tecido. Em contrapartida, Celobiohidrolase I (CBH I) não gerou tal efeito, mesmo quando utilizada em alta dosagem. Estes resultados ratificam que endoglicanases são as enzimas necessárias utilizadas pra tal propósito.

A principal desvantagem de *biostoning* é a forte tendência do corante liberado ser redepositado no tecido, fenômeno conhecido como *backstaining* (re-coloração). Tal fenômeno diminui o contraste entre a trama (fio horizontal não tingido) e o urdume (fio vertical tingido) do denim (Bhat, 2000). O mecanismo básico de redeposição do corante índigo envolve a ligação do corante às enzimas celulolíticas adsorvidas na superfície das fibras de celulose (Cavaco-Paulo, 1998; Anish *et al.*, 2007). Dessa forma, a utilização de celulases com menor tendência a adsorção e/ou agentes que liberam a enzima adsorvida, como detergentes e proteases, é conveniente para redução de *backstaining* (Cavaco-Paulo, 1998; Araújo *et al.*, 2008). Ademais, estudos indicam que celulases neutras de *Humicola insolens* causam menor redeposição de corante que celulases ácidas de *Trichoderma reesei*, sugerindo que o pH é um fator importante no controle da redeposição (Campos e Cavaco-Paulo, 2000; Miettinen-Oinonen *et al.*, 2004).

Celulases, principalmente endoglicanases, também são utilizadas para melhorar a aparência de tecidos celulósicos pela remoção das microfibrilas salientes da superfície do fio, processo denominado *biopolishing* (biopolimento). Este processo aumenta a maciez e suavidade do tecido de modo permanente, reduzindo a formação de *pilling* (fibras aglomeradas) na superfície da roupa (Bhat, 2000; Csiszár *et al.*, 2001; Miettinen-Oinonen *et al.*, 2005, Moreira *et al.*, no prelo 2015). A figura 8 ilustra o processo de *biopolishing* e *biostoning*.

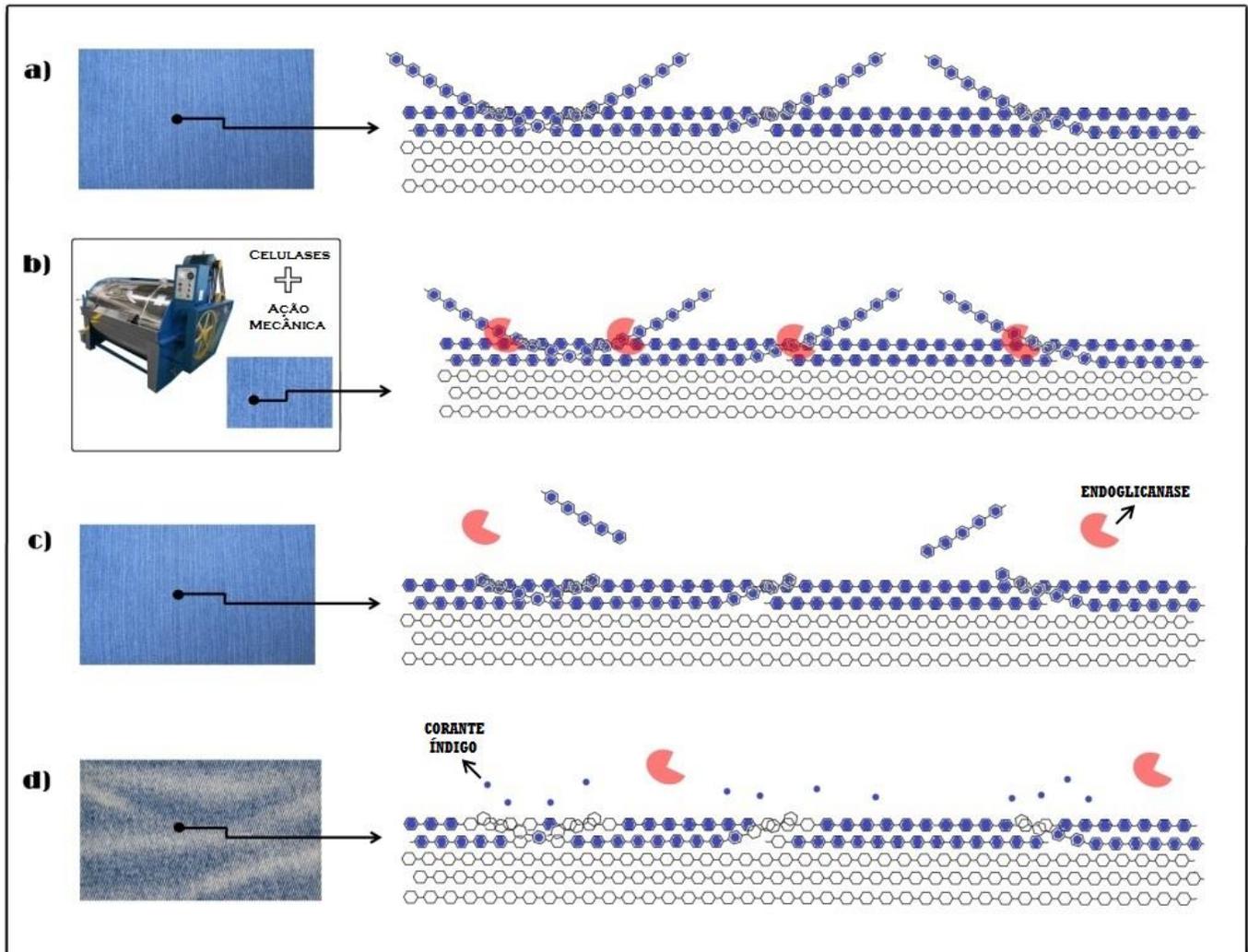


Figura 8. Ilustração esquemática do processo de *biopolishing* e *biostoning*: **a)** denim não tratado, apresentando microfibrilas salientes na superfície do tecido; **b)** processo de lavagem, onde as endoglicanases atuam nas microfibrilas, enfraquecendo-as; **c)** a ação mecânica no ciclo de lavagem remove as microfibrilas enfraquecidas (*biopolishing*); **d)** corante índigo aderido à rede fibrilar do tecido é liberado, revelando a camada de fibras interna não-corada (*biostoning*). Adaptado de Moreira et al., 2015 (no prelo).

1.5. *Clonostachys* spp.

Os fungos filamentosos do gênero *Clonostachys* spp. pertencem à família Bionectriaceae, ordem Hypocreales e filo Ascomycota; são caracterizados por geralmente apresentarem conidióforos dimórficos, ou seja, dois tipos (penicilado e verticilado) podem ocorrer no mesmo organismo e, ocasionalmente, serem formados juntos na mesma vertente de hifas (Schroers, 2001). Além disso, a forma assimétrica dos conídios é uma característica típica deste gênero. Este formato é determinado pela extrusão lateral do conídio jovem a partir de uma abertura da fiálide; assim, o hilo é deslocado e o conídio ligeiramente curvado. Como consequência desta assimetria, os conídios são arranjados em cadeias imbricadas (Schroers *et al.*, 1999).

Clonostachys spp. é um gênero cosmopolita, sendo comumente encontrado em solos e restos vegetais em diversas regiões: tropicais, temperadas, subárticas e desérticas (Sutton *et al.*, 1997). As espécies de *Clonostachys* spp. são saprófitas, micoparasitas, liquenícolas (parasita de líquens) ou habitantes de árvores recentemente mortas e folhas em decomposição (Schroers, 2001).

A espécie *C. rosea* é a mais estudada deste gênero, principalmente pelo seu grande potencial antagônico contra fungos patógenos de plantas (Sutton *et al.*, 1997; Nobre *et al.*, 2005; Hoopen *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2011), nematoides parasitas de plantas (Zhang *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2010) e insetos, como *Oncometopia tucumana* e *Sonesimia grossa* (Hemiptera:Cicadellidae), vetores de fitopatógenos (Toledo *et al.*, 2006).

C. rosea é utilizado como agente de controle biológico por combater e prevenir ataques de diversos fungos fitopatogênicos, sendo empregados diversos mecanismos de ação: competição por nutrientes, parasitismo, antibiose, indução de resistência na planta hospedeira e produção de enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários (Sutton *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2001; Gan *et al.*, 2007; Roberti *et al.*, 2008).

O mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, é uma doença grave que ameaça a produção de culturas comercialmente importantes como tomate, uva, maçã, pera, cereja, morango, kiwi, berinjela, cenoura, alface, pepino e pimentão (Mouekouba *et al.*, 2014). *C. rosea* tem se mostrado eficiente em controlar a doença ao proteger folhas, flores e frutos da infecção

por *B. cinerea* e suprimir a esporulação do patógeno através do parasitismo e competição por nutrientes (Sutton *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2003; Nobre *et al.*, 2005; Cota *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012). A atividade micoparasítica tem sido atribuída à secreção de enzimas que degradam a parede celular, incluindo quitinases, β -1,3-glicanases e proteases (Inglis e Kawchuk 2002; Roberti *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2007; Chatterton e Punja 2009).

Kosawang *et al.* (2014) relataram a capacidade da cepa *C. rosea* IK726 em detoxificar compostos tóxicos produzidos por determinadas espécies de *Fusarium* spp., os quais podem afetar de forma adversa animais e seres humanos.

Estudos relatam a produção de uma enzima hidrolítica, lovastatina esterase, por *Clonostachys compactiuscula*. Esta enzima cliva uma ligação ester da lovastatina, gerando o composto monocolina J, o qual inibe uma enzima envolvida na produção de colesterol. Assim, lovastatina esterase pode ser utilizada para desenvolvimento de melhores fármacos para o tratamento da hipercolesterolemia (Schimmel *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2006).

1.5.1. *Clonostachys byssicola*

O fungo *Clonostachys byssicola*, assim como seu teleomorfo *Bionectria byssicola*, é comumente encontrado em regiões neotropicais; possui conidióforos dimórficos, sendo que os conidióforos primários são verticilados e ramificados de forma variável, frequentemente com longos ramos laterais oriundos de sua base; os conidióforos secundários bi- ou pentaverticilados são densamente agregados, apresentado estipes (hastes) curtas; fiáides são geralmente divergentes em ângulos agudos (Schroers, 2001); conídios hialinos, ovoides e levemente curvados (Moreira, 2012). As colônias deste fungo alcançam, em média, 50 mm em sete dias a 24 °C, apresentando superfície não pigmentada ou levemente amarelada a alaranjada e micélio algodinoso (Schroers, 2001). (Figura 9).

No entanto, a identificação de espécies pertencentes ao gênero *Clonostachys* spp. é notoriamente difícil através de métodos tradicionais, ou seja, aqueles baseados em caracteres morfológicos. Alvindia e Hirooka (2011) relataram características coloniais e morfológicas de *C. byssicola* diferentes daquelas relatadas por Schroers (2001), como a taxa de crescimento do

fungo, coloração da colônia, comprimento da estipe e tamanho do conídio. Além disso, alguns caracteres coincidem entre diferentes espécies, as quais podem ser distinguidas apenas por técnicas moleculares (Schroers, 2001).



Figura 9. Visualização macroscópica de *Clonostachys byssicola* em meio BDA.

Alvindia e Natsuaki (2008) estudaram o potencial de *C. byssicola* como agente de biocontrole da podridão da coroa de banana, a doença pós-colheita mais importante deste fruto, causada por vários fungos, incluindo *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum musae*, *Thielaviopsis paradoxa* e diversas espécies de *Fusarium* spp., como *Fusarium verticillioides*. Neste estudo, foi relatada a capacidade de *C. byssicola* em inibir o crescimento de todos os patógenos citados, controlando (totalmente ou parcialmente) a germinação dos conídios destes fungos. *C. byssicola* apresentou atividade antagônica contra os patógenos através de parasitismo direto e secreção de antibióticos, controlando a doença quando aplicado como tratamento pós-colheita.

Diversas doenças fúngicas são responsáveis por elevadas perdas na produção de cacau, como: 1) podridão negra radicular (*black root rot*), causada por *Rosellinia* spp.; 2) monilíase (*frosty pod rot*), causada por *Moniliophthora roreri*, *Crinipellis pernicioso* (atualmente *Moniliophthora pernicioso*) e *C. roreri*; e 3) podridão parda (*black pod*), causada por *Phytophthora* spp., como *P. palmivora*. Estudos conduzidos por Evans *et al.* (2003), García *et al.*

(2003), Hoopen *et al.* (2003) e Krauss *et al.* (2006) mostraram o potencial de *C. byssicola* no controle destes patógenos.

Krauss *et al.* (2013) investigaram as interações entre espécies micoparasíticas de *Clonostachys* e *Trichoderma* spp. a fim de se delinear um inóculo misto compatível para aplicação como controle biológico, sendo utilizados isolados com eficácia conhecida contra várias doenças do cacau: *Clonostachys byssicola*, *C. rosea*, *Trichoderma* sp. T4 e *T. harzianum*. Dessa forma, procurou-se quantificar a dominância de um gênero micoparasita sobre o outro, utilizando testes *in vitro*, bem como experimentos de campo. Neste estudo constatou-se que ambas as espécies do gênero *Clonostachys* spp. foram os micoparasitas mais agressivos, sendo também os mais resistentes ao parasitismo.

Alguns estudos relataram o isolamento de compostos a partir de micélios do fungo *Bionectra byssicola* F120, o teleomorfo de *C. byssicola*. Alguns destes compostos apresentaram atividade antimicrobiana contra vários isolados de *Staphylococcus aureus*, incluindo *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) e quinolona (QRSA) com valores de MIC (concentração inibitória mínima) de 3 µg/mL a 50 µg/mL, dependendo do composto e do micro-organismo analisados. Os compostos isolados foram: bionectina A, B e C; verticilina D (Zheng *et al.*, 2006); glioperazina B e C (Zheng *et al.*, 2007a) e verticilina G (Zheng *et al.*, 2007b). Uma vez que *S. aureus* (MRSA) vem desenvolvendo resistência a antibióticos, torna-se importante e necessário buscar novas classes de agentes antimicrobianos (Zheng *et al.*, 2006).

1.6. Casca de Soja

A casca de soja, um subproduto obtido da indústria de processamento da soja, é uma película que reveste o grão, constituindo cerca de 8 % de toda a semente (Gnanasambandan e Proctor, 1999). Grãos de soja processados são a maior fonte mundial de proteína na ração animal e segunda maior fonte de óleo vegetal (USDA, 2015).

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos. Na safra de 2013/2014, a cultura da soja no Brasil ocupou uma área de 30.2 milhões de hectares, totalizando uma produção de 86 milhões de toneladas do grão (Conab,

2015). O USDA (United States Department of Agriculture) estima a safra brasileira de soja em 91 milhões de toneladas em 2014/2015, enquanto os produtores norte-americanos deverão produzir cerca de 99 milhões de toneladas.

A grande produção mundial da soja torna os resíduos desta cultura um dos mais expressivos em volume, possuindo grande potencial como substrato para o crescimento de micro-organismos lignocelulolíticos e indução da secreção de suas enzimas, bem como para a bioconversão em produtos de alto valor agregado.

Schirmer-Michel *et al.* (2008) relataram que o fungo *Candida guilliermondii* foi capaz de crescer em hidrolisado de casca de soja, produzindo elevada quantidade de etanol. Ademais, os resultados obtidos por Cassales *et al.* (2011) também demonstram a perspectiva para o uso de casca de soja como substrato potencial para a produção de biocombustíveis. Infante (2014) utilizou a casca do grão da soja para cultivo do fungo *Aspergillus foetidus*, mostrando o potencial deste resíduo agroindustrial em induzir a secreção de holocelulases pelo fungo.

A composição da casca de soja é bastante variável. As diferenças entre os valores relatados na literatura são explicadas pela variação natural da origem vegetal, condições de crescimento, tecnologias de processamento, entre outros fatores. Uma comparação entre as composições de cascas de soja é apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Composição bromatológica da casca de soja.

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
51,2	15,9	ND*	Miron <i>et al.</i> , 2001
36,4	12,5	18,2	Corredor <i>et al.</i> , 2008
38,4	10,2	2,8	Mielenz <i>et al.</i> , 2009
44,4	16,7	5,2	Siqueira, 2010
39,7	25,5	9,1	Cassales <i>et al.</i> , 2011
25,9	38,7	30,2	Moreira, 2013
24,4	33,8	36,6	Infante, 2014

* Não Descrito

Quanto a outros resíduos, a glicose é o componente principal da fração de polissacarídeo (39,7 %), seguido pelas pentoses xilose (19,6 %) e arabinose (5,9 %). Os outros componentes são ácido glicurônico (2,0 %), ácido acético (0,6 %), celobiose (1,6 %), proteínas (13,1 %), cinzas (0,6 %), e extrativos (3,2 %) (Cassales *et al.*, 2011).

2. Justificativa

Celulases microbianas possuem diversas aplicações tecnológicas, sendo utilizadas na indústria alimentícia, nutrição animal, indústria de polpa e papel, formulação de detergentes e sabão em pó, indústria têxtil, entre outras. Além disso, a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol é importante para o desenvolvimento sustentável dos seres humanos. Conseqüentemente, há grande interesse na prospecção de enzimas alternativas, mais eficientes e estáveis para utilização nestas aplicações.

Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para o crescimento de fungos filamentosos e indução da secreção de suas enzimas, sendo uma matéria-prima promissora devido à sua abundância, disponibilidade e baixo custo. Dessa forma, a utilização da casca do grão da soja como fonte de carbono para o cultivo de micro-organismos reduz o custo de produção das enzimas, tornando economicamente viável a utilização destes biocatalisadores nas diversas aplicações tecnológicas. Além disso, a utilização biotecnológica de enzimas fúngicas para a degradação de resíduos agrícolas agrega valor à matéria-prima antes inutilizada, promovendo o estímulo à reciclagem desses materiais.

Ademais, o potencial de *Clonostachys byssicola* em produzir e secretar holocelulases ainda é pouco estudado, tornando relevante o estudo, caracterização e avaliação de possível aplicação industrial destas novas enzimas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Utilizar a biomassa lignocelulósica da casca do grão da soja como fonte de carbono para o cultivo submerso de *Clonostachys byssicola*, visando a produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas.

3.2. Objetivos Específicos

- Promover o cultivo de *Clonostachys byssicola* em condições submersas, utilizando a casca do grão da soja como única fonte de carbono.
- Avaliar as atividades de avicelase, CMCase, FPase, mananase, pectinase e xilanase secretadas no meio de cultivo após 7 dias de crescimento do fungo.
- Avaliar o perfil de secreção enzimática de *C. byssicola* durante 25 dias.
- Purificar CMCase utilizando técnicas cromatográficas.
- Avaliar o efeito de temperatura, pH, íons e compostos fenólicos na atividade de CMCase no extrato bruto concentrado e da enzima purificada, bem como sua termoestabilidade.
- Realizar ensaios de hidrólise enzimática de substratos comerciais e lignocelulósicos, com subsequente quantificação e identificação por HPLC dos sacarídeos (celossacarídeos, manossacarídeos e xilossacarídeos) liberados durante o ensaio.

4. Materiais e Métodos

4.1. Micro-organismo e Condições de Cultivo

Para o presente trabalho foi utilizado o fungo *Clonostachys byssicola* (RCFS6), o qual foi obtido a partir de amostras de solo coletadas do cerrado (em uma fazenda no entorno do Distrito Federal com uma área de cerrado muito bem preservada). Este fungo faz parte da micoteca do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, UnB, dentro do âmbito da rede Sisbiota de fungos filamentosos: autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010770/2013-5, sob supervisão do Prof. Dr. Edivaldo Ximenes. A identificação do isolado foi realizada por análise molecular (Anexo 1) pela Dra. Rosane Mansan Almeida, do Laboratório de Microbiologia, Universidade de Brasília, sob supervisão do Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller. Inicialmente, o fungo foi identificado morfológicamente como *Penicillium fellutanum*, porém foi reclassificado como *C. byssicola* por identificação molecular.

O isolado foi mantido em placas de Petri em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA), composto por batata (10 %), dextrose (1 %) e ágar (2 %) e mantido a temperatura ambiente até sua esporulação (15 dias). O isolado também está mantido em *freezer* a -80 °C a fim de ser preservado.

O fungo foi cultivado em condições submersas em meio líquido suplementado, em g/L: 7,0 g de KH_2PO_4 ; 2,0 g de K_2HPO_4 ; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6 g de extrato de levedura; 1 % (m/v) de casca do grão da soja como fonte de carbono; em pH 7,0. Os meios foram autoclavados a 121 °C por 30 min (Filho, 1992).

Os esporos de *C. byssicola* foram raspados da placa de Petri com auxílio de lâmina de microscopia e transferidos para 50 mL de uma solução salina (NaCl 0,9 %) complementada com 1 mL de solução surfactante *Tween* 80 1 % (v/v). Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Ademais, foi realizada a contagem dos esporos desta solução em Câmara de Neubauer em microscópio óptico. Em frascos do tipo *Erlenmeyer* contendo o meio de cultivo, foi inoculada alíquota de suspensão de esporos (contendo 10^7 esporos/mL) correspondente a 1 % do volume do meio.

O cultivo em meio líquido foi realizado a 28 °C sob agitação constante de 120 rpm por 7 dias (período definido após análise da curva de indução, tópico 4.2) em *Erlenmeyers* de 1 L, contendo 300 mL de meio. Este cultivo foi realizado em quadruplicata biológica. Após o cultivo, o meio foi filtrado a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (Whatman nº 1). O material filtrado (denominado Extrato Bruto), contendo as enzimas secretadas pelo fungo, foi coletado e preservado mediante adição de azida sódica na concentração de 0,02 %, sendo armazenado a 4 °C.

4.2. Curva de Indução Enzimática

Para os ensaios enzimáticos da curva de indução, o fungo foi cultivado por 25 dias em *Erlenmeyers* de 2 L, contendo 500 mL de meio. Foram retiradas diariamente alíquotas de 1 mL do meio de cultura a fim de avaliar o perfil de secreção enzimática de *C. byssicola*. As alíquotas foram armazenadas em tubos do tipo *eppendorf* a -20 °C. Foram realizados ensaios enzimáticos destas amostras para determinação das atividades de CMCCase, mananase, xilanase e pectinase. O experimento foi realizado em triplicata biológica e triplicata técnica.

4.3. Fonte de Carbono

As cascas do grão da soja provêm da espécie *Glicine max* e foram obtidas na Fazenda Tropical em Cabeceiras, GO. O material foi submetido a um pré-tratamento no qual foi autoclavado a 121 °C por 2 h e lavado em água corrente; secado em estufa a 60 °C por 48 h; triturado em moinho de bancada; embalado em saco plástico e armazenado em caixa de isopor a temperatura ambiente.

4.4. Substratos

Os substratos utilizados para a determinação da atividade enzimática foram: CMC 4 % (CarboxiMetilCelulose), manana 1 % (Galactomanana – *Locust Bean*), pectina 1 % (*Citrus Fruits*), xilana 1 % (*Oat Spelt Xylan*), celulose microcristalina (Avicel) (obtidos da Sigma-

Aldrich; St. Louis, MO. USA), papel Whatman nº 1 (GE Healthcare Life Sciences; Piscataway, NJ. USA) e p-nitrofenil- β -D-glicopiranosideo (pNPG - Sigma-Aldrich).

4.5. Determinação da Atividade Enzimática

As amostras enzimáticas foram avaliadas quanto às atividades de celulasas (avicelase, CMCase e FPase), hemicelulasas (mananase e xilanase) e pectinase.

Para a determinação das atividades de CMCase, mananase, xilanase e pectinase foram realizados microensaios incubando-se 5 μ L da solução enzimática e 10 μ L dos substratos por 30 min a 50 °C (Filho *et al.*, 1993, com modificações). Ao término deste período, as reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de 30 μ L de solução DNS (ácido 3,5-Dinitro-Salicílico) e incubação a 97 °C por 10 min (Miller, 1959). Em seguida, foram adicionados 150 μ L de água destilada, sendo realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (SpectraMax M2^o, Molecular Devices Co., EUA) a 540 nm.

A atividade de avicelase foi determinada incubando-se 50 μ L da solução enzimática e 50 μ L de avicel 1 % em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 por 2 h a 50 °C; adição de 150 μ L de DNS, incubação por 10 min em banho fervente (97 °C); adição de 750 μ L de água destilada e, então, leitura a 540 nm (Ghose, 1987).

Para a determinação da atividade de FPase foram utilizadas tiras de papel de filtro Whatman nº 1 (0,5 x 3 cm) e 75 μ L da solução enzimática, incubados por 1 h a 50 °C; adição de 150 μ L de DNS, com posterior incubação por 10 min em banho fervente; adição de 750 μ L de água destilada e leitura a 540 nm (Ghose, 1987).

As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL de solução enzimática, sendo UI definido como a quantidade de açúcar redutor (μ mol) liberado por minuto. As atividades específicas das enzimas foram calculadas e expressas em UI/mg de proteína total. As curvas padrões de calibração foram determinadas com soluções de D-glicose, D-manose, D-xilose e ácido D-galacturônico, variando-se as concentrações de 0,2 a 1,8 mg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os desvios padrões foram menores que 10 % da média.

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPG). A amostra enzimática (100 μ L) foi incubada com 50 μ L do substrato e 850 μ L de água destilada por 10 minutos a 50 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução de Na_2CO_3 1 M, sendo realizada leitura da absorbância a 410 nm (Ximenes *et al.*, 1996). A curva de calibração foi determinada com solução de ρ NP, variando-se as concentrações de 0,05 a 0,6 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

A determinação da quantidade de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando *Kit Protein Assay* (Bio-Rad Inc., EUA) e BSA (albumina sérica bovina) como padrão.

4.6. Etapas de Caracterização e Purificação

A figura 10 apresenta um diagrama das etapas de caracterização e purificação parcial de CMCCase.

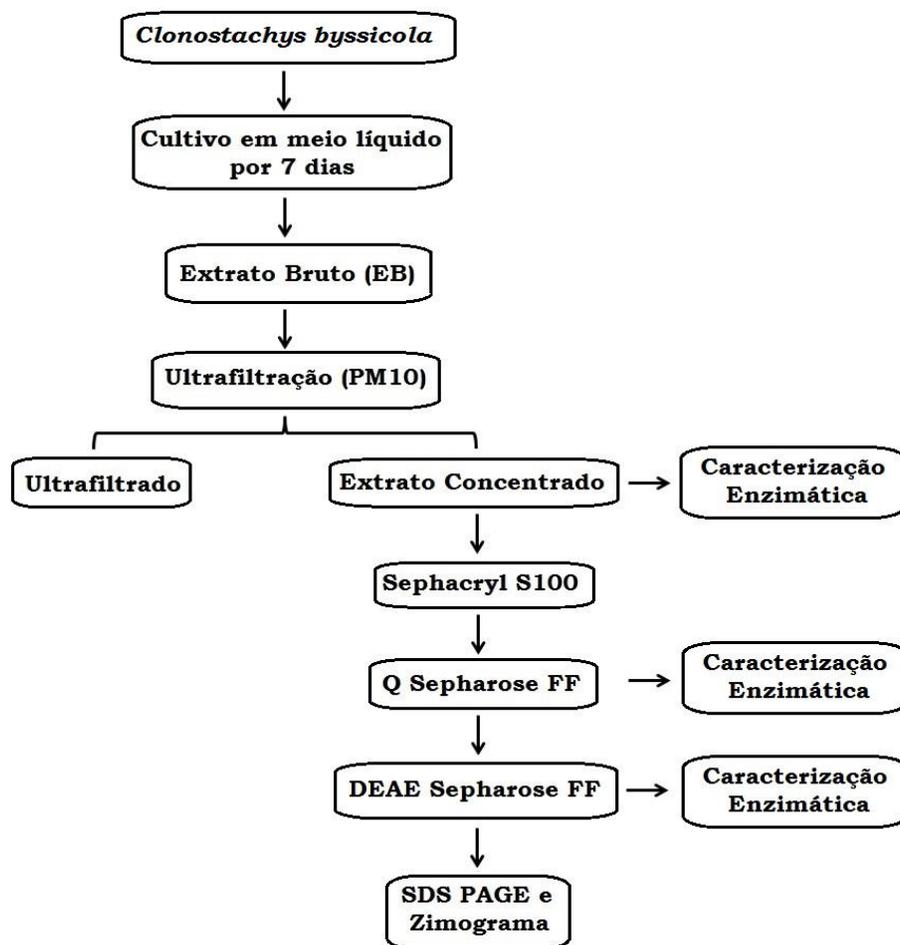


Figura 10. Esquema da purificação parcial de CMCCase produzida por *C. byssicola*

4.6.1. Ultrafiltração

O extrato bruto foi concentrado utilizando sistema de ultrafiltração em membrana com retenção de 10 kDa (PM10 Millipore Co., MA, EUA), pressão de 5 Kg.f/cm² e temperatura de 10 °C em sistema de ultrafiltração do tipo Amicon. Foi obtida uma fração 10 vezes concentrada (em relação ao volume) e uma fração ultrafiltrada, sendo que apenas a primeira apresentou atividades enzimáticas de celulase, hemicelulase e pectinase.

4.6.2. Purificação

Foram aplicados 10 mL do extrato bruto concentrado (EBC) em coluna cromatográfica de exclusão molecular do tipo *Sephacryl S100* (3,0 x 68,2 cm) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 com NaCl 0,15 M e azida sódica 0,02 %. Frações de 5 mL foram eluídas com fluxo de 20 mL/h. Foram realizados microensaios enzimáticos para detecção da atividade de CMCCase, mananase, pectinase e xilanase de todas as frações coletadas a fim de avaliar o perfil de separação/eluição das diferentes enzimas.

As frações contendo atividade de CMCCase foram reunidas (Fração Cel-S100) e submetidas (alíquotas de 2 mL) a cromatografia de troca iônica em coluna aniônica do tipo *HiTrap Q Sepharose Fast Flow* (Q FF 1 mL), acoplada ao sistema de purificação Äkta (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. A eluição foi realizada através de um gradiente de sal (NaCl) de 0 a 1 M. Frações de 1 mL foram eluídas com fluxo de 1 mL/min, sendo reunidas aquelas que apresentaram atividade de CMCCase (Fração Cel-QFF). A fração Cel-QFF foi, então, submetida à cromatografia de troca iônica em coluna aniônica do tipo *HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow* (DEAE FF 1 mL), sendo também reunidas as frações com atividade de CMCCase (Fração Cel-DEAE).

4.6.3. Eletroforese SDS-PAGE e Zimografia

O grau de pureza das enzimas foi avaliado por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Inicialmente, as amostras enzimáticas (10 µg de proteína) foram submetidas à precipitação em

solução de ácido tricloroacético (TCA) 10 % em água destilada, sendo incubadas por 1 h a 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 min a 4 °C; após o sobrenadante ser removido, as amostras foram lavadas com 1 mL de acetona P.A. e novamente centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente; este procedimento foi realizado por mais duas vezes. O sobrenadante foi descartado e as amostras secadas a temperatura ambiente. As amostras secas contendo as proteínas precipitadas foram resuspendidas em tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 2,0 % (m/v); azul de bromofenol 0,05 % (m/v); glicerol 20 % (v/v) e β -mercaptoetanol 5,0 % (v/v)), fervidas por 7 min e aplicadas no gel de poli(acrilamida) 12 % previamente montado e acondicionado no sistema de eletroforese (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. USA). Para cada corrida, foram utilizados 2 μ L de marcador de massas moleculares *Low Molecular Weight* (LMW), contendo: fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa) (GE Healthcare). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 % (v/v), pH 8,3) e submetida a 25 mA por 50 min.

O gel foi corado com nitrato de prata, sendo incubado em solução fixadora (v/v) (metanol 40 % e ácido acético 12 %) durante 1 h. Em seguida, o gel foi incubado três vezes (por 20 min cada) em etanol 50 % (v/v); mantido por 1 min em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (m/v) e lavado três vezes com água destilada; incubado por 15 min em solução de coloração (nitrato de prata 0,2 % (m/v) e formaldeído 0,074 % (v/v)), sendo realizadas três lavagens com água destilada; mantido em solução reveladora (carbonato de sódio 6 % (m/v), tiosulfato de sódio 0,0004 % (v/v) e formaldeído 0,05 % (v/v)) até o aparecimento das bandas proteicas. A reação foi interrompida com solução fixadora (Blum *et al.*, 1987). Todas as incubações foram realizadas sob agitação.

A identificação das atividades enzimáticas de CMCase foi realizada através da técnica de zimografia (Bischoff *et al.*, 1998), em que o substrato carboximetilcelulose foi co-polimerizado no gel em concentração final de 0,4 % (v/v). Após a corrida, o gel foi incubado 2 vezes (por 30 min cada) em solução de Triton X-100 2,5 % (v/v); mantido por 1 h em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0; incubado a 60 °C por 1h30; a reação foi interrompida pelo resfriamento do gel por 30 min a 4 °C. O gel foi mantido em solução vermelho congo 0,1 % (m/v) por 30 min,

sendo descorado com solução NaCl 1 M até o aparecimento das bandas (adição de 100 μ L de solução de ácido acético 0,5 % (v/v) para obtenção de contraste entre as bandas). Todas as incubações foram realizadas sob agitação.

4.6.4. Caracterização Enzimática

4.6.4.1. Efeito da Temperatura e pH

Foram realizados microensaios enzimáticos (conforme descrito no tópico 4.5) em um intervalo de temperatura de 30 a 80 °C ($\Delta = 10$ °C) utilizando o extrato bruto concentrado e as frações Cel-QFF e Cel-DEAE semi-purificadas como fonte de enzimas para avaliar o efeito da temperatura na atividade de CMCCase. O efeito do pH sobre a atividade de CMCCase também foi avaliado em uma faixa de pH de 3,0 a 9,0 ($\Delta = 0,5$). Foram utilizados os seguintes tampões (50 mM): acetato de sódio (pH 3,0 – 6,0), fosfato de sódio (6,0 – 7,0) e tris-HCl (7,0 – 9,0). Os ensaios foram realizados em quintuplicata, sendo os desvios padrões menores que 10 % da média.

4.6.4.2. Avaliação da Termoestabilidade

Alíquotas do extrato bruto concentrado e frações Cel-QFF e Cel-DEAE mantidas em tubos do tipo *ependorf* foram incubadas nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, sendo determinada a atividade enzimática residual da CMCCase até o 30º dia. Os ensaios foram realizados em quintuplicata, sendo os desvios padrões menores que 10 % da média.

4.6.4.3. Efeito de compostos fenólicos na atividade de CMCCase

O efeito de compostos fenólicos (vanilina e ácido tânico – dissolvidos em água; ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido ρ -coumárico e ácido cinâmico – dissolvidos em etanol 50 %) na atividade de CMCCase foi avaliado pela pré-incubação das amostras a 25 °C na presença destes compostos na concentração final de 1 mg/mL. O efeito de inibição foi determinado

imediatamente após a incubação das enzimas com os compostos fenólicos, enquanto que o efeito de desativação foi determinado durante o período de incubação (Ximenes *et al.*, 2011). Como controle, substituiu-se o volume do composto por água ou etanol 50 %. A incubação foi realizada por sete dias, sendo quantificada a atividade residual de CMCase conforme descrito anteriormente. A atividade enzimática foi expressa como atividade percentual em relação ao controle no tempo zero. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.4.4. Efeito de íons metálicos na atividade de CMCCase

O efeito de íons metálicos (Ag^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+}) e EDTA sobre a atividade de CMCCase foi determinado pela pré-incubação das amostras enzimáticas por 20 minutos a 25 °C na presença destes compostos nas concentrações finais de 1 mM e 10 mM. Como controle, substituiu-se o volume dos reagentes por água destilada. A atividade residual de CMCCase foi quantificada (como descrito no tópico 4.5) e expressa como atividade percentual em relação ao controle. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.4.5. Determinação de parâmetros cinéticos

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten (k_M) e da velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$), foram realizados ensaios enzimáticos de amostras do extrato bruto concentrado e da fração Cel-DEAE, variando a concentração do substrato CMC no intervalo de 0,5 a 26,7 mg/mL. Os parâmetros cinéticos foram determinados pelo método de regressão não linear Enzfitter (Leatherbarrow, 1999).

4.7. Ensaio de Hidrólise Enzimática

Amostras do extrato bruto concentrado e da fração semi-purificada Cel-QFF foram incubadas com os substratos: avicel 1 %, CMC 1 % e 4 %, papel de filtro, manana 1 % e xilana 1 % por dois dias e com substratos lignocelulósicos (casca da soja 1 % e bagaço da cana de

açúcar 1 %) por dez dias, na proporção de 1:2 (amostra:substrato). A incubação foi realizada a 40 °C sob agitação constante de 120 rpm. Cada ensaio foi realizado em triplicata biológica.

Os substratos lignocelulósicos utilizados foram submetidos a um pré-tratamento, conforme descrito no tópico 4.3.

Para os ensaios de hidrólise enzimática foram retiradas alíquotas de 125 µL, sendo que 15 µL foram utilizados para quantificação de açúcares redutores totais pelo método do DNS; 2 µL para quantificação de glicose pelo kit de glicose oxidase (Doles); e 100 µL foram armazenados a -20 °C para posterior análise da amostra por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance). Na hidrólise dos substratos comerciais, as alíquotas foram retiradas com 0 h, 12 h, 24 h e 48 h de incubação. Na hidrólise dos substratos lignocelulósicos, foram retiradas alíquotas com 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, 144 h, 192 h e 240 h de incubação.

Para o controle, as amostras enzimáticas foram incubadas em tampão acetato de sódio 50 mM na ausência do substrato, bem como os substratos incubados no mesmo tampão na ausência da amostra enzimática.

4.7.1. Dosagem de glicose e açúcares redutores totais

A análise quantitativa de glicose presente nas amostras foi realizada pelo *kit* glicose oxidase (Doles) (Trinder, 1969). Alíquotas de 2 µL retiradas do ensaio de hidrólise enzimática foram incubadas com 200 µL de reagente de cor a 25 °C por 20 minutos, sendo realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro (SpectraMax) a 510 nm. Como parâmetro, foi utilizada uma solução de glicose padrão fornecida pelo *kit*.

A quantificação de açúcares redutores totais foi realizada pelo método do DNS (Miller, 1959): 30 µL do reagente DNS foram adicionados a 15 µL da amostra; incubação da solução por 10 min a 97 °C; adição de 150 µL de água destilada e leitura em espectrofotômetro a 540 nm, sendo utilizada glicose como padrão. A concentração de glicose e açúcares redutores totais foi expressa em mg/mL.

4.7.2. Análise por HPLC das amostras do ensaio de hidrólise enzimática

As alíquotas retiradas do ensaio de hidrólise enzimática previamente armazenadas a -20 °C foram descongeladas e completadas com água mili-Q para um volume final de 500 µL. A análise das amostras foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência de troca aniônica, acoplada a um detector de amperometria pulsada (HPAE-PAD) para a quantificação e identificação dos sacarídeos (celossacarídeos, manossacarídeos e xilossacarídeos) liberados durante o ensaio de hidrólise. Os sacarídeos foram analisados em sistema Dionex ICS 3000 DC *Ion Chromatography* com utilização de pré-coluna CarboPac Guard e coluna CarboPac PA-100 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) a 20 °C. Foram injetados 10 µL de amostra com o *auto sampler* AS40 (Dionex). As amostras foram eluídas em solução de hidróxido de sódio 100 mM (Dionex) e solução de acetato de sódio 500 mM (Merck, Darmstadt, Germany) com hidróxido de sódio 100 mM, com fluxo de 15 mL/h por 80 min. Os sacarídeos foram identificados e quantificados em detector eletroquímico ED40 (Dionex), sendo os dados analisados pelo programa Chromeleon 6.8 SR8 (Dionex).

Para a quantificação dos sacarídeos, foram feitas três curvas de calibração, utilizando-se uma mistura de sacarídeos contendo entre uma e seis unidades do monômero (D-glicose, D-manose e D-xilose). Dessa forma, a mistura de celossacarídeos é constituída de G1, glicose; G2, celobiose; G3, celotriose; G4, celotetraose; G5, celopentaose e G6, celohexaose (Megazyme Corporation, Wicklow, Irlanda). De forma análoga, a mistura de manossacarídeos é constituída de M1-M6 (Megazyme Corporation) e xilossacarídeos, X1-X6 (Megazyme Corporation). A curva de calibração foi determinada com a mistura de sacarídeos, variando-se a concentração de 0,01 mg/mL a 0,1 mg/mL.

4.7.3. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas com o *software Statistica 7.1*. Os dados foram submetidos à ANOVA fatorial (substratos comerciais) ou *One way* ANOVA (substratos lignocelulósicos) e *post-hoc* teste LSD Fisher de comparação pareada, com nível de significância de 0,05%.

5. Resultados e Discussão

5.1. Screening enzimático

Inicialmente, foi avaliado o potencial do fungo filamentososo *Clonostachys byssicola* em produzir enzimas celulolíticas (avicelase, CMCCase e FPase), hemicelulolíticas (mananase e xilanase) e pectinolíticas (pectinase), após crescimento por sete dias em meio líquido.

As atividades enzimáticas detectadas no extrato bruto são apresentadas na figura 11. A maior atividade obtida foi de CMCCase (0,904 UI/mL), seguida pelas atividades de pectinase (0,845 UI/mL), mananase (0,814 UI/mL), xilanase (0,744 UI/mL) e FPase (0,268 UI/mL). Não foi detectada atividade de avicelase.

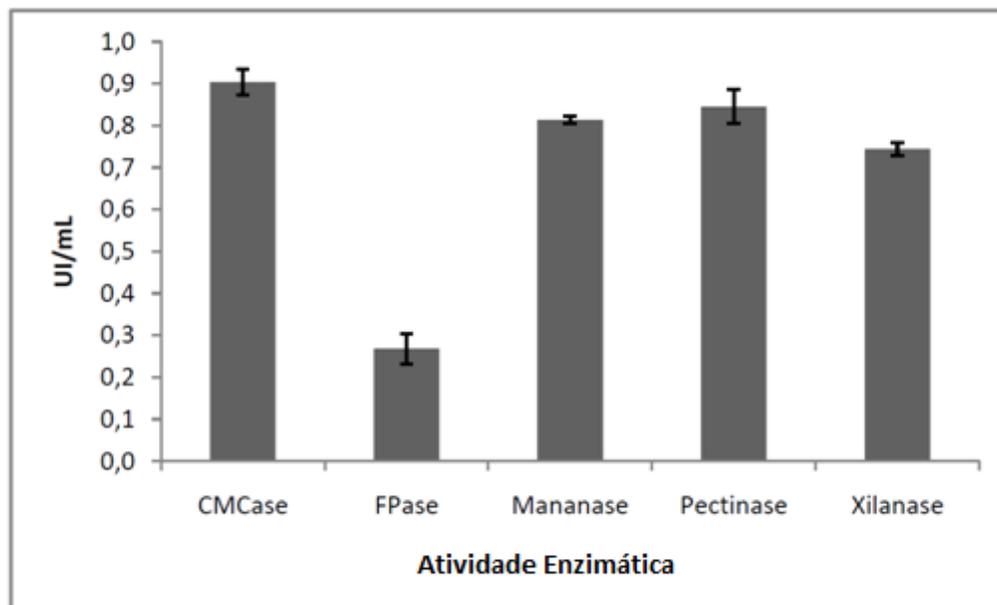


Figura 11. Perfil de holocelulases produzidas por *C. byssicola* após crescimento por sete dias em meio líquido contendo casca de soja como fonte de carbono.

Em trabalho realizado por Gomes (2014), o mesmo isolado de *C. byssicola* demonstrou a capacidade de secretar holocelulases (celulases, hemicelulases e pectinases) quando cultivado em 6 diferentes fontes de carbono lignocelulósicas: casca de maracujá, casca de soja, casca de

laranja, piolho de algodão sujo, engaço de bananeira e bagaço de cana de açúcar. É salientado que o perfil de enzimas secretadas foi influenciado pela fonte de carbono.

Os resultados aqui obtidos também demonstram o potencial que a casca de soja apresenta em induzir a produção e secreção de diversas enzimas por *C. byssicola*. Além de Gomes (2014), estudos acerca do potencial deste fungo em produzir holocelulases não foram encontrados, tornando este trabalho ainda mais importante pela sua contribuição para a literatura.

Após esta etapa inicial, CMCase foi escolhida como principal alvo de investigação no decorrer do trabalho, uma vez que tal enzima apresentou a maior atividade.

5.2. Curva de Indução Enzimática

As atividades de CMCase, bem como de mananase, pectinase e xilanase (dados não mostrados) foram monitoradas diariamente durante 25 dias, objetivando-se determinar o melhor dia de cultivo, no qual há maior atividade enzimática. O perfil de indução de CMCase está demonstrado na figura 12. As atividades específicas desta enzima também foram determinadas durante este período, sendo apresentadas na figura 13.

A atividade de CMCase aumenta até o sétimo dia (maior atividade enzimática – 0,65 UI/mL), mantendo valores estáveis nos dias subsequentes. A maior atividade específica foi obtida no sexto (3,68 UI/mg) e sétimo dias (3,67 UI/mg), sendo que o sétimo dia de cultivo foi definido como tempo ideal para indução desta enzima. De forma similar, a maior atividade específica de mananase foi alcançada no sexto dia; pectinase e xilanase no quinto dia (dados não mostrados). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Gomes (2014), em que os valores das atividades de pectinase e xilanase (produzidas por *C. byssicola* crescido em piolho de algodão sujo 1 %) aumentam até o quinto dia, quando a partir de então tendem a se estabilizar.

Ademais, em trabalho realizado por Lima *et al.* (2009), a maior atividade de CMCase (0,36 UI/mL) foi obtida no sexto dia de cultivo de *Aspergillus fumigatus* (em fermentação líquida), quando crescido em bagaço de cana de açúcar 1 % como fonte de carbono. Pothiraj *et al.* (2006) relataram máximos valores de atividade de CMCase após 8 dias de cultivo em fermentação sólida de *Aspergillus niger* (0,12 UI/mL) e *A. terreus* (0,1 UI/mL), utilizando-se

resíduo de cassava como fonte de carbono. Em um período de cultivo semelhante, CMCase de *C. byssicola* (do presente trabalho) apresentou maior atividade enzimática.

A atividade específica constitui um parâmetro importante para avaliar a atividade enzimática em relação à quantidade total de proteínas presente na amostra, de modo que elevadas atividades específicas representam, em geral, um grau de pureza maior da enzima; motivo pelo qual o sétimo dia de cultivo foi definido como padrão para este estudo.

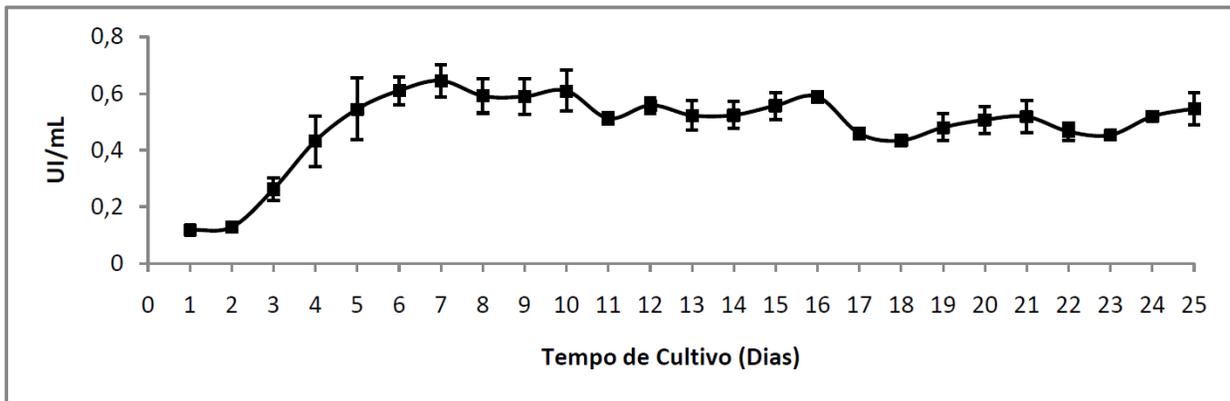


Figura 12. Perfil de indução de CMCase durante o cultivo de *C. byssicola* em casca de soja.

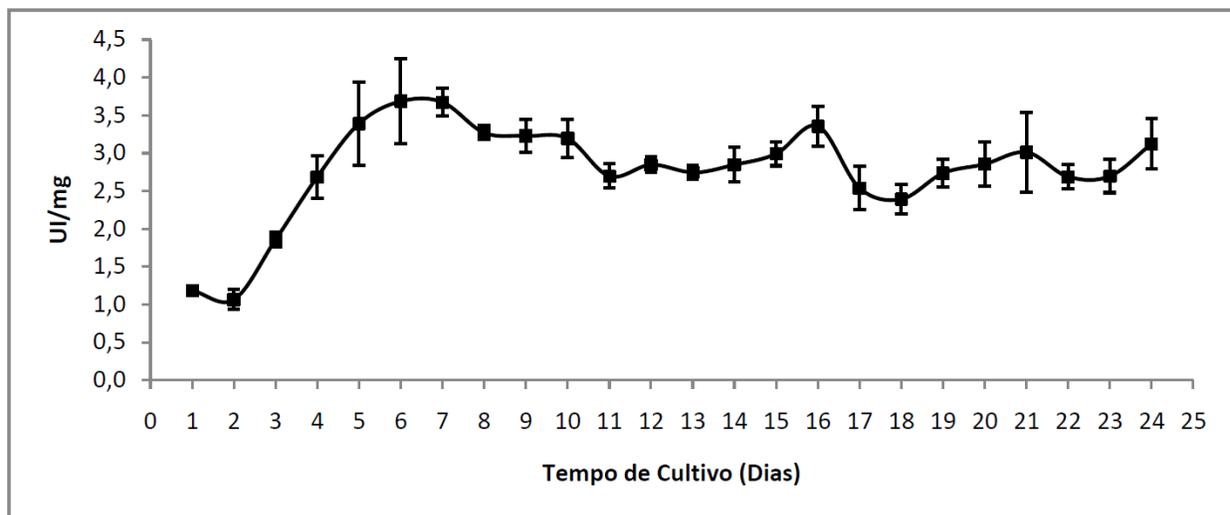


Figura 13. Perfil de indução da atividade específica de CMCase durante o cultivo de *C. byssicola* em casca de soja.

5.3. Purificação parcial de CMCCase

O extrato bruto obtido através do cultivo de 7 dias de *C. byssicola* foi submetido a ultrafiltração em membrana com retenção de 10 kDa. Após o processo de ultrafiltração, a atividade de CMCCase foi encontrada apenas na fração concentrada, a qual foi submetida a sucessivos métodos cromatográficos para purificação da enzima de interesse.

O perfil de eluição do extrato bruto concentrado (EBC) em coluna *Sephacryl* S100 é apresentado na figura 14. As maiores atividades de CMCCase foram obtidas entre as frações 46 - 53, as quais foram coletadas (fração Cel-S100) e aplicadas em coluna aniônica QFF-*Sepharose* (Figura 15).

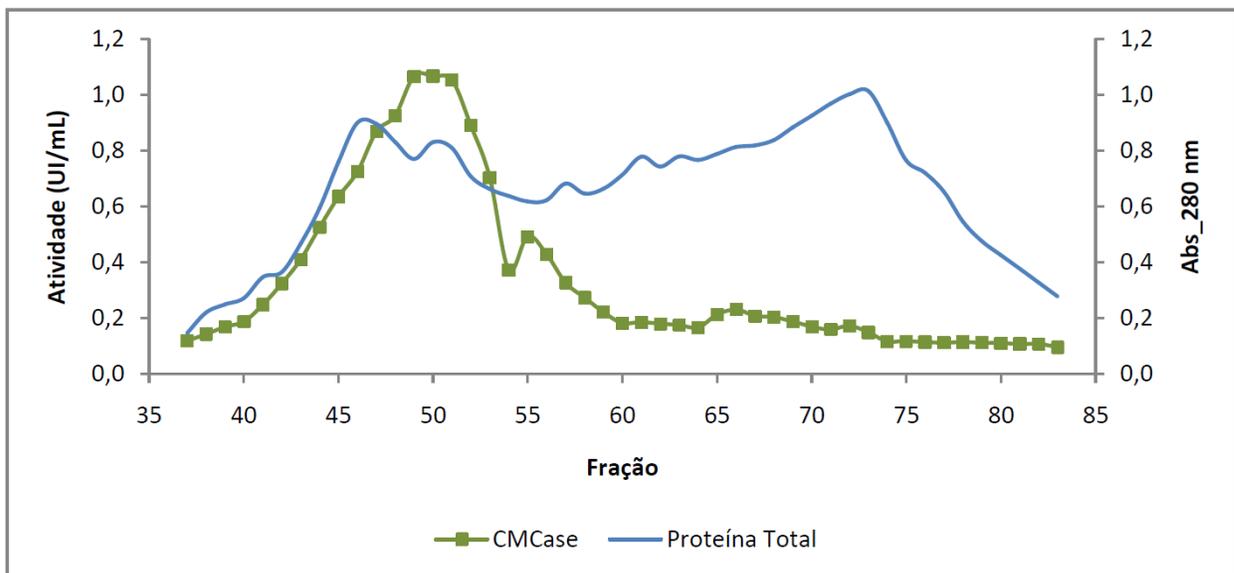


Figura 14. Perfil cromatográfico do extrato bruto concentrado aplicado em coluna de exclusão molecular *Sephacryl* S100, equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 com NaCl 0,15 M e azida sódica 0,02 %.

A partir da análise da figura 15, é possível identificar dois picos de atividade de CMCCase. O primeiro pico corresponde às proteínas que não se ligaram ao grupo carregado (amina quaternária) presente na resina, onde, além de CMCCase, co-eluíram enzimas com atividade de mananase, pectinase e xilanase (dados não mostrados). O segundo pico (frações 23 e 24) corresponde à atividade enzimática de CMCCase que eluiu durante o gradiente de sal (NaCl), ocorrendo menor sobreposição entre a enzima de interesse e outras proteínas. As frações 23 e 24

foram reunidas (fração Cel-QFF) e aplicadas em coluna aniônica DEAE-*Sepharose* (Figura 16). O perfil cromatográfico foi semelhante ao perfil da etapa anterior, sendo reunidas as frações 23 e 24 (fração Cel-DEAE) para etapas posteriores de caracterização enzimática. Todas as frações coletadas foram armazenadas a 4 °C.

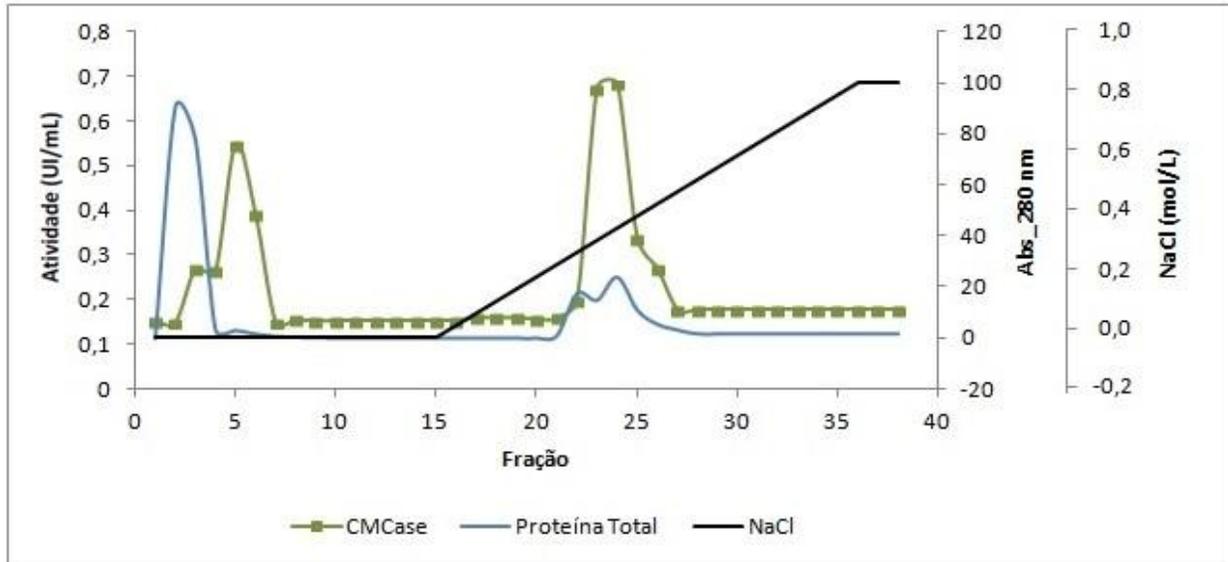


Figura 15. Perfil cromatográfico das frações provenientes da cromatografia em coluna *Sephacryl* S100 em coluna de troca iônica *Q Sepharose Fast Flow* (QFF) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Gradiente de sal (NaCl) de 0 a 1 M.

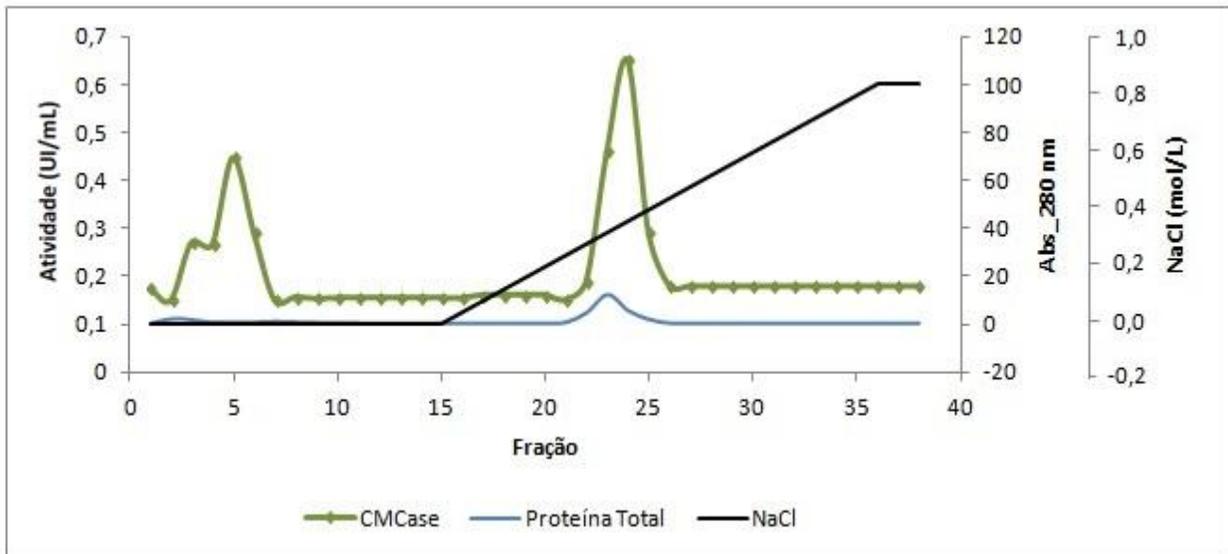


Figura 16. Perfil cromatográfico das frações provenientes da cromatografia em coluna QFF em coluna de troca iônica *DEAE Sepharose Fast Flow* (DEAE) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Gradiente de sal (NaCl) de 0 a 1 M.

As amostras provenientes do processo de purificação tiveram seu grau de pureza avaliado por SDS-PAGE e zimograma (Figura 17).

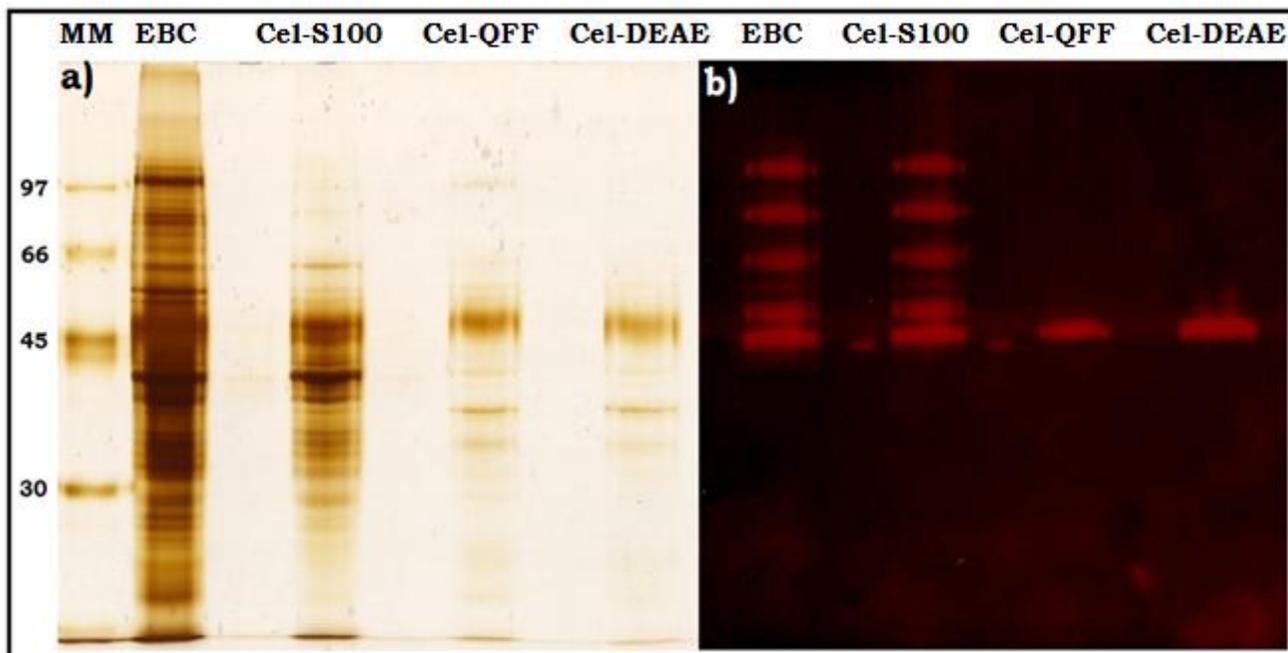


Figura 17. a) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12 % do extrato bruto concentrado (EBC), frações oriundas da coluna *Sephacryl* S100 (Cel-S100), *Q Sepharose Fast Flow* (Cel-QFF) e *DEAE Sepharose Fast Flow* (Cel-DEAE). **b)** Zimograma apresentando as atividades de CMCase. À esquerda são apresentados a massa molecular (em kDa) dos marcadores moleculares (MM) utilizados.

Na figura 17, verifica-se que ocorre uma diminuição das bandas proteicas após as etapas cromatográficas. Embora as frações Cel-QFF e Cel-DEAE apresentem apenas uma banda com atividade de CMCase (no zimograma), a enzima ainda não está completamente purificada, como pode ser observado pela presença de outras bandas proteicas no gel de poliacrilamida (Fig. 17a). Ademais, verifica-se no zimograma (Fig. 17b) que *C. byssicola* produziu e secretou múltiplas celulases com diferentes tamanhos (massa molecular), como pode ser observado pela presença de cinco bandas com atividade de CMCase no extrato bruto concentrado. A massa molecular da enzima semi purificada é de aproximadamente 48 kDa. Este resultado é semelhante aos observados em outros trabalhos com CMCases purificadas, nos quais foram observadas massas

moleculares de 45 kDa (*Aspergillus aculeatus*; Naika *et al.*, 2007), 46 kDa (*Daldinia eschscholzii*; Karnchanatat *et al.*, 2008) e 50 kDa (*Aspergillus fumigatus*; Liu *et al.*, 2011). Além disso, CMCase de 27 kDa (*Mucor circinelloides*; Saha, 2004) e 96 kDa (*Artemia salina*; Zin *et al.*, 2014) também foram relatadas.

Assim como *C. byssicola*, diversos outros micro-organismos produzem celulasas em múltiplas formas, as quais possuem diferentes propriedades bioquímicas, massa molecular e especificidade por substratos. Lima *et al.* (2009) relataram a síntese de múltiplas celulasas por *Aspergillus fumigatus*, sendo visualizadas seis bandas com atividade de CMCase em zimograma. Além disso, *Trichoderma reesei* produz dois tipos de celobiohidrolases (CBH I e CBH II) e pelo menos seis tipos de endoglicanases (EGI – EGVI) (Miettinen-Oinonen, 2004). Badhan *et al.* (2007) relataram que o tipo de substrato utilizado para o crescimento de *Myceliophthora* sp. IMI 387099 influenciou a quantidade de isoformas de endoglicanases secretadas pelo fungo: palha de arroz 2 % (m/v) induziu a produção de 4 isoformas de CMCase, enquanto palha de trigo e farelo de trigo induziram a produção de duas e uma isoformas, respectivamente.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos nas diversas etapas de purificação do extrato bruto de *C. byssicola* em relação à atividade de CMCase. Pode-se observar que, durante o processo de purificação de CMCase, a quantidade de proteína (mg) decresce, com consequente aumento da atividade específica (UI/mg). A atividade enzimática total (UI) diminui a cada etapa cromatográfica, uma vez que ocorreu diluição da enzima neste processo.

Tabela 2. Resumo das etapas de purificação parcial de uma CMCase de *C. byssicola*.

Amostra	Proteína Total (mg)	Atividade Total (UI)	Atividade Específica (UI/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
EB	51,6	258,0	5,0	1,0	100,0
EBC	11,0	45,0	4,1	0,8	17,4
Cel-S100	14,0	122,4	8,7	1,7	47,4
Cel-QFF	3,8	69,6	18,3	3,7	27,0
Cel-DEAE	1,4	50,4	36,0	7,2	19,5

5.4. Efeito da temperatura na atividade de CMCase

O efeito da temperatura na atividade de CMCase presente no extrato bruto concentrado e frações semi purificadas é apresentado na figura 18. A maior atividade foi obtida a 60 °C no extrato concentrado e na fração Cel-QFF e a 70 °C na fração Cel-DEAE. Todas as amostras apresentaram atividade celulolítica em uma ampla faixa de temperatura, sugerindo um potencial de aplicação industrial destas enzimas. Foi retida, pelo menos, 70 % da atividade máxima na faixa de temperatura entre 40 e 70 °C em todas as amostras analisadas. As enzimas semi purificadas apresentaram maior atividade relativa em temperaturas elevadas (70 °C e 80 °C) em relação às enzimas presentes no extrato concentrado.

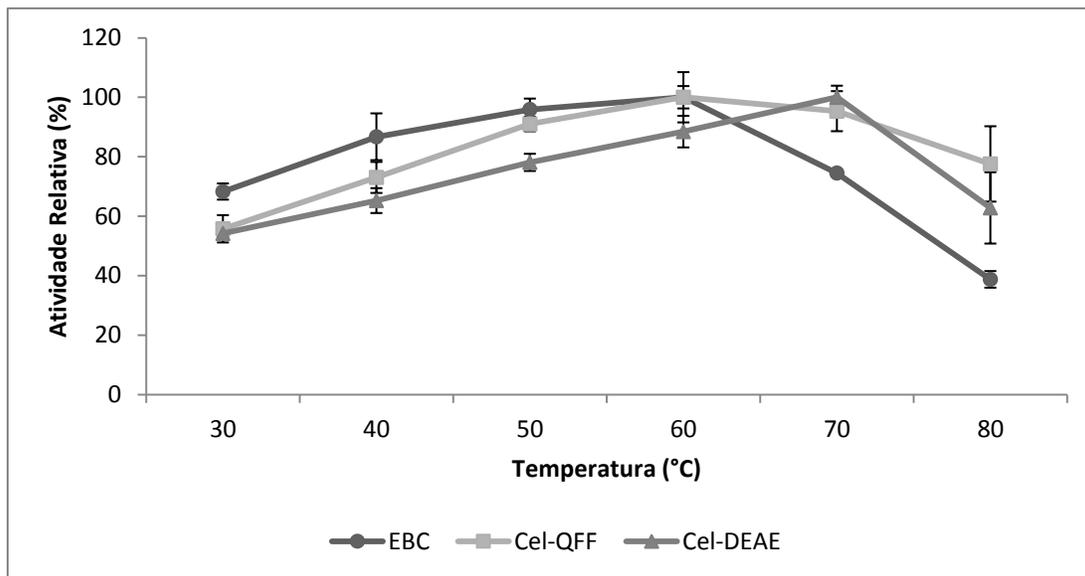


Figura 18. Efeito da temperatura na atividade de CMCase presente no extrato bruto concentrado (EBC), fração Cel-QFF e Cel-DEAE.

A temperatura para uma maior atividade de CMCase varia entre as enzimas de diferentes micro-organismos e entre diferentes enzimas do mesmo micro-organismo (Tabela 3). O resultado obtido neste trabalho foi similar ao de Chaabouni *et al.* (2005) e Liu *et al.* (2011), em que CMCase (EGa de *Penicillium occitanis* e EG3 de *Aspergillus fumigatus*, respectivamente) teve maior atividade a 60 °C. Ademais, uma maior atividade de CMCase a 70 °C (observada na fração Cel-DEAE) também foi observada para endoglicanase produzida por *Penicillium*

purpurogenum KJS506 cultivado em palha de arroz 5 % (Lee *et al.*, 2010b). Resultados semelhantes foram relatados para CMCase de *Thermoascus aurantiacus* (Parry *et al.*, 2002); *Daldinia eschscholzii* (Karnchanatat *et al.*, 2008); *Penicillium brasilianum* (Krogh *et al.*, 2009) e *Thermoascus aurantiacus* (Dave *et al.*, 2014).

As diferenças nos valores de temperatura ótima entre endoglicanases podem ser devido a diferenças nas sequências de aminoácidos de cada proteína, bem como pela presença/ausência de glicosilação na estrutura da enzima (Saqib *et al.*, 2010).

5.5. Efeito do pH na atividade de CMCase

O efeito do pH sobre a atividade de CMCase no extrato bruto concentrado, frações Cel-QFF e Cel-DEAE é mostrado na figura 19. A maior atividade foi obtida em pH 4,5-5,0 nas três amostras. Das amostras analisadas, o extrato concentrado apresentou atividade celulolítica em uma faixa de pH maior, retendo pelo menos 60 % da atividade máxima entre pH 3,5 a 9,0. Nas frações Cel-QFF e Cel-DEAE, foi retida 70 % e 50 % da atividade máxima entre pH 3,5 a 7,5, respectivamente. A maior estabilidade observada pelas enzimas do extrato concentrado em maior faixa de pH em relação às frações semi purificadas, sobretudo na faixa de pH básico, pode ser devido à presença de fatores estabilizadores das proteínas presentes neste extrato e que foram removidos ao longo dos processos de purificação da enzima.

Na tabela 3 são apresentados valores de pH para uma maior atividade de CMCase (presente no extrato bruto, enzima parcialmente purificada ou purificada, como indicado na tabela) descritos na literatura. A maioria das endoglicanases descritas apresentou atividade máxima na faixa de pH ácido, o que também foi observado por Lee *et al.* (2010b) ao comparar valores na literatura. Outros pesquisadores também relataram atividade máxima de CMCase em pH ácido, com valores similares aos obtidos neste trabalho: as enzimas provenientes de *Penicillium funiculosum* (Castro *et al.*, 2010), *Thermotoga maritima* (Pereira *et al.*, 2010) e *Aspergillus terreus* (Narra *et al.*, 2014) apresentaram maior atividade em pH 4,8; e as enzimas provenientes de *Thermomonospora* sp. (George *et al.*, 2001), *Streptomyces drozdowiczii* (Lima

et al., 2005), *Aspergillus aculeatus* (Naika et al., 2007), *Penicillium purpurogenum* (Lee et al., 2010b) e *Aspergillus fumigatus* (Liu et al., 2011) apresentaram maior atividade em pH 5,0. Destes micro-organismos, três também foram cultivados em fonte de carbono lignocelulósica: *Penicillium funiculosum* (bagaço de cana de açúcar pré-tratado 0,75 %), *Aspergillus terreus* (palha de arroz 2 %) e *Penicillium purpurogenum* (palha de arroz 5 %).

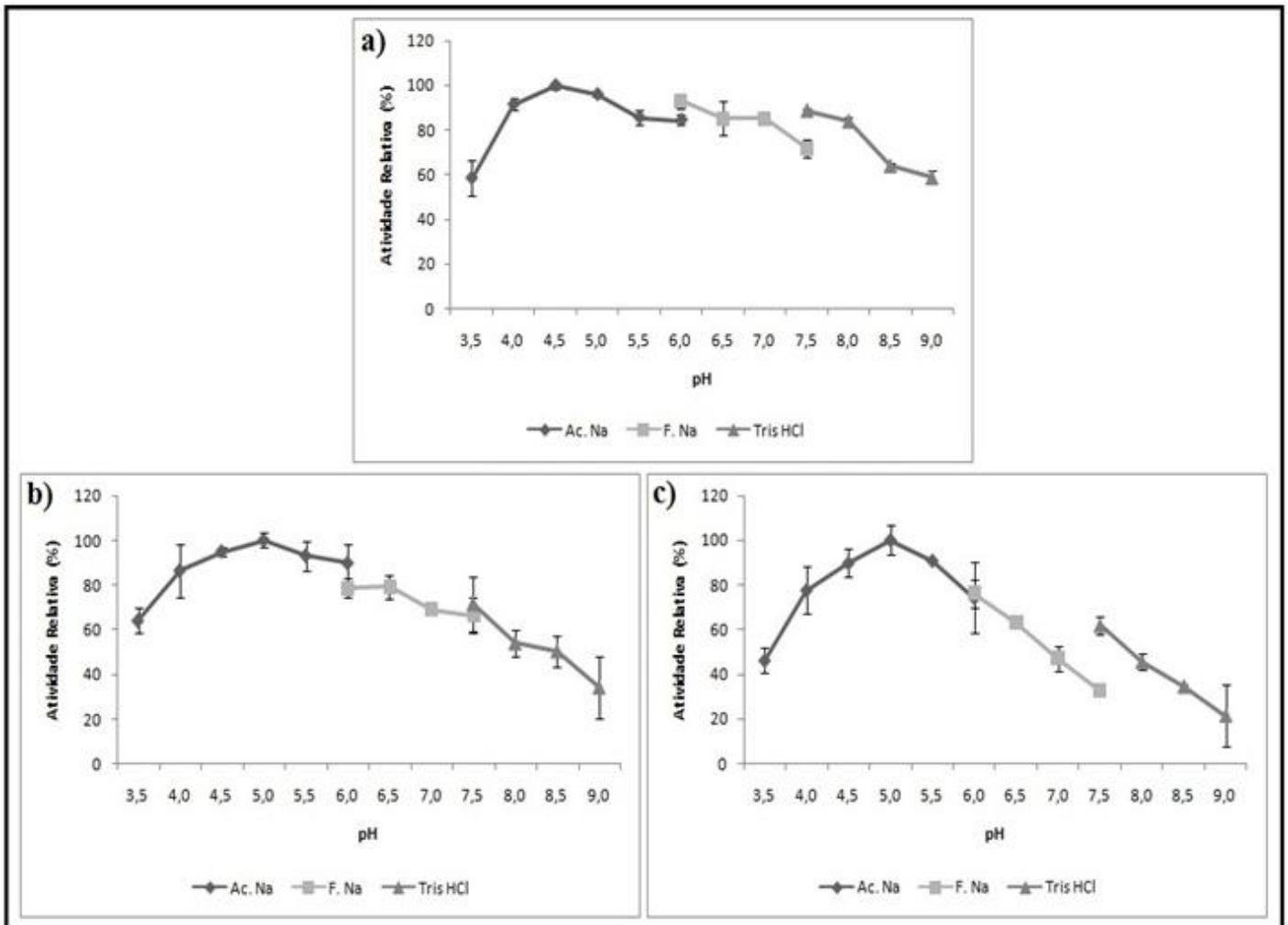


Figura 19. Efeito do pH na atividade de CMCase presente a) no extrato bruto concentrado; b) fração Cel-QFF e c) fração Cel-DEAE.

Tabela 3. Temperatura e pH descritos para maior atividade de CMCases produzidas por diferentes micro-organismos.

Organismo	Temperatura (°C)	pH	Referência
<i>Streptomyces</i> sp.	50	6,5	Jang e Chen 2003 ^(EB)
<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	50-60	5,0	Lima <i>et al.</i> , 2005 ^(EB)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	65	2,0	Lima <i>et al.</i> , 2009 ^(EB)
<i>Penicillium funiculosum</i>	58	4,8	Castro <i>et al.</i> , 2010 ^(EB)
<i>Mucor</i> sp.	55	8,0	Ma <i>et al.</i> , 2014 ^(EB)
<i>Penicillium</i> sp. TG2	50	7,0	Jung <i>et al.</i> , 2015 ^(EB)
<i>Lepista flaccida</i>	50	4,0	Elvan <i>et al.</i> , 2010 ^(PP)
<i>Thermomonospora</i> sp.	50	5,0	George <i>et al.</i> , 2001 ^(P)
<i>Volvariella volvacea</i>	55	7,5	Ding <i>et al.</i> , 2002 ^(P)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	70-80	4,0	Parry <i>et al.</i> , 2002 ^(P)
<i>Mucor circinelloides</i>	55	4,0-6,0	Saha 2004 ^(P)
<i>Penicillium occitanis</i>	60 (EGa)*	3,5	Chaabouni <i>et al.</i> , 2005 ^(P)
<i>Penicillium occitanis</i>	50 (EGb)*	3,5	Chaabouni <i>et al.</i> , 2005 ^(P)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	40	5,0	Naika <i>et al.</i> , 2007 ^(P)
<i>Daldinia eschscholzii</i>	70	6,0	Karnchanatat <i>et al.</i> , 2008 ^(P)
<i>Bacillus subtilis</i>	50	6,5	Kim <i>et al.</i> , 2009a ^(P)
<i>Penicillium brasilianum</i>	70	4,0	Krogh <i>et al.</i> , 2009 ^(P)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	70	5,0	Lee <i>et al.</i> , 2010b ^(P)
<i>Thermotoga maritima</i>	80	4,8	Pereira <i>et al.</i> , 2010 ^(P)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	50 (EG2)*	5,0	Liu <i>et al.</i> , 2011 ^(P)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	60 (EG3)*	4,0	Liu <i>et al.</i> , 2011 ^(P)
<i>Aspergillus flavus</i>	50	7,0	Gomathi <i>et al.</i> , 2012 ^(P)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	70	4,0	Dave <i>et al.</i> , 2014 ^(P)
<i>Aspergillus terreus</i>	50	4,8	Narra <i>et al.</i> , 2014 ^(P)
<i>Artemia salina</i>	55	8,0	Zin <i>et al.</i> , 2014 ^(P)
<i>Clonostachys byssicola</i>	60-70	4,5-5,0	O presente trabalho

* EG – Endoglicanase

Sobrescrito: (EB): Extrato Bruto / (PP): Enzima Parcialmente Purificada / (P): Enzima Purificada

A estabilidade das enzimas em uma ampla faixa de temperatura e pH é uma característica interessante para sua utilização em processos industriais, permitindo integração de distintos procedimentos, que requerem diferentes condições físico-químicas, em uma única etapa, reduzindo tempo e custos.

5.6. Avaliação da termoestabilidade de CMC_{Case}

Vários parâmetros são utilizados para a determinação da termoestabilidade enzimática, incluindo o tempo de meia vida da enzima. A meia vida de uma enzima é o tempo após o qual a atividade da enzima cai para 50 % da sua atividade original a uma determinada temperatura (Griffin *et al.*, 1984). A atividade residual de CMC_{Case} do extrato bruto concentrado e frações semi purificadas, Cel-QFF e Cel-DEAE, após diferentes períodos de incubação da enzima na ausência de substrato é mostrada na figura 20.

Observa-se que a 40 °C, a atividade enzimática decresce após longo período de incubação, sendo que a atividade de CMC_{Case} no extrato concentrado, fração Cel-QFF e Cel-DEAE reteve 65 %, 82 % e 97 % da atividade original após 30 dias de incubação, respectivamente. Estes resultados indicam a termoestabilidade enzimática a 40 °C das três amostras analisadas. Uma vez que as enzimas não estão purificadas, é provável que existam fatores estabilizadores das proteínas. Dessa forma, estas frações enzimáticas apresentam potencial para futuras aplicações biotecnológicas, uma vez que há crescente demanda de enzimas mais termoestáveis para utilização industrial (Bhat, 2000).

As atividades celulolíticas no extrato concentrado, frações Cel-QFF e Cel-DEAE mantiveram 38 % (após 5 dias), 42 % (após 25 dias) e 67 % (após 25 dias) da atividade original quando incubadas a 50 °C, respectivamente. Em contrapartida, a 60 °C o tempo de meia vida das enzimas nas três amostras enzimáticas é de aproximadamente 3 h (dados não mostrados).

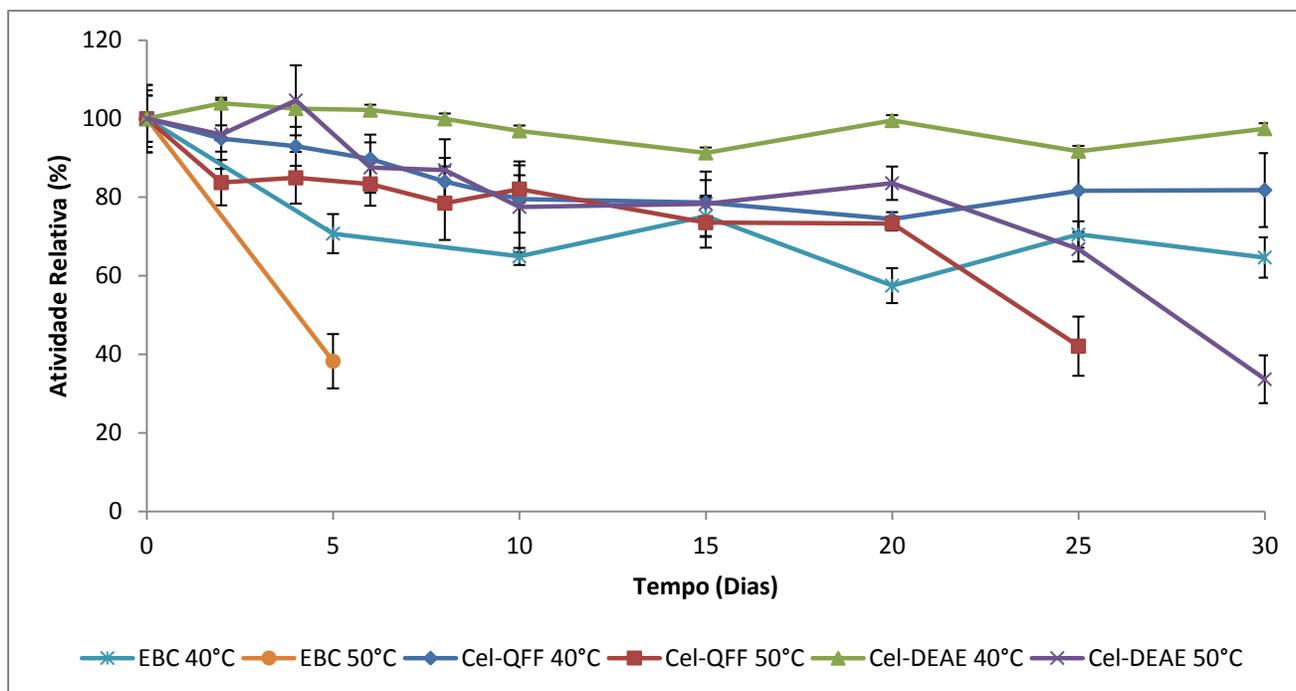


Figura 20. Efeito do tempo de incubação a 40 e 50 °C na atividade de CMCase presente no extrato bruto concentrado (EBC), fração Cel-QFF e Cel-DEAE.

Lee *et al.* (2010b) relataram que CMCase purificada de *Penicillium purpurogenum* apresentou meia vida de 72 h, 48 h, 7 h e 2 h em 40, 50, 60 e 70 °C, respectivamente. Castro *et al.* (2010) relataram que CMCase de *Penicillium funiculosum* presente no extrato bruto apresentou 53 % da atividade original após 23 h a 50 °C e 18 % após 8 h a 60 °C. Em trabalho realizado por George *et al.* (2001), CMCase purificada de *Thermomonospora* sp. apresentou meia vida de 7 h a 60 °C. Jang e Chen (2003) relataram que CMCase de *Streptomyces* sp. presente no extrato bruto manteve 98 % da atividade após 7 dias a 50 °C e 50 % após 15 h a 60 °C.

A termoestabilidade de CMCase não varia apenas entre enzimas produzidas por micro-organismos diferentes. Saqib *et al.* (2010) compararam a termoestabilidade de CMCase (presente no extrato bruto) produzida por *Aspergillus fumigatus* quando cultivado sob fermentação líquida e fermentação no estado sólido. Observou-se que a enzima foi mais termoestável quando o fungo foi cultivado em fermentação no estado sólido, levantando questões sobre possíveis diferenças estruturais nas enzimas produzidas sob processos distintos.

5.7. Atividade enzimática sobre diferentes substratos

A atividade das enzimas presentes no extrato concentrado, frações Cel-QFF e Cel-DEAE foi avaliada sobre diferentes substratos (Figura 21).

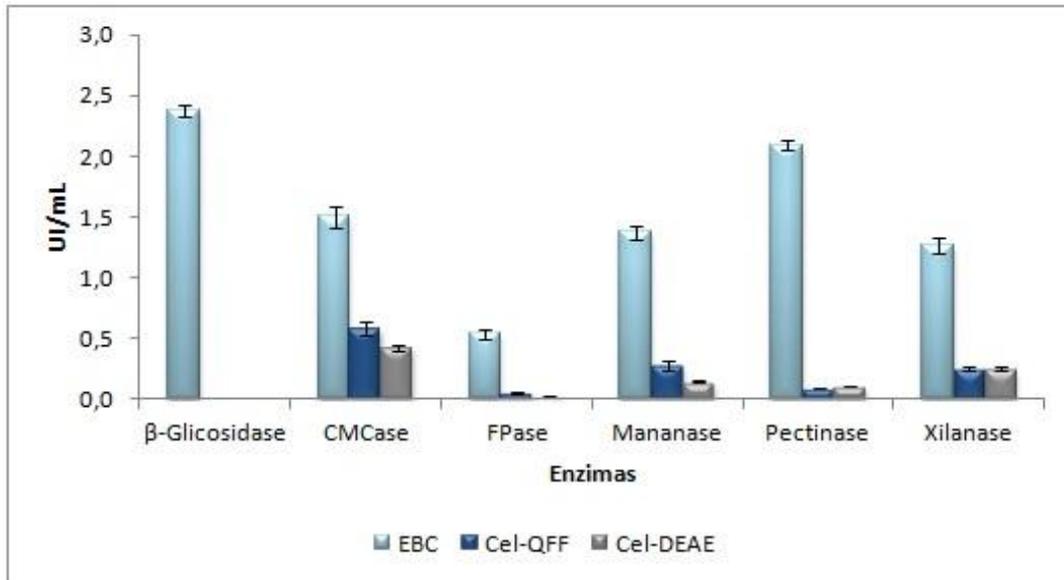


Figura 21. Atividade enzimática de β-glicosidase, CMCase, FPase, mananase, pectinase e xilanase no extrato bruto concentrado (EBC), frações Cel-QFF e Cel-DEAE.

Pode-se observar que após o processo de purificação, as frações Cel-QFF e Cel-DEAE perderam a atividade de β-glicosidase, a qual era bastante acentuada no extrato concentrado, além da redução de todas as outras atividades enzimáticas avaliadas. Este resultado está de acordo com a diminuição da quantidade de proteínas e diluição das enzimas durante as etapas de purificação (Tabela 2, tópico 5.3). Além da atividade de CMCase, a enzima semi purificada apresentou atividade de xilanase, mananase e pectinase, embora em menor escala em relação ao extrato concentrado. A atividade de avicelase não foi encontrada em nenhuma das amostras avaliadas.

5.8. Efeito de compostos fenólicos na atividade de CMCase

A biomassa lignocelulósica é altamente recalcitrante, sendo geralmente necessária a aplicação de um pré-tratamento para torná-la mais acessível à ação de enzimas. A maioria dos pré-tratamentos empregados atualmente são realizados sob condições severas, resultando na formação de compostos fenólicos a partir da degradação da lignina, os quais podem ser inibitórios para as enzimas e/ou organismos fermentadores (Ximenes *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Dessa forma, um ponto crucial para a hidrólise enzimática de holocelulose é reduzir os efeitos de inibição e de desativação das enzimas, a fim de melhorar a eficiência da hidrólise e reduzir a carga enzimática (Duarte *et al.*, 2012). A quantidade e o tipo de compostos fenólicos dependem da composição da biomassa e condições do pré-tratamento (Li *et al.*, 2014).

Neste trabalho foram analisados os efeitos inibitórios e de desativação de compostos fenólicos monoméricos (vanilina, ácido 4HB, ácido ferúlico, ácido ρ -coumárico e ácido cinâmico) e oligomérico (ácido tânico) na atividade de CMCase. As estruturas dos compostos utilizados são apresentadas na figura 22. O efeito de inibição foi determinado imediatamente após a incubação das enzimas com os compostos fenólicos (tempo zero), enquanto que o efeito de desativação foi determinado durante o período de incubação (Ximenes *et al.*, 2011). Tais efeitos sobre a atividade de CMCase no extrato concentrado e frações semi purificadas são apresentados na figura 23.

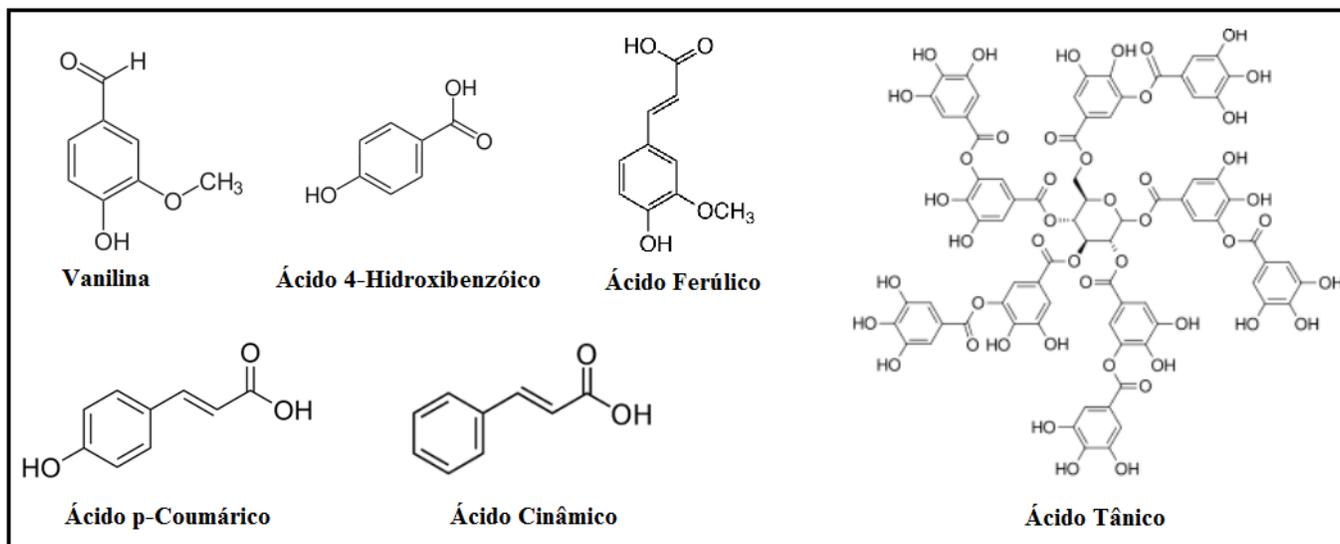


Figura 22. Estrutura dos compostos fenólicos utilizados na análise de efeitos inibitórios e de desativação na atividade de CMCase.

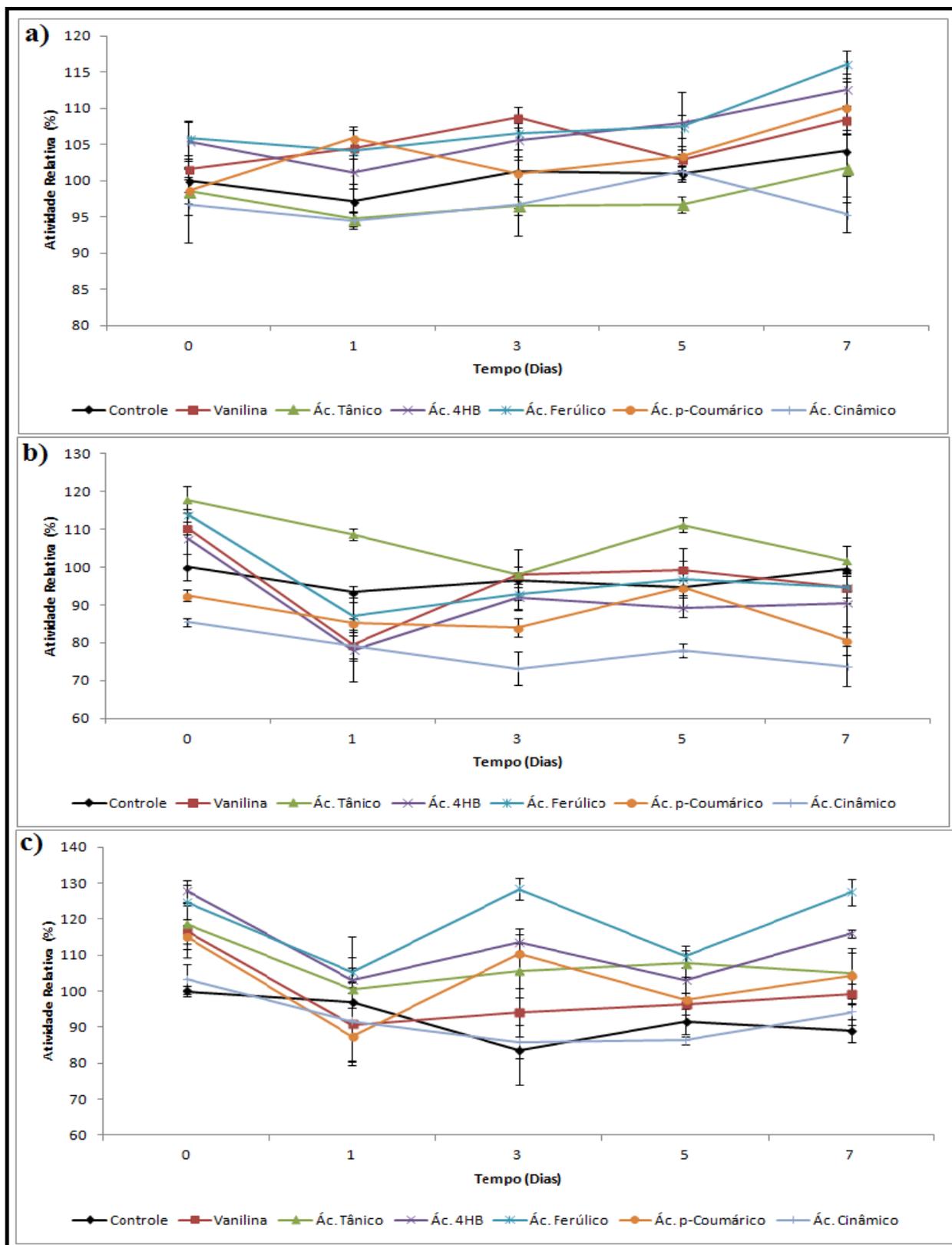


Figura 23. Efeito inibitório e de desativação de compostos fenólicos (1 mg/mL) sobre atividade de CMCase em **a)** extrato bruto concentrado; **b)** fração Cel-QFF e **c)** fração Cel-DEAE.

Observa-se na figura 23 que, apesar da oscilação da atividade enzimática no decorrer do tempo, os compostos fenólicos não apresentaram significativo efeito inibitório e de desativação sobre a atividade de CMCase presente no extrato concentrado, fração Cel-QFF e Cel-DEAE. Ácido cinâmico, entretanto, inibiu a atividade celulolítica da fração Cel-QFF em 15 % e após um período de incubação de 7 dias, a atividade decresceu 26 % devido à desativação causada pelo composto. Tais efeitos não foram observados na atividade de CMCase presente no extrato concentrado e fração Cel-DEAE utilizando-se o mesmo composto. Em contrapartida, ácido ferúlico ativou CMCase da fração Cel-DEAE em aproximadamente 25 % no início do experimento, bem como no terceiro e sétimo dias de incubação com o composto citado; ácido tânico teve efeito ativador (18 %) de CMCase da fração Cel-QFF e Cel-DEAE no início do experimento (tempo zero).

De acordo com os dados apresentados, a atividade de CMCase se mostrou resistente a inibição e desativação pelos compostos fenólicos analisados, propriedade que favorece a utilização desta enzima em futuras aplicações industriais. Atualmente, várias estratégias estão sendo desenvolvidas para amenizar tais problemas de inibição de enzimas e organismos fermentadores por compostos fenólicos, existindo uma variedade de diferentes métodos químicos, biológicos e físicos que podem ser utilizados para tal propósito (Cao *et al.*, 2013; Jönsson *et al.*, 2013). No entanto, o passo de detoxificação dos inibidores fenólicos é uma etapa adicional no processo de sacarificação da biomassa, de forma que a utilização de enzimas (e organismos fermentadores) resistentes torna-se vantajoso.

Li *et al.* (2014) conduziram experimento para analisar a inibição de vanilina na atividade de endoglicanase, celobiohidrolase e β -glicosidase (celulase comercial proveniente de *Trichoderma reesei*). Os resultados mostraram que as atividades decresceram 4,2 %, 8,3 % e 40,4 %, respectivamente, na presença de 5 mg/mL de vanilina, demonstrando que este composto inibiu acentuadamente a atividade de β -glicosidase. À medida que a concentração de vanilina aumentava, a atividade relativa de celulase decrescia, indicando que o efeito inibitório do composto é dependente da sua concentração. Ademais, Ximenes *et al.* (2010) confirmaram que vanilina, siringaldeído, ácido cinâmico e ácido 4-hidroxibenzoico inibem significativamente a atividade celulolítica. β -glicosidase de *T. reesei* foi mais sensível que β -glicosidase de *A. niger*:

10 mg/mL de ácido 4-hidróxibenzóico inibiu a hidrólise de celobiose em 92,5 % e 35 %, respectivamente.

Tejirian e Xu (2011) observaram que compostos fenólicos oligoméricos possuem maior efeito inibitório na atividade celulolítica que compostos fenólicos simples. Ácido tânico, por exemplo, é capaz de formar complexo com as celulases, levando à precipitação proteica e consequente perda de atividade enzimática na hidrólise de celulose.

Ximenes *et al.* (2011) realizaram experimentos de inibição e desativação de celulases por compostos fenólicos (vanilina, ácidos tânico, gálico, cinâmico e 4-hidróxibenzóico). Ácido tânico na concentração de 2 mg/mL inibiu a atividade de CMCase e FPase em aproximadamente 25 % e 60 %, respectivamente. Em relação ao efeito de desativação, após 24 h de incubação, ácido tânico na concentração de 5 mg/mL causou uma diminuição da atividade de CMCase e FPase em 80 % e 60 %, respectivamente. Os outros compostos tiveram pouco ou nenhum efeito inibitório. Em contrapartida, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que ácido tânico (na concentração de 1 mg/mL) além de não apresentar efeito de desativação sobre CMCase de *C. byssicola*, aumentou a atividade enzimática das frações semi purificadas no início do experimento.

Em estudo realizado por Martin e Akin (1988), compostos fenólicos na concentração de 1,0 e 1,5 mg/mL foram incubados com celulase de *Bacteroides succinogenes*: ácido ρ -coumárico inibiu a atividade de CMCase em 28 % e 45 % (nas respectivas concentrações); vanilina inibiu CMCase em 18 % e 27 % e ácido ferúlico não teve efeito inibitório. Em comparação, ácido ρ -coumárico (1,0 mg/mL) inibiu 7 % da atividade de CMCase da fração Cel-QFF; vanilina e ácido ferúlico não tiveram efeito inibitório nas três amostras avaliadas.

Os efeitos dos compostos fenólicos são observados não apenas na atividade enzimática, mas também na produção das enzimas por micro-organismos. Vohra *et al.* (1980) observaram que vanilina na concentração de 0,5 mg/mL inibiu a produção de CMCase, avicelase e β -glicosidase por *T. reesei* em 78 %, 100 % e 100 %, respectivamente, além de inibir o crescimento do fungo em 94 %. Ácido ferúlico inibiu a produção das mesmas enzimas em 75 %, 86 % e 100 %, respectivamente, possuindo pouco efeito no crescimento do micro-organismo.

A comparação entre os resultados obtidos neste trabalho com os dados da literatura mostra que o efeito dos compostos fenólicos varia entre enzimas produzidas por diferentes micro-organismos, diferentes enzimas (CMCase, FPase, β -glicosidase) produzidas pelo mesmo organismo, tipo e concentração do composto utilizado.

5.9. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de CMCase

O efeito de íons metálicos e EDTA na concentração de 1 mM e 10 mM sobre a atividade de CMCase presente no extrato concentrado, fração Cel-QFF e Cel-DEAE é apresentado nas tabelas 4 e 5. Os íons que apresentaram maior efeito inibitório na atividade enzimática foram Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} , sendo que a enzima semi purificada foi mais afetada. O íon Fe^{3+} na concentração de 10 mM inibiu completamente CMCase presente em Cel-QFF e Cel-DEAE, enquanto Fe^{2+} (na mesma concentração) inibiu 75 % e 94 %, respectivamente. Além disso, Cu^{2+} (10 mM) inibiu a atividade de CMCase da fração Cel-DEAE em 70 %; e Zn^{2+} (10 mM) inibiu a atividade enzimática das frações semi purificadas em aproximadamente 40 %. Em contrapartida, Co^{2+} (10 mM) ativou a atividade celulolítica presente no extrato concentrado (16,4 %), fração Cel-QFF (20,7 %) e Cel-DEAE (24,6 %). Ademais, o agente quelante EDTA não apresentou efeito inibitório na atividade de CMCase das três amostras avaliadas, indicando que a atividade desta enzima não depende da presença de íons metálicos.

Entre os íons metálicos divalentes, na maioria das vezes Cu^{2+} e Fe^{2+} exercem forte inibição em enzimas celulolíticas, tanto celobiohidrolases, endoglicanases e β -glicosidases (Tejirian e Xu, 2010). Este relato é corroborado pelo presente trabalho, bem como estudos realizados por Li *et al.* (2006), Karnchanatat *et al.* (2008), Elvan *et al.* (2010) e Xiang *et al.* (2014). (Tabela 6). O efeito inibitório destes íons pode ser atribuído a uma interação prejudicial às celulasas, a qual pode causar uma mudança conformacional na proteína ou substituição de um cofator nativo (Tejirian e Xu, 2010).

Tabela 4. Efeito de íons metálicos e EDTA na concentração de 1 mM na atividade de CMCase do extrato bruto concentrado (EBC), frações Cel-QFF e Cel-DEAE.

	Atividade Relativa (%)		
	EBC	Cel-QFF	Cel-DEAE
Controle	100,0 ± 1,08	100,0 ± 3,51	100,0 ± 0,10
AgNO ₃	103,3 ± 2,00	93,7 ± 4,27	96,3 ± 5,71
CaCl ₂	96,7 ± 2,75	98,4 ± 3,53	96,8 ± 1,42
CoCl ₂	114,4 ± 0,64	116,8 ± 4,95	116,4 ± 2,11
CuCl ₂	94,6 ± 4,95	79,6 ± 4,87	66,0 ± 5,08
CuSO ₄	87,9 ± 0,86	65,9 ± 3,85	67,0 ± 1,47
FeCl ₃	104,9 ± 5,25	81,1 ± 1,63	47,6 ± 1,62
FeSO ₄	102,4 ± 0,82	87,2 ± 3,44	75,6 ± 1,05
KCl	100,0 ± 1,24	95,9 ± 2,14	95,0 ± 1,79
MgCl ₂	121,7 ± 0,82	99,6 ± 2,97	98,0 ± 6,49
MgSO ₄	96,6 ± 1,55	96,5 ± 0,47	96,0 ± 4,87
NaCl	106,3 ± 1,14	97,9 ± 0,15	96,2 ± 3,64
ZnCl ₂	107,9 ± 0,40	99,4 ± 3,14	99,7 ± 2,20
ZnSO ₄	102,7 ± 2,14	94,7 ± 4,31	72,9 ± 3,86
EDTA	98,5 ± 0,66	99,2 ± 3,04	102,6 ± 3,48

Tabela 5. Efeito de íons metálicos e EDTA na concentração de 10 mM na atividade de CMCase do extrato bruto concentrado (EBC), frações Cel-QFF e Cel-DEAE.

	Atividade Relativa (%)		
	EBC	Cel-QFF	Cel-DEAE
Controle	100,0 ± 3,13	100,0 ± 3,61	100,0 ± 3,32
CaCl ₂	107,5 ± 4,66	100,0 ± 3,46	90,1 ± 2,94
CoCl ₂	116,4 ± 4,71	120,7 ± 2,14	124,6 ± 2,94
CuCl ₂	90,6 ± 3,34	66,8 ± 4,07	86,8 ± 4,54
CuSO ₄	88,9 ± 2,49	60,8 ± 6,29	30,1 ± 4,98
FeCl ₃	90,5 ± 2,37	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
FeSO ₄	94,8 ± 2,91	25,4 ± 4,29	6,1 ± 7,23
KCl	91,1 ± 2,01	107,1 ± 2,32	97,1 ± 6,19
MgCl ₂	98,3 ± 0,36	106,8 ± 6,28	107,8 ± 1,78
MgSO ₄	98,5 ± 1,32	96,1 ± 0,56	98,9 ± 2,74
NaCl	106,7 ± 3,88	91,6 ± 1,67	90,4 ± 3,39
ZnCl ₂	107,6 ± 0,53	56,5 ± 1,67	63,1 ± 2,36
ZnSO ₄	106,1 ± 0,96	56,9 ± 5,63	58,9 ± 5,79
EDTA	99,7 ± 2,66	103,0 ± 3,24	102,3 ± 2,84

O efeito de íons metálicos e EDTA varia entre CMCases produzidas por diferentes micro-organismos, conforme apresentado na tabela 6. A ativação de CMCase por Mg²⁺, por exemplo, foi observada por tal enzima proveniente de fontes distintas: bactéria (*Streptomyces drozdowiczii*) (Lima *et al.*, 2005), fungo (*Daldinia eschscholzii*) (Karnchanatat *et al.*, 2008), biblioteca metagenômica (Xiang *et al.*, 2014) e crustáceo (*Artemia salina*) (Zin *et al.*, 2014); enquanto o efeito inibitório deste íon foi observado em CMCase de *Aspergillus flavus* (Gomathi *et al.*, 2012) e *Mucor* sp. (Ma *et al.*, 2014).

Tabela 6. Efeitos de íons metálicos e EDTA na atividade de CMCCase relatados na literatura.

[] mM	Ativador	Inibidor	Referência
2	-	Co ²⁺ , Hg ²⁺ , Mn ²⁺	Chaabouni <i>et al.</i> , 2005
10	Ba ²⁺ , Fe ²⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺	Cu ²⁺	Lima <i>et al.</i> , 2005
5	-	Cu ²⁺ , Fe ²⁺	Li <i>et al.</i> , 2006
1	Co ²⁺ , Mg ²⁺ , EDTA	Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Hg ²⁺	Karnchanatat <i>et al.</i> , 2008
5	Ca ²⁺	Co ²⁺ , Hg ²⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , EDTA	Lee <i>et al.</i> , 2008
5	K ⁺ , Ni ²⁺ , EDTA	Co ²⁺ , Hg ²⁺	Kim <i>et al.</i> , 2009a
1	Co ²⁺ , Na ⁺ , Mn ²⁺	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Li ⁺ , Zn ²⁺ , EDTA	Elvan <i>et al.</i> , 2010
0,5	Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Na ⁺ , Zn ²⁺	Mg ²⁺	Gomathi <i>et al.</i> , 2012
10	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	Ba ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺	Ma <i>et al.</i> , 2014
2	Ca ²⁺ , Zn ²⁺	Ag ³⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺ , Na ⁺ , EDTA	Narra <i>et al.</i> , 2014
5	Ca ²⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Li ⁺ , EDTA	Xiang <i>et al.</i> , 2014
1	Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Mg ²⁺ e Mn ²⁺	Fe ²⁺ , EDTA	Zin <i>et al.</i> , 2014

5.10. Determinação dos parâmetros cinéticos

Foram estimados os parâmetros cinéticos de CMCCase do extrato bruto concentrado e fração Cel-DEAE, sendo que o extrato concentrado apresentou k_M aparente de $24,96 \pm 3,97$ mg/mL e $V_{m\acute{a}x}$ de $2,14 \pm 0,19$ UI/mL, enquanto a fração semi-purificada apresentou k_M de $15,81 \pm 1,65$ mg/mL e $V_{m\acute{a}x}$ de $0,59 \pm 0,03$ UI/mL. O menor valor de k_M observado na fração Cel-DEAE sugere a maior afinidade das enzimas desta fração por carboximetilcelulose em relação às enzimas do extrato concentrado.

Resultado próximo ao obtido na fração semi purificada foi encontrado no trabalho de Castro *et al.* (2010), em que CMCCase do extrato bruto de *Penicillium funiculosum* (crescido em bagaço de cana de açúcar pré-tratado 0,75 %) apresentou valores de k_M e $V_{m\acute{a}x}$ de 17,7 mg/mL e 0,78 UI/mL, respectivamente.

5.11. Ensaio de Hidrólise Enzimática

A figura 24 apresenta a quantificação de açúcares redutores totais por DNS resultantes da hidrólise dos substratos comerciais por enzimas presentes no extrato bruto concentrado e fração Cel-QFF.

A quantidade de açúcar redutor aumentou gradualmente durante as 48 h de hidrólise dos substratos comerciais, exceto na hidrólise de manana 1 % (maior liberação de açúcar ocorreu no tempo de 12 h) e CMC 1 % (liberação de açúcar constante) pelo extrato concentrado. No experimento com o extrato concentrado, a maior liberação de açúcar foi resultante da hidrólise de papel de filtro, seguida pela hidrólise de CMC 4 %. Embora a atividade de FPase seja menor que a atividade de CMCase (Figura 21, tópico 5.7), a maior liberação de açúcares redutores pela degradação de papel de filtro pode ser explicada pelo maior tempo de incubação do ensaio, o qual é necessário para eficiente hidrólise de substrato mais complexo. Em contrapartida, no experimento com a fração Cel-QFF, maior quantidade de açúcar é liberada na hidrólise de CMC 4 %, sendo que a hidrólise de avicel e papel de filtro liberaram as menores quantidades. Este resultado está de acordo com as atividades enzimáticas encontradas no extrato concentrado e fração Cel-QFF (Figura 21, tópico 5.7), em que ocorre acentuada redução da atividade de FPase após o processo de purificação do extrato concentrado.

A figura 25 apresenta a quantificação de açúcares redutores totais por DNS resultantes da hidrólise de casca de soja 1 % e bagaço de cana de açúcar 1 % por enzimas presentes no extrato bruto concentrado e fração Cel-QFF.

A liberação de açúcar aumenta gradualmente durante os 10 dias de hidrólise dos substratos lignocelulósicos, sendo que a quantidade de açúcar proveniente da degradação da casca de soja é nitidamente maior, principalmente no experimento com o extrato concentrado. Uma vez que o fungo *Clonostachys byssicola* foi cultivado em meio suplementado com casca de soja como fonte de carbono, é provável que as enzimas secretadas durante o crescimento do micro-organismo possuam atividade enzimática mais proeminente sobre este substrato. Fato similar também foi observado por Juhász *et al.* (2005): a hidrólise enzimática de salgueiro e palha de milho foi mais eficiente quando utilizadas as enzimas produzidas por *T. reesei*, quando cultivado em meio líquido contendo os respectivos substratos como fonte de carbono. Dessa

forma, pode ser vantajoso, no caso de alguns substratos, utilizar as enzimas produzidas para a hidrólise do mesmo substrato que foi utilizado como fonte de carbono para o cultivo do micro-organismo.

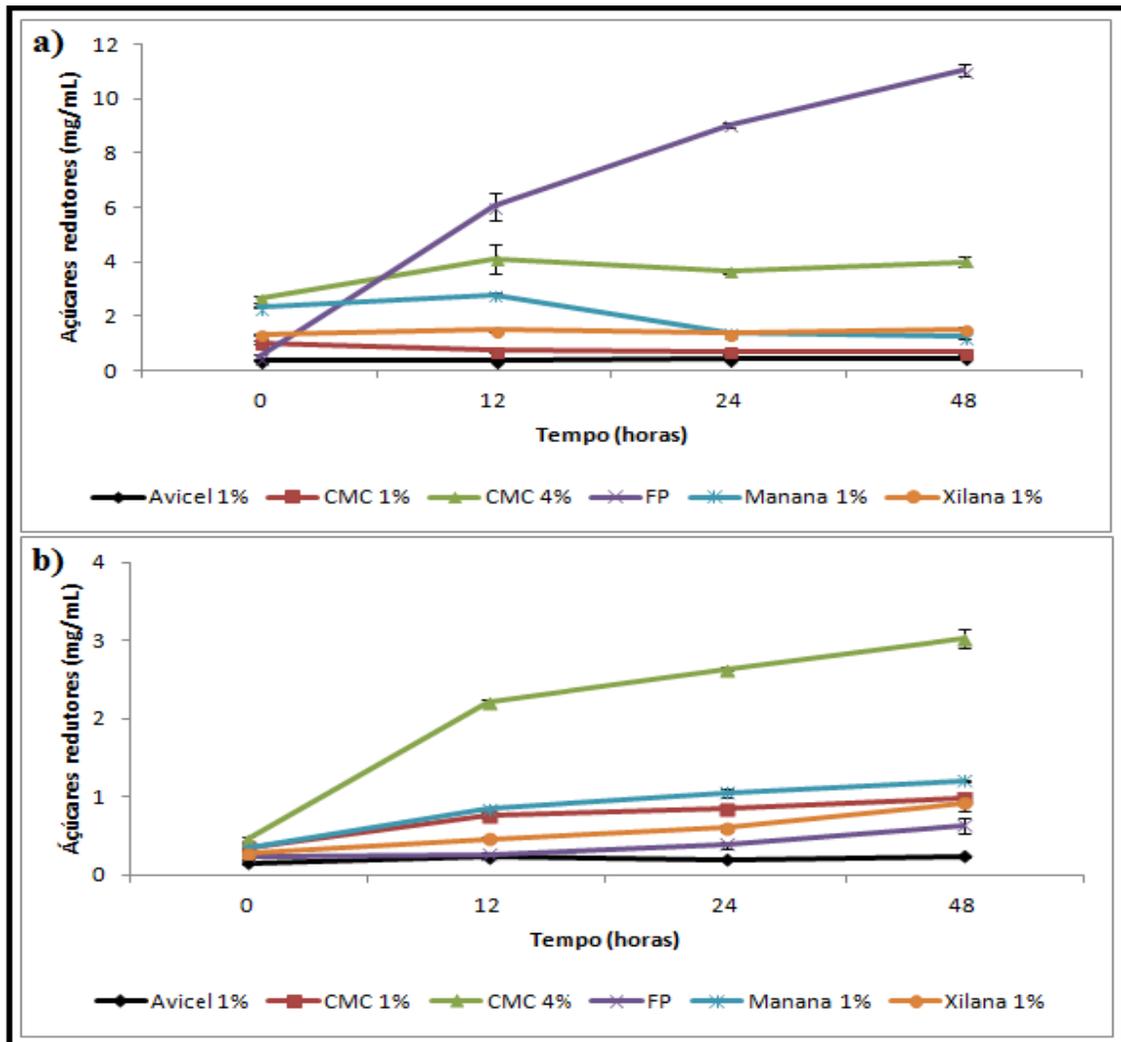


Figura 24. Quantificação de açúcares redutores totais por DNS resultantes da hidrólise de avicel, carboximetilcelulose (CMC), papel de filtro (FP), manana e xilana por enzimas presentes **a)** no extrato bruto concentrado e **b)** na fração Cel-QFF.

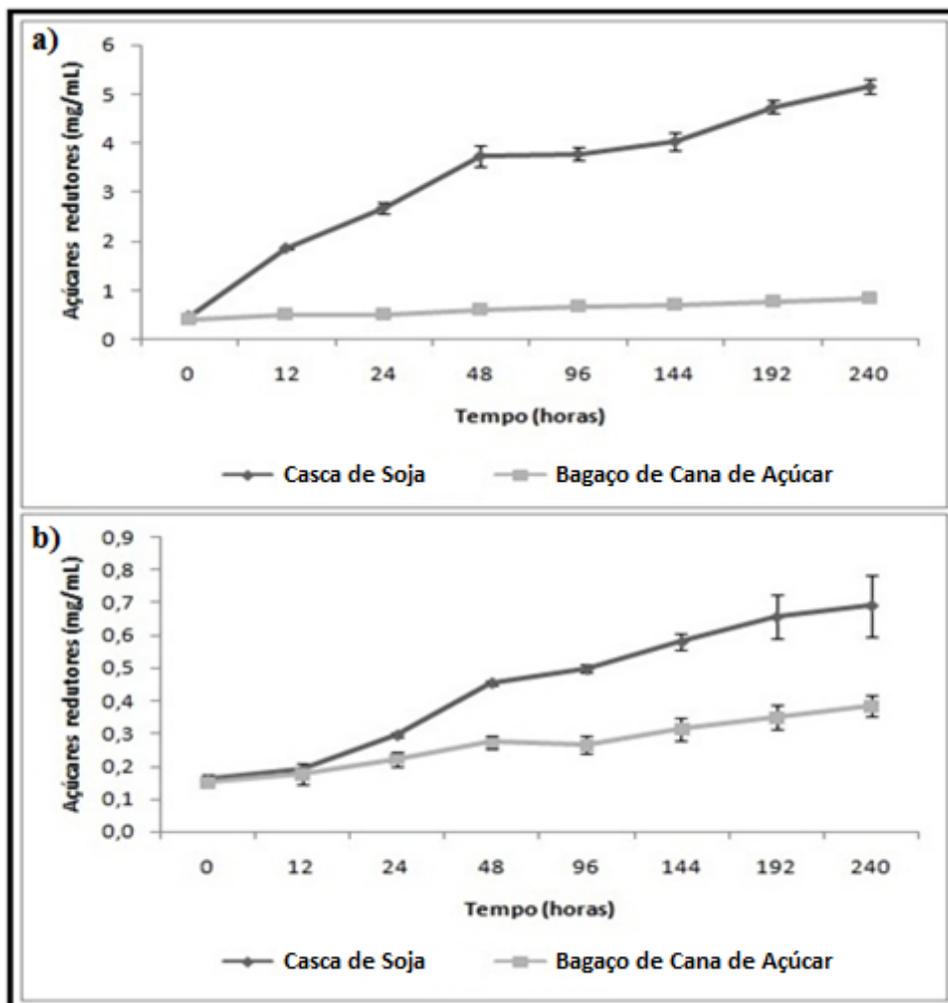


Figura 25. Quantificação de açúcares redutores totais por DNS resultantes da hidrólise da casca de soja 1 % e bagaço de cana de açúcar 1 % por enzimas presentes **a)** no extrato bruto concentrado e **b)** na fração Cel-QFF.

A liberação de glicose resultante da hidrólise dos substratos comerciais e lignocelulósicos seguiu o mesmo padrão (no decorrer do tempo) da liberação de açúcares redutores totais (dados não mostrados).

A análise por HPLC mostrou que na degradação de CMC 4 % por enzimas do extrato concentrado foram liberados glicose, celopentaose e celohexaose, sendo que houve maior liberação de glicose e celohexaose no momento inicial do ensaio de hidrólise (0 h), enquanto a liberação de celopentaose ocorreu entre 12 h e 24 h. No experimento com a fração Cel-QFF,

apenas glicose foi liberada, cuja quantidade aumenta gradualmente com o decorrer do tempo. A figura 26 mostra o resultado da ANOVA fatorial, com intervalo de confiança de 95 %, da liberação de celossacarídeos em função do tempo.

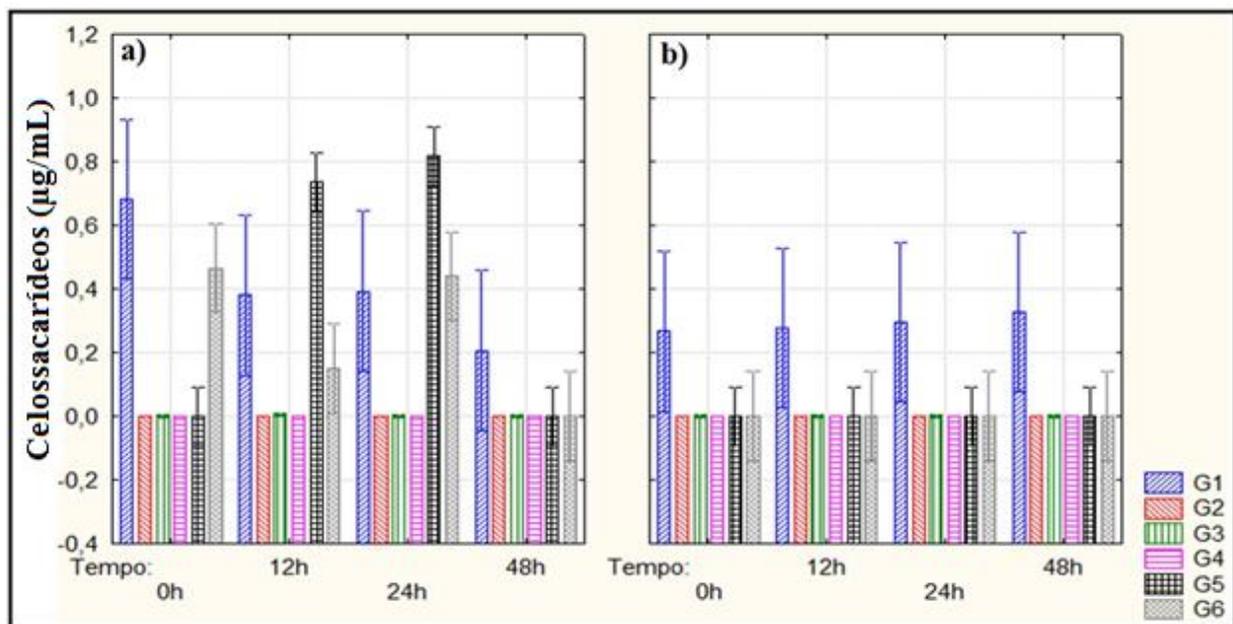


Figura 26. Identificação e quantificação dos celossacarídeos liberados durante hidrólise de CMC 4 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF. G1, glicose; G2, celobiose; G3, celotriose; G4, celotetraose; G5, celopentaose; G6, celohexaose.

Na hidrólise de CMC 1 % por enzimas do extrato concentrado, houve liberação de celopentaose e glicose, enquanto na degradação deste substrato pela fração semi purificada foram liberadas celobiose e glicose; neste experimento foi detectada menor quantidade dos celossacarídeos citados em relação à hidrólise de CMC 4 % (Figura 27). Comparativamente, na hidrólise de CMC 1 % pelo extrato concentrado não houve liberação de celohexaose, como observado na degradação de CMC 4%; além disso, foi liberada celobiose durante a hidrólise de CMC 1 % pela fração Cel-QFF, resultado não observado para CMC 4%.

Na degradação de avicel 1 %, apenas quantidades muito baixas (< 0,1 µg/mL) de glicose e celotriose (no experimento utilizando o extrato concentrado) e glicose e celobiose (fração Cel-QFF) foram detectadas (dados não mostrados).

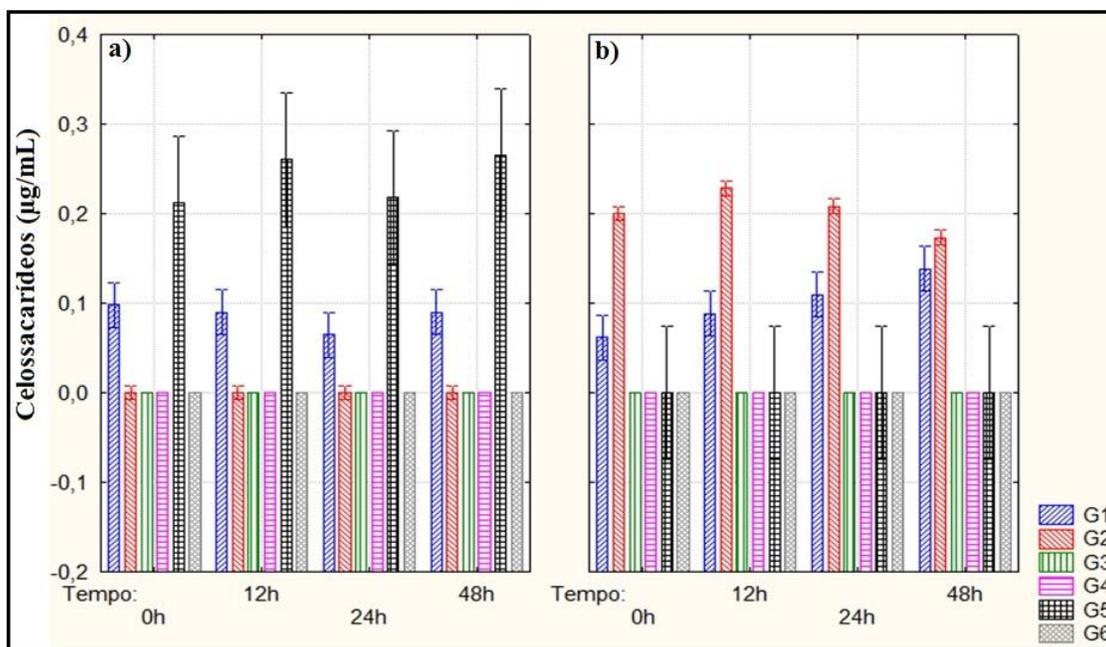


Figura 27. Identificação e quantificação dos celossacarídeos liberados durante hidrólise de CMC 1 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF. G1, glicose; G2, celobiose; G3, celotriose; G4, celotetraose; G5, celopentaose; G6, celohexaose.

Na figura 28, observa-se aumento na liberação de glicose e celopentaose no decorrer da hidrólise de papel de filtro por enzimas presentes no extrato concentrado. Da mesma forma, uma crescente liberação de glicose também é observada na degradação do substrato por enzimas da fração Cel-QFF, porém em uma quantidade muito menor (em comparação ao experimento com o extrato concentrado). Este resultado está de acordo com a elevada atividade de β -glicosidase e FPase observada no extrato concentrado (Figura 21, tópico 5.7), fazendo com que a ação sinérgica entre as enzimas presentes neste extrato libere maior quantidade de celossacarídeos.

Na hidrólise de manana 1 % por enzimas do extrato concentrado há liberação de todos os manossacarídeos, com exceção de manohexaose. Houve maior liberação de manose e manotetraose entre 0 h e 12 h; manobiose em 24 h; manotriose em 12 h e manopentaose em 48 h. De forma geral, nota-se uma maior liberação de manossacarídeos até 12 h de hidrólise, podendo-se supor que ocorra uma inibição da atividade catalítica das enzimas pelo acúmulo de produtos formados. No experimento com a fração Cel-QFF todos os manossacarídeos foram liberados nos quatro tempos analisados, conforme dados apresentados na figura 29.

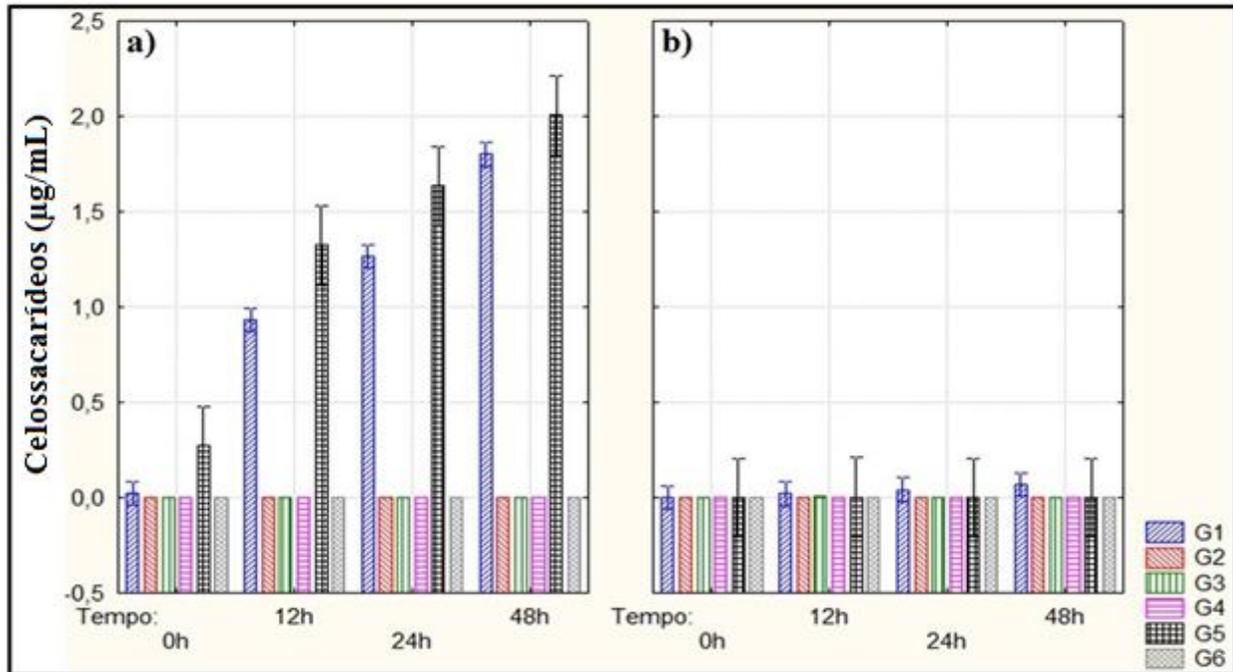


Figura 28. Identificação e quantificação dos celossacarídeos liberados durante hidrólise de papel de filtro em função do tempo por enzimas presentes **a)** no extrato bruto concentrado e **b)** na fração Cel-QFF. G1, glicose; G2, celobiose; G3, celotriose; G4, celotetraose; G5, celopentaose; G6, celohexaose.

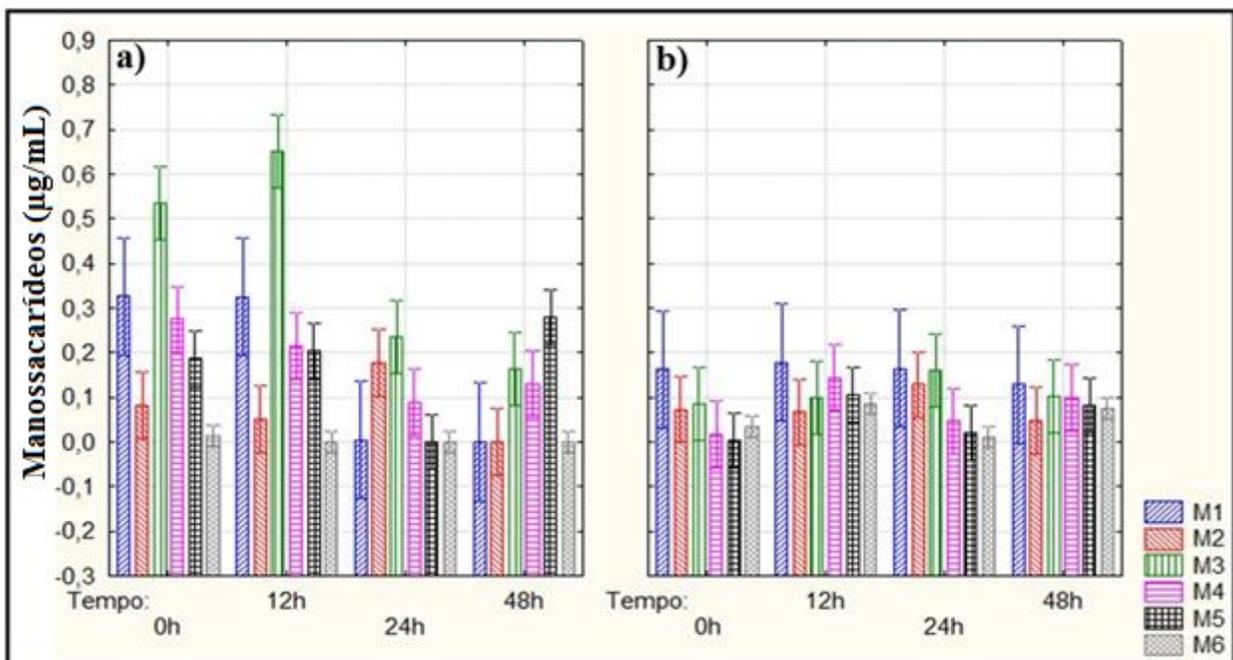


Figura 29. Identificação e quantificação dos manossacarídeos liberados durante hidrólise de manana 1 % em função do tempo por enzimas presentes **a)** no extrato bruto concentrado e **b)** na fração Cel-QFF. M1, manose; M2, manobiose; M3, manotriose; M4, manotetraose; M5, manopentaose; M6, manohexaose.

Assim como ocorreu na hidrólise de manana 1 %, na hidrólise de xilana 1 % por enzimas do extrato concentrado houve liberação de todos os xilossacarídeos, com exceção de xilohexaose. Conforme dados apresentados na figura 30, maior quantidade de xilose, xilotriose e xilotetraose foi observada em 0 h e 12 h; xilobiose em 24 h e xilopentaose em 48 h. Na degradação de xilana por enzimas da fração Cel-QFF houve apenas liberação de xilobiose e xilotriose (em menor escala), cuja quantidade aumenta gradualmente com o decorrer do tempo.

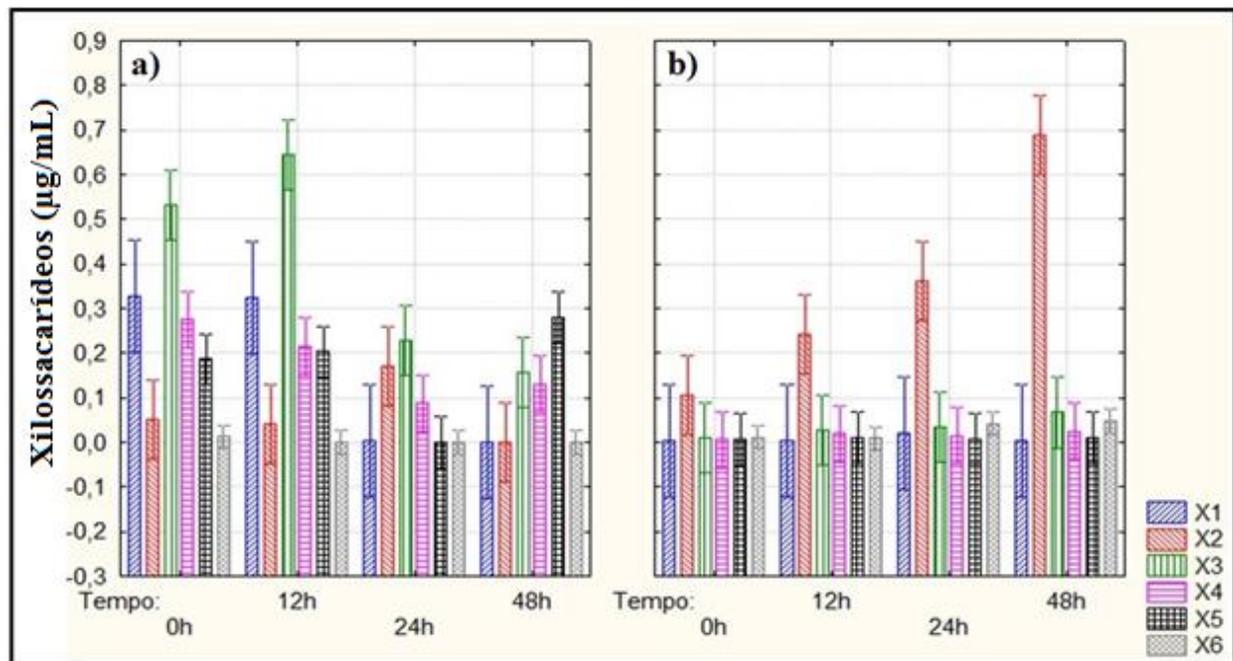


Figura 30. Identificação e quantificação dos xilossacarídeos liberados durante hidrólise de xilana 1 % em função do tempo por enzimas presentes **a)** no extrato bruto concentrado e **b)** na fração Cel-QFF. X1, xilose; X2, xilobiose; X3, xilotriose; X4, xilotetraose; X5, xilopentaose; X6, xilohexaose.

A liberação de manossacarídeos e xilossacarídeos pode ser explicada pela presença de mananase e xilanase nas amostras utilizadas para o ensaio de hidrólise. Conforme apresentado anteriormente, *C. byssicola* secretou enzimas hemicelulolíticas quando crescido em casca de soja como fonte de carbono, sendo que o extrato bruto concentrado apresentou elevadas atividades de mananase (1,37 UI/mL) e xilanase (1,26 UI/mL) (Figura 21, tópico 5.7). Em contrapartida, na fração Cel-QFF, pode-se supor uma atividade inespecífica de CMCase catalisando a hidrólise de ligações do tipo β -1,4 (dos substratos em questão) ou ainda presença de outras enzimas nesta fração, uma vez que ela não está completamente purificada.

Em trabalho realizado por Karnchanatat *et al.* (2008), a hidrólise enzimática de CMC 1 % por CMCase purificada de *Daldinia eschscholzii* gerou celobiose, celotriose, celotetraose e menor quantidade de glicose.

Liu *et al.* (2011) realizaram ensaio de hidrólise enzimática de celooligosacarídeos (G2, G3, G4 e G5) e CMC 1 % com duas CMCases purificadas de *Aspergillus fumigatus*: Egl2 e Egl3. Observou-se que Egl2 foi capaz de hidrolisar celotetraose e celopentaose, enquanto Egl3 hidrolisou celotriose, celotetraose e celopentaose. Na degradação de CMC, Egl2 liberou celobiose, celotriose e celotetraose, enquanto Egl3 gerou glicose e celobiose.

CMCase purificada de *Thermoascus aurantiacus* liberou principalmente celobiose e celotriose após hidrólise de CMC; glicose, celobiose e celotriose foram detectadas após hidrólise de H₃PO₄-swollen Avicel (Parry *et al.*, 2002). Em trabalho realizado por Xiang *et al.* (2014), os principais produtos de hidrólise de CMC 1 % por CMCase purificada foram celobiose, celotriose e celotetraose.

Chaabouni *et al.* (2005) realizaram ensaio de hidrólise enzimática de PASC 1 % (*phosphoric acid swollen cellulose*) a 50 °C por 2 h com duas endoglicanases purificadas de *Penicillium occitanis*: EGa e EGb. Os produtos de hidrólise foram celotriose (22 %), celobiose (78 %) e traços de glicose quando EGa foi utilizada e celotriose (65 %), celobiose (25 %) e glicose (10 %) quando o experimento foi realizado com EGb.

Em trabalho realizado por Jørgensen *et al.* (2003), cinco celulases de *Penicillium brasilianum* (CBHa, CBHb – celobiohidrolases / EGa, EGb1 e EGb2 – endoglicanases) foram purificadas e utilizadas em ensaio de hidrólise enzimática de Avicel 1 %. CBHa e CBHb liberaram principalmente celobiose (92-94 %) e pequena quantidade de glicose. EGa, EGb1 e EGb2 liberaram celotriose (21-24 %), celobiose (70-76 %) e glicose (3-7 %).

Analisando os dados relatados na literatura, observa-se que os produtos de hidrólise de celulose por endoglicanases foram predominantemente celobiose e celotriose, sendo que a liberação de glicose e celotetraose também foi comum. Os resultados obtidos neste trabalho, por sua vez, mostraram liberação principalmente de glicose, celopentaose e celohexaose a partir da hidrólise de CMC e papel de filtro.

Medve *et al.* (1988) realizaram ensaio de hidrólise enzimática de Avicel 1 % por endoglicanase II (EGII) de *T. reesei*. Observou-se maior liberação de celobiose, seguido por glicose e celotriose. Embora a liberação de sacarídeos com baixo grau de polimerização não seja típico de atividade de endoglicanases, hipóteses são sugeridas: 1) múltiplas clivagens aleatórias na mesma cadeia de celulose, resultando em pequenos fragmentos que podem ser hidrolisados ainda mais pelas enzimas; 2) as clivagens aleatórias sobre o substrato podem ocorrer próximo às extremidades da cadeia; 3) tal clivagem aleatória na extremidade da cadeia pode acontecer não apenas ao acaso, mas endoglicanases podem ter preferência pelas extremidades; 4) endoglicanases, assim como celobiohidrolases, podem ser processivas (Medve *et al.*, 1988).

A habilidade de hidrolisar CMC sugere que as enzimas semi purificadas obtidas neste trabalho sejam endoglicanases, uma vez que celobiohidrolases não degradam este substrato eficientemente devido aos grupos carboximetils laterais, os quais impedem que a cadeia de celulose entre no estreito túnel que conduz ao sítio ativo das celobiohidrolases (Jørgensen *et al.*, 2003). Além disso, o padrão de produtos de hidrólise dos substratos celulósicos é semelhante ao observado por outras endoglicanases relatadas na literatura, novamente corroborando o suposto mecanismo de ação da enzima semi purificada.

A hidrólise enzimática da casca de soja por enzimas presentes no extrato concentrado gerou predominantemente celohexaose e celopentaose, os quais foram liberados entre 12 h e 48 h, período em que também foi liberada glicose (em menor quantidade). Houve liberação de celotetraose a partir de 96 h, momento em que a liberação dos outros celossacarídeos decresceu, conforme apresentado na figura 31. Os principais manossacarídeos liberados foram manotetraose (entre 12 h e 48 h) e manobiose (entre 96 h e 240 h), em baixas quantidades (< 0,2 µg/mL) (dados não mostrados). Dos xilossacarídeos, xilobiose foi liberada em maior quantidade (entre 12 h e 48 h). No experimento com as enzimas da fração Cel-QFF, quantidade muito menor de sacarídeos foi detectada, sendo liberados principalmente celopentaose e glicose; manose; xilobiose e xilopentaose. Estes resultados demonstram o sinergismo entre as enzimas do extrato concentrado para degradação da biomassa da casca da soja, visto a alta liberação de sacarídeos durante a hidrólise deste substrato.

Como apresentado anteriormente, a quantificação de açúcares redutores totais pelo método do DNS mostrou que a hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar foi menos

eficiente comparada à hidrólise da casca de soja. Este resultado foi corroborado pela identificação e quantificação dos produtos de hidrólise por HPLC: a degradação do bagaço de cana gerou apenas celohexaose, manose, xilose e xilotetraose (por enzimas do extrato concentrado) e celohexaose e xilobiose (por enzimas da fração Cel-QFF) em quantidades muito baixas, conforme dados apresentados na figura 32.

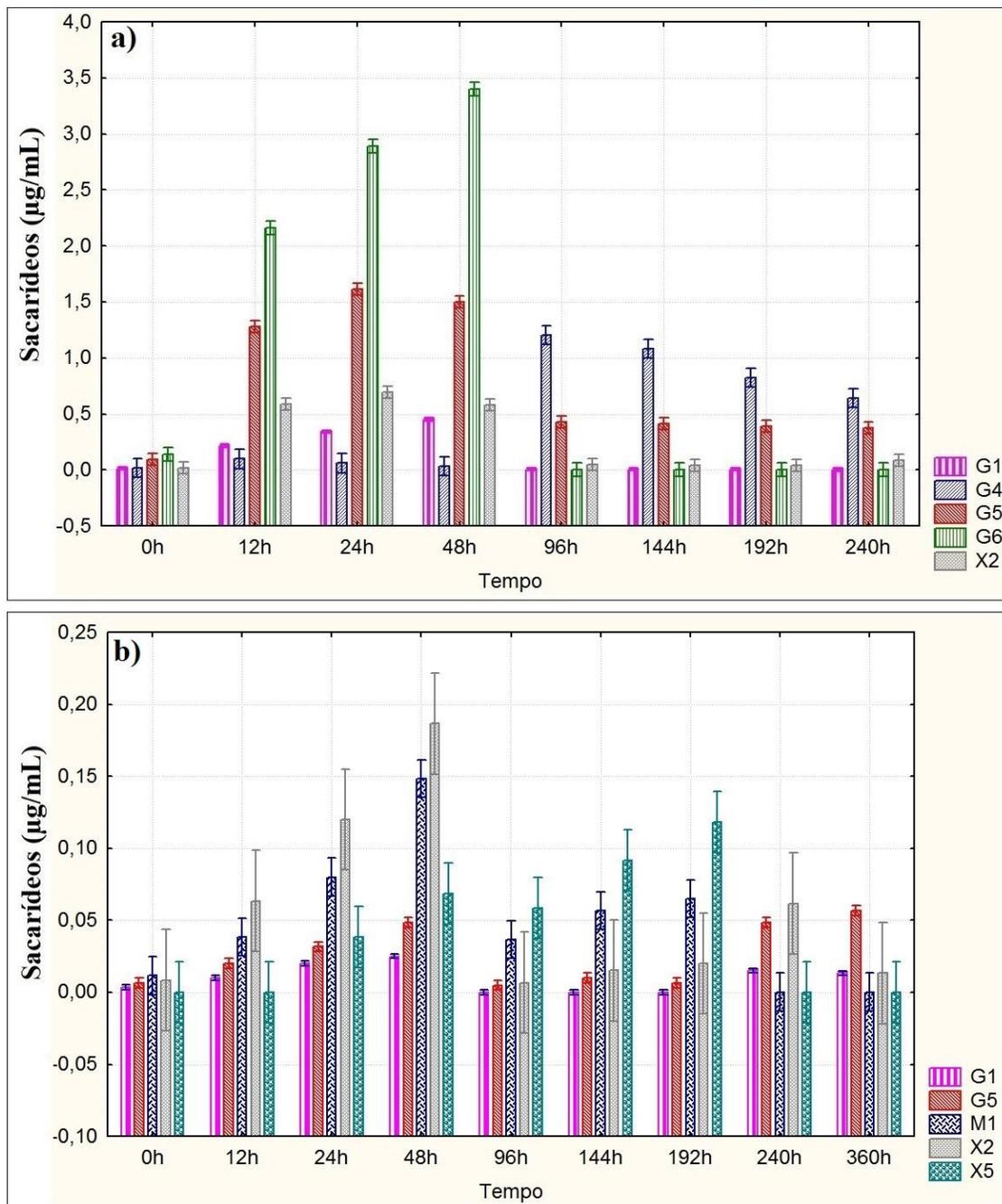


Figura 31. Identificação e quantificação dos sacarídeos liberados durante hidrólise de casca de soja 1 % em função do tempo por enzimas presentes a) no extrato bruto concentrado e b) na fração Cel-QFF.

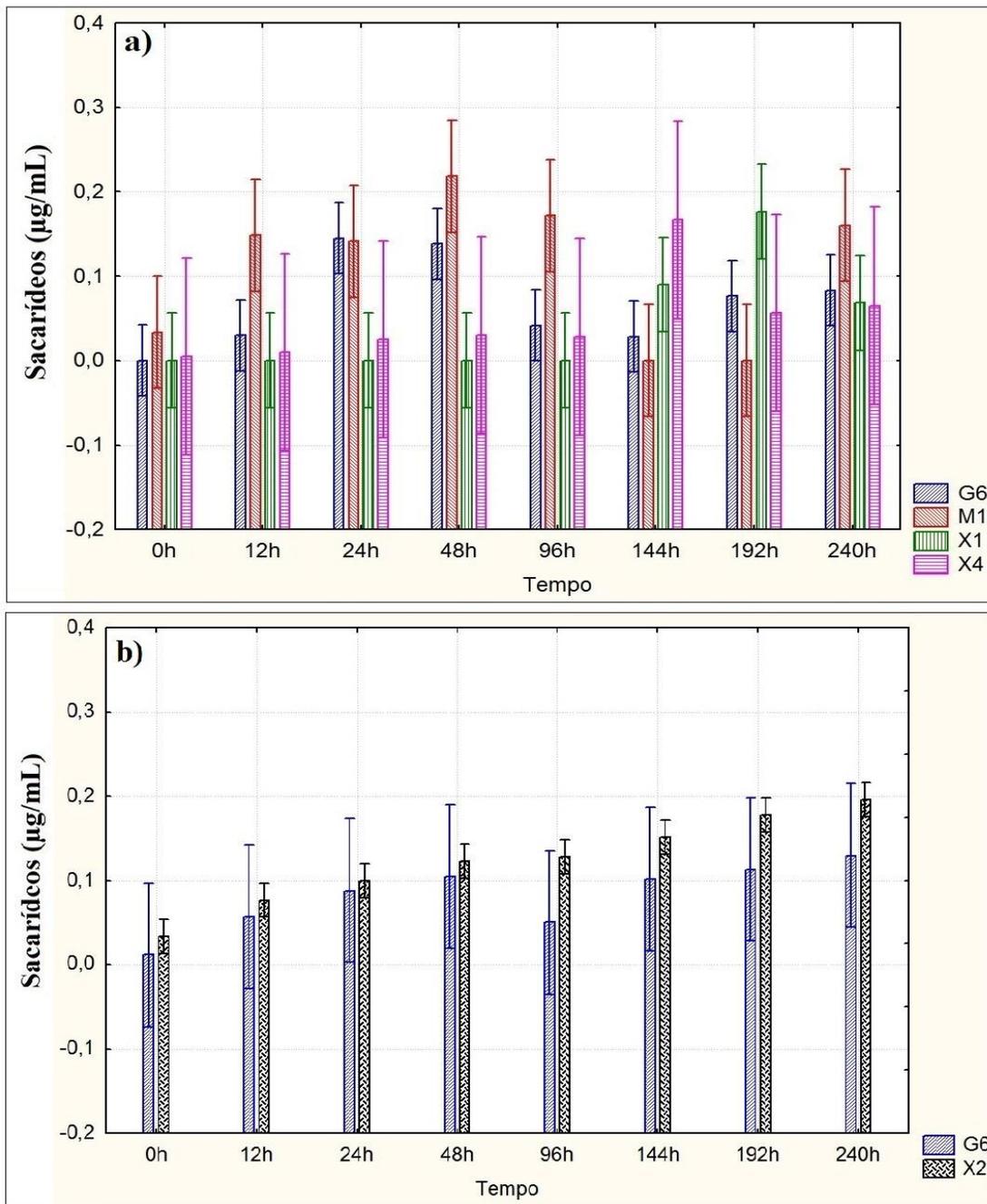


Figura 32. Identificação e quantificação dos sacarídeos liberados durante hidrólise de bagaço de cana de açúcar 1 % em função do tempo por enzimas presentes **a)** no extrato bruto concentrado e **b)** na fração Cel-QFF.

6. Conclusões

- O fungo *Clonostachys byssicola* foi capaz de crescer em meio líquido contendo casca de soja como única fonte de carbono, secretando enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas.
- A enzima CMCCase apresentou atividade em uma ampla faixa de temperatura e pH.
- CMCCase foi termoestável.
- Os compostos fenólicos avaliados não tiveram efeito inibitório e de desativação sobre atividade de CMCCase; ácidos ferúlico e tânico tiveram efeito ativador sobre CMCCase das frações semi purificadas.
- Os íons Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} tiveram efeito inibitório sobre atividade de CMCCase; o íon Co^{2+} ativou a atividade enzimática do extrato concentrado, frações Cel-QFF e Cel-DEAE.
- CMCCase liberou glicose, celopentaose e celohexaose a partir da hidrólise de CMC e papel de filtro, sugerindo que a enzima é uma endoglicanase.
- A hidrólise enzimática de casca de soja foi mais eficiente que a hidrólise de bagaço de cana de açúcar por enzimas presentes no extrato concentrado e fração Cel-QFF.

7. Perspectivas

- Dar continuidade ao processo de purificação e caracterização das CMCases;
- Determinar os parâmetros cinéticos da enzima purificada;
- Avaliar o efeito de reagentes modificadores de aminoácidos sobre a atividade de CMCCase;
- Purificar e caracterizar as outras holocelulases produzidas por *C. byssicola*;
- Avaliar o potencial biotecnológico das amostras enzimáticas no processamento têxtil.

8. Referências Bibliográficas

- Abramson, M.; Shoseyov, O.; Shani, Z. 2010. Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. *Plant Science* 178:61-72.
- Agoda-Tandjawa, G.; Durand, S.; Gaillard, C.; Garnier, C.; Doublier, J. L. 2012. Properties of cellulose/pectins composites: Implication for structural and mechanical properties of cell wall. *Carbohydrate Polymers* 90:1081-1091.
- Alvindia, D. G. e Natsuaki, K. T. 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection* 27:1200-1207.
- Alvindia, D. G. e Hirooka, Y. 2011. Identification of *Clonostachys* and *Trichoderma* spp. from banana fruit surfaces by cultural, morphological and molecular methods. *Mycology* 2(2):109-115.
- Andrić, P.; Meyer, A. S.; Jensen, P. A.; Dam-Johansen, K. 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances* 28:308-324.
- Anish, R.; Rahman, M. S.; Rao, M. 2007. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims. *Biotechnology and Bioengineering* 96:48-56.
- Arantes, V. e Saddler, J. N. 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* 3:4.
- Araújo, R.; Casal, M.; Cavaco-Paulo, A. 2008. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatalysis and Biotransformation* 26(5):332-349.
- Aro, N.; Pakula, T.; Penttilä, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29:719-739.

Badhan, A. K.; Chadha, B. S.; Kaur, J.; Saini, H. S.; Bhat, M. K. 2007. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresource Technology* 98:504-510.

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

Baminger, U.; Nidetzky, B.; Kulbe, K. D.; Haltrich, D. 1999. A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. *Journal of Microbiological Methods* 35:253-259.

Bayer, E. A.; Chanzy, H.; Lamed, R.; Shoham, Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology* 8:548-557.

Bayer, E. A.; Lamed, R.; Himmel, M. E. 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology* 18:237-245.

Belghith, H.; Ellouz-Chaabouni, S.; Gargouri, A. 2001. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. *Journal of Biotechnology* 89:257-262.

Bhardwaj, N. K.; Bajpai, P.; Bajpai, P. K. 1996. Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability. *Journal of Biotechnology* 51:21-26.

Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18:355-383.

Binod, P.; Janu, K. U.; Sindhu, R.; Pandey, A. 2011. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. In: Pandey, A.; Larroche, S.; Ricke, S. C.; Dussap, C.; Gnansounou, E. (Eds.). *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. Elsevier Inc., USA, pp. 229-250.

Bischoff, K. M.; Shi, L.; Kennelly, P. J. 1998. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* 260:1-17.

Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

Blum, D.; Cuenca, J. G.; Dyaico, M. Cellulase activity; used to make bioethanol, in food and textile treatment, in waste treatment; breaks down lignocellulose. Patente dos EUA 8426184, 23 de abril de 2013.

Boraston, A. B.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Davies, G. J. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* 382:769-781.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.

Buranov, A. U. e Mazza, G. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28:237-259.

Caffall, K. H. e Mohnen, D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344:1879-1900.

Campos, R. e Cavaco-Paulo, A. 2000. Indigo-cellulase interactions. *Textile Research Journal* 70(6):532-536.

Cao, G.; Ximenes, E.; Nichols, N. N.; Zhang, L.; Ladisch, M. 2013. Biological abatement of cellulase inhibitors. *Bioresource Technology* 146:604-610.

Carrard, G.; Koivula, A.; Söderlund, H.; Béguin, P. 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(19):10342-10347.

Cassales, A.; Souza-Cruz, P. B.; Rech, R.; Ayub, M. A. Z. 2011. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. *Biomass and Bioenergy* 35:4675-4683.

Castro, A. M.; Carvalho, M. L. A.; Leite, S. G. F.; Pereira, N. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37:151-158.

Cavaco-Paulo, A. 1998. Mechanism of cellulase action in textile processes. *Carbohydrate Polymers* 37:273-277.

CAZy. Carbohydrate-Active enZYmes. 2015. Disponível em: < <http://www.cazy.org>>. Acesso em 22/01/2015.

Chaabouni, S. E.; Mechichi, T.; Limam, F.; Marzouki, N. 2005. Purification and Characterization of Two Low Molecular Weight Endoglucanases Produced by *Penicillium occitanis* Mutant Pol 6. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 125:99-112.

Chatterton, S. e Punja, Z. K. 2009. Chitinase and β -1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology* 55(4):356-367.

Chávez, R.; Bull, P. Eyzaguirre, J. 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology* 123(4):413-33.

Chen, L.; Lai, Y.; Wu, S.; Lin, C.; Guo, J. 2006. Production by *Clonostachys compactiuscula* of a lovastatin esterase that converts lovastatin to monacolin J. *Enzyme and Microbial Technology* 39:1051-1059.

Chen, H.; Chen, Y.; Lu, M. J.; Chang, J.; Wang, H. C.; Ke, H.; Wang, T.; Ruan, S.; Wang, T.; Hung, K.; Cho, H.; Lin, W.; Shih, M.; Li, W. 2012. A highly efficient β -glucosidase from the buffalo rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5. *Biotechnology for Biofuels* 5:24.

Çinar, I. 2005. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. *Process Biochemistry* 40:945-949.

Clarkson, K. A.; Larenas, E.; Weiss, G. L. Detergent compositions containing substantially pure EG III cellulase. Patente dos EUA 5419778, 30 de maio de 1995.

Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_jan_eiro_2015.pdf>. Acesso em 22/01/2015.

Corredor, D., Sun, X., Salazar, J., Hohn, K., Wang, D., 2008. Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 2:43-50.

Costa, L. B.; Rangel, D. E. N.; Morandi, M. A. B.; Bettioli, W. 2012. Impact of UV-B radiation on *Clonostachys rosea* germination and growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:2497-2504.

Cota, L. V.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G.; Macedo, P. E. F. 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control* 50:222-230.

Crestini, C.; Melone, F.; Saladino, R. 2011. Novel multienzyme oxidative biocatalyst for lignin bioprocessing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19:5071-5078.

Csiszár, E.; Szakács, G., Rusznák, I. 1998. Combining traditional cotton scouring with cellulase enzymatic treatment. *Textile Research Journal* 68(3):163-167.

Csiszár, E.; Urbánszki, K.; Szakács, G. 2001. Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11:1065-1072.

Dave, B. R.; Sudhir, A. P.; Subramanian, R. B. 2014. Purification and properties of an endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus*. *Biotechnology Reports* 55:1-6.

Deguchi, A.; Tsujii, K.; Horikoshi, K. 2006. Cooking cellulose in hot and compressed water. *Chemical Communications* 3293-3295.

Dienes, D.; Egyházi, A; Réczey, K. 2004. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Industrial Crops and Products* 20:11-21.

Ding, S.; Ge, W.; Buswell, J. A. 2002. Secretion, purification and characterisation of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:621-626.

Doherty, W. O. S.; Mousavioun, P.; Fellows, C. M. 2011. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products* 33:259-276.

Du, F.; Wolger, E.; Wallace, L.; Liu, A.; Kaper, T.; Kelemen, B. 2010. Determination of Product Inhibition of CBH1, CBH2, and EG1 Using a Novel Cellulase Activity Assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161:313-317.

Duarte, G. C.; Moreira, L. R. S.; Jaramillo, P. M. D.; Filho, E. X. F. 2012 Biomass-Derived Inhibitors of Holocellulases. *Bioenergy Research* 5(3)768-777.

Ekwe, E.; Morgenstern, I.; Tsang, A.; Storms, R.; Powlowski, J. 2013. Non-Hydrolytic Cellulose Active Proteins: Research Progress and Potential Application in Biorefineries. *Industrial Biotechnology* 9:123-131.

Elvan, H.; Ertunga, N. S.; Yildirim, M.; Colak, A. 2010. Partial purification and characterisation of endoglucanase from an edible mushroom, *Lepista flaccida*. *Food Chemistry* 123:291-295.

Embrapa agroenergia. 2015. Disponível em:
<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48750/1/biorrefinaria-modificado-web.pdf>>. Acesso em 22/01/2015.

Evans, H. C.; Holmes, K. A.; Thomas, S. E. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress* 2(2):149-160.

Filho, E. X. F. 1992. Investigations on the xylan-degrading systems of *Penicillium capsulatum* and *Myrothecium verrucaria*. *University College Galway*. Tese de Doutorado.

Filho, E. X. F.; Puls, H.; Coughlan, M. P. 1993. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *Journal of Industrial Microbiology* 11:171-180.

Filho, E. X. F. 1998. Hemicellulases and biotechnology. In: Pandalai, S. G. (Ed). Recent research developments in microbiology. Research Signpost, Trivandrum, pp. 165-176.

Fukasawa, T; Nojiri, C.; Matsushashi, N.; Nishizawa, K.; Okakura, K.; Yamanobe, T. Derived from filamentous fungi of the genus *Acremonium*; processing plants or plant-derived substances. Patente dos EUA 7256031, 14 de agosto de 2007.

Gan, Z.; Yang, J.; Tao, N.; Yu, Z.; Zhang, K. 2007. Cloning and Expression Analysis of a Chitinase Gene *Crchi1* from the Mycoparasitic Fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*). *The Journal of Microbiology* 45(5):422-430.

García, R. A. M.; Hoopen, G. M.; Kas, D. C. J.; Garita, V. A. S.; Krauss, U. 2003. Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biological Control* 27:210-227.

George, S. P.; Ahmad, A.; Rao, M. B. 2001. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresource Technology* 77:171-175.

Georgelis, N.; Nikolaidis, N.; Cosgrove, D. J. 2014. Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Carbohydrate Polymers* 100:17-23.

Ghose, T. K. 1987. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry* 59:257-268.

Gilbert, H. J. Knox, J. P.; Boraston, A. B. 2013. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Current Opinion in Structural Biology* 23:669-677.

Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 101:4775-4800.

Gnanasambandan, R. e Proctor, A. 1999. Preparation of soy hull pectin. *Food Chemistry* 65:461-7.

Gomathi, D.; Muthulakshmi, C.; Kumar, D. G.; Ravikumar, G.; Kalaiselvi, M.; Uma, C. 2012. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulase. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S67-S73.

Gomes, H. A. R. 2014. Perfil e caracterização de holocelulases secretadas por *Penicillium fellutanum* com ênfase em mananase. Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado.

Gourlay, K.; Arantes, V.; Saddler, J. N. 2012. Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels* 5:51.

Griffin, H.; Dintzis, F. R.; Krull, L.; Baker, F. L. 1984. A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering* 26(3):296-300.

Guimarães, B. G.; Souchon, H.; Lytle, B. L.; Wu, J. H. D.; Alzari, P. M. 2002. The Crystal Structure and Catalytic Mechanism of Cellobiohydrolase CelS, the Major Enzymatic Component of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome. *Journal of Molecular Biology* 320:587-596.

Gunata, Y. Z.; Vallier, M.; Baumes, R.; Bayonove, C. β -glucosidase from filamentous fungi, and uses thereof. Patente dos EUA 6087131, 11 de julho de 2000.

Heikinheimo, L., Buchert, J., Miettinen-Oinonen, A., & Suominen, P. 2000. Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Textile Research Journal* 70: 969-973.

Henriksson, G.; Johansson, G.; Pettersson, G. 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology* 78:93-113.

Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30:454-466.

Holtzapple, M.; Cognata, M.; Shu, Y.; Hendrickson, C. 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* Cellulase by Sugars and Solvents. *Biotechnology and Bioengineering* 36:275-287.

Hoopen, G. M.; Rees, R.; Aisa, P.; Stirrup, T.; Krauss, U. 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research* 107(5):587-596.

Hoopen, G. M.; Geroje, A.; Martinez, A.; Stirrup, T.; Krauss, U. 2010. Compatibility between *Clonostachys* isolates with a view to mixed inocula for biocontrol. *Mycologia* 102(5):1204-1215.

Horn, S. J.; Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Eijsink, V. G. H. 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels* 5:45.

Infante, J. C. 2014. Produção e caracterização de mananase de *Aspergillus foetidus* cultivado em casca do grão da soja. Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado.

Inglis, G. D. e Kawchuk, L. M. 2002. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 48(1):60-70.

James, A. E.; Fare, G.; Sagar, B. F.; Lucas, F.; Mitchell, I. D. β -1,4 / β -1,3 Glucanase. Patente dos EUA 3880742, 29 de abril de 1975.

Jang, H. e Chen, K. 2003. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19:263-268.

Janusz, G.; Kucharzyk, K. H.; Pawlik, A.; Staszczak, M.; Paszczynski, A. J. 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* 52:1-12.

Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40:2931-2944.

Jönsson, L. J.; Alriksson, B.; Nilvebrant, N. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6:16.

Jørgensen, H.; Eriksson, T.; Börjesson, J.; Tjerneld, F.; Olsson, L. 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme and Microbial Technology* 32:851-861.

Juhász, T.; Szengyel, Z.; Réczey, K.; Siika-Aho, M.; Viikari, L. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* 40:3519-3525.

Jung, Y. R.; Park, J. M.; Heo, S.; Hong, W.; Lee, S.; Oh, B.; Park, S.; Seo, J.; Kim, C. H. 2015. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. *Renewable Energy* 76:66-71.

Kamaya, Y. 1996. Role of Endoglucanase in Enzymatic Modification of Bleached Kraft Pulp. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82(6):549-553.

Kang, K.; Wang, S.; Lai, G.; Liu, G.; Xing, M. 2013. Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. *BMC Biotechnology* 13(42):1-9.

Karmakar, M. e Ray, R. R. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology* 6(1):41-53.

Karnchanatat, A.; Petsom, A.; Sangvanich, P.; Piapukiew, J.; Whalley, A. J. S.; Reynolds, C. D.; Gadd, G. M.; Sihanonth, P. 2008. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *Enzyme and Microbial Technology* 42:404-413.

Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* 77:215-227.

Kim, B.; Lee, B.; Lee, Y.; Jin, I.; Chung, C.; Lee, J. 2009a. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology* 44:411-416.

Kim, E. S.; Lee, H. J.; Bang, W.; Choi, I.; Kim, K. H. 2009b. Functional Characterization of a Bacterial Expansin From *Bacillus subtilis* for Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 102(5):1-12.

Kirk, T. K. e Jeffries, T. 1996. Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. *ACS Symposium Series* 655:2-14.

Kont, R.; Kurašin, M.; Teugjas, H.; Väljamäe, P. 2013. Strong cellulase inhibitors from the hydrothermal pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels* 6:1-14.

Kosawang, C.; Karlsson, M.; Jensen, D. F.; Dilokpimol, A.; Collinge, D. B. 2014. Transcriptomic profiling to identify genes involved in *Fusarium mycotoxin* Deoxynivalenol and Zearalenone tolerance in the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea*. *BMC Genomics* 15:55.

Kottwitz, B. e Schambil, F. Cellulase and cellulose containing detergent. Patente dos EUA 20050020472, 27 de janeiro de 2005.

Krauss, U.; Hoopen, G. M.; Hidalgo, E.; Martínez, A.; Stirrup, T.; Arroyo, C.; García, J.; Palacios, M. 2006. The effect of cane molasses amendment on biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora* spp.) of cocoa (*Theobroma cacao*) in Panama. *Biological Control* 39:232-239.

Krauss, U.; Hoopen, M.; Rees, R.; Stirrup, T.; Argyle, T.; George, A.; Arroyo, C.; Corrales, E.; Casanoves, F. 2013. Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biological Control* 67:317-327.

Krogh, K. B. R. M.; Kastberg, H.; Jørgensen, C. I.; Berlin, A.; Harris, P. V.; Olsson, L. 2009. Cloning of a GH5 endoglucanase from genus *Penicillium* and its binding to different lignins. *Enzyme and Microbial Technology* 44:359-367.

Kuhad, R. C.; Gupta, R.; Singh, A. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* 1-10.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Leatherbarrow, R. J. 1999. Enzfitter Manual, a Non-Linear Curve Fitting Program for Windows. Biosoft, London.

Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* 56: 1-24.

Lee, D.; Owens, V. N.; Boe, A.; Jeranyama, P. 2007. Composition of herbaceous biomass feedstocks. South Dakota State University Publication, SGINC1-07, Brookings, SD.

Lee, Y.; Kim, B.; Lee, B.; Jo, K.; Lee, N.; Chung, C.; Lee, Y.; Lee, J. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology* 99:378-386.

Lee, H. J.; Lee, S.; Ko, H.; Kim, K. H.; Choin I. 2010a. An Expansin-Like Protein from *Hahella chejuensis* Binds Cellulose and Enhances Cellulase Activity. *Molecules and Cells* 29:379-385.

Lee, K.; Jeya, M.; Joo, A.; Singh, R.; Kim, I.; Lee, J. 2010b. Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology* 46:206-211.

Lerouxel, O.; Cavalier, D. M.; Liepman, H. A.; Keegstra, K. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Current Opinion in Plant Biology* 9:621-630.

Li, Y.; Ding, M.; Wang, J.; Xu, G.; Zhao, F. 2006. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp.AC-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:430-436.

Li, Y.; Qi, B.; Wan, Y. 2014. Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass. *Bioresource Technology* 167:324-330.

Liamayem, A. e Ricke, S. C. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38:449-467.

Lima, A. L. G.; Nascimento, R. P.; Bon, E. P. S.; Coelho, R. R. R. 2005. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology* 37:272-277.

Lima, A. L. G.; Vinha, F. N. M.; Souza, D. T.; Bispo, A. S. R.; Bon, E. P. S.; Coelho, R. R. R.; Nascimento, R. P. 2009. *Aspergillus fumigatus* Thermophilic and Acidophilic Endoglucanases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 155:321-329.

Liu, D.; Zhang, R.; Yang, X.; Xu, Y.; Tang, Z.; Tian, W.; Shen, Q. 2011. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein Expression and Purification* 79:176-186.

Liu, D.; Zhang, R.; Yang, X.; Zhang, Z.; Song, S.; Miao, Y.; Shen, Q. 2012. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories* 11:25.

Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66:506-577.

Ma, R.; Wang, C.; Liu, Y.; Sivakumar, T. R.; Ren, Z.; Fang, Y.; Jia, J.; Gui, Z. 2014. Identification and characterization of a novel endoglucanase (CMCase) isolated from the larval gut of *Bombyx mori*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17:67-71.

Marjamaa, K.; Toth, K.; Bromann, P. A.; Szakacs, G. 2013. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. *Enzyme and Microbial Technology* 52:358-369.

Martin, S. A. e Akin, D. E. 1988. Effect of Phenolic Monomers on the Growth and β -Glucosidase Activity of *Bacteroides ruminicola* and on the Carboxymethylcellulase, β -Glucosidase, and Xylanase Activities of *Bacteroides succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(12):3019-3022.

McCann, M. C. e Carpita, N. C. 2008. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11:314-320.

Medve, J.; Karlsson, J.; Lee, D.; Tjerneld, F. 1988. Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose by Cellobiohydrolase I and Endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, Sugar Production Pattern, and Synergism of the Enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* 59(5):621-634.

Menon, V. e Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* 38:522-550.

Mielenz, J. R.; Bardsley, J. S.; Wyman, C. E. 2009. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresource Technology* 100:3532-3539.

Miettinen-Oinonen, A. 2004. *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. *Espoo VTT Publications* 500:1-96.

Miettinen-Oinonen, A.; Londesborough, J.; Joutsjoki, V.; Lantto, R.; Vehmaanperä, J.; Biotec, P. L. 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology* 34:332-341.

Miettinen-Oinonen, A.; Paloheimo, M.; Lantto, R.; Suominen, P. 2005. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. *Journal of Biotechnology* 116:305-317.

Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry* 31:426-428.

Miron, J.; Yosef, E.; Ben-Ghedalia, D. 2001. Composition and in Vitro Digestibility of Monosaccharide Constituents of Selected Byproduct Feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2322-2326.

Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11:266-277.

- Molina-Sabio, M. e Rodríguez-Reinoso, F. 2004. Role of chemical activation in the development of carbon porosity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 241:15-25.
- Morandi, M. A. B., Maffia, L. A., Sutton, J. C. 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29(2):103-113.
- Morandi, M. A. B.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G.; Alfenas, A. C.; Barbosa, J. G. 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26:311-317.
- Moreira, G. M. 2012. Caracterização de espécies de *Clonostachys* e avaliação do parasitismo a *Botrytis cinera*. Universidade Federal de Lavras. Dissertação de Mestrado.
- Moreira, L. R. S. 2013. Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos. Universidade de Brasília. Tese de Doutorado.
- Moreira, L. R. S. e Filho, E. X. F. 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79:165-178.
- Moreira, L. R. S.; Sciuto, D. L.; Filho, E. X. F. 2015. An overview of cellulose-degrading enzymes and their applications in textile industry. In: Gupta, V. (Ed). *Microbial cellulase system: properties and applications*. Elsevier, The Netherlands (no prelo 2015).
- Mouekouba, L. D. O.; Zhang, L.; Guan, X.; Chen, X.; Chen, H.; Zhang, J.; Zhang, J.; Li, J.; Yang, Y.; Wang, A. 2014. Analysis of *Clonostachys rosea*-Induced Resistance to Tomato Gray Mold Disease in Tomato Leaves. *Plos One* 9(7)1-15.
- Murphy, L.; Bohlin, C.; Baumann, M. J.; Olsen, S. N.; Sørensen, T. H.; Anderson, L.; Borch, K.; Westh, P. 2013. Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 52:163-169.

Naika, G. S.; Kaul, P.; Prakash, V. 2007. Purification and Characterization of a New Endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7566-7572.

Narra, M.; Dixit, G.; Divecha, J.; Kumar, K.; Madamwar, D.; Shah, A. R. 2014. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation* 88:150-161.

Nobre, S. A. M.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G.; Cota, L. V.; Dias, A. P. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34:132-143.

Oksanen, T.; Pere, J.; Paavilainen, L.; Buchert, J.; Viikari, L. 2000. Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases. *Journal of Biotechnology* 78:39-48.

Palin, R. e Geitmann, A. 2012. The role of pectin in plant morphogenesis. *BioSystems* 109:397-402.

Pandey, A. 2009. Handbook of plant-based biofuels. Florida: CRC press.

Parry, N. J.; Beever, D. E.; Owen, E.; Nerinckx, W.; Claeysens, M.; Beeumen, J. V.; Bhat, M. K. 2002. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 404:243-253.

Pauly, M. e Keegstra, K. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal* 54:559-568.

Peng, F.; Peng, P; Xu, F.; Sun, R. 2012. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances* 30:879-903.

Pereira, J. H.; Chen, Z.; McAndrew, R. P.; Sapra, R.; Chhabra, S. R.; Sale, K. L.; Simmons, B. A.; Adams, P. D. 2010. Biochemical characterization and crystal structure of endoglucanase

Cel5A from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*. *Journal of Structural Biology* 172:372-379.

Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T.; Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview. *International Microbiology* 5:53-63.

Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:577-591.

Pothiraj, C.; Balaji, P.; Eyini, M. 2006. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. *African Journal of Biotechnology* 5(20):1882-1885.

Qin, L.; Kudla, U.; Roze, E. H. A.; Goverse, A.; Popeijus, H.; Nieuwland, J.; Overmars, H.; Jones, J. T.; Schots, A.; Smant, G.; Bakker, J.; Helder, J. 2004. Plant degradation: A nematode expansin acting on plants. *Nature* 427:30.

Qin, Y.; Tao, H.; Liu, Y.; Wang, Y.; Zhang, J.; Tang, A. 2013. A novel non-hydrolytic protein from *Pseudomonas oryzae* enhances the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Biotechnology* 168:24-31.

Quinlan, R. J.; Sweeney, M. D.; Leggio, L. L.; Otten, H.; Poulsen, J. N.; Johansen, K. S.; Krogh, K. B. R. M.; Jørgensen, C. I.; Tovborg, M.; Anthonsen, A.; Tryfona, T.; Walter, C. P.; Dupree, P.; Xu, F.; Davies, G. J.; Walton, P. H. 2011. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:15079-15084.

Rähse, W. 2014. Production of Tailor-Made Enzymes for Detergents. *ChemBioEng Reviews* 1:27-39.

Rawat, R. e Tewari, L. 2012. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles* 16:637-644.

Reese, E. T. 1956. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Journal of Applied Microbiology* 4:39-45.

Reiter, W. 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 5:536-542.

Resch, M. G.; Donohoe, B. S.; Baker, J. O.; Decker, S. R.; Bayer, E. A.; Beckham, G. T.; Himmel, M. E. 2013. Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction. *Energy & Environmental Science* 6:1858-1867.

Roberti, R.; Zakrisson, E.; Flamigni, F.; De Vero, L.; Cesari, A. 2002. Antagonistic fungi producing hydrolytic enzymes, active in degrading the cell wall of some foot rot pathogens (*Fusarium* spp.) of wheat. *Journal of Plant Disease and Protection* 109:101-108.

Roberti, R.; Veronesi, A. R.; Cesari, A.; Cascone, A.; Berardino, I. D.; Bertini, L.; Caruso, C. 2008. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175:339-347.

Rodríguez, M. A.; Cabrera, G.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Godeas, A. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110:1177-1186.

Saha, B. C. 2003. Hemicellulose Bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30:279-291.

Saha, B. C. 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry* 39:1871-1876.

Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; Nyysönen, E.; Bhatia, A.; Ward, M.; Penttilä, M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* 269:4202-4211.

Saqib, A. A. N.; Hassan, M.; Khan, N. F.; Baig, S. 2010. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry* 45:641-646.

Scheller, H. V. e Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*. 61:263-89.

Schimmel, T. G.; Borneman, W. S.; Conder, M. 1997. Purification and Characterization of a Lovastatin Esterase from *Clonostachys compactiuscula*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4):1307-1311.

Schirmer-Michel, A. C.; Flôres, S. H.; Hertz, P. F.; Matos, G. S. M.; Ayub, M. A. Z. 2008. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. *Bioresource Technology* 99:2898-2904.

Schroers, H.; Samuels, G. J.; Seifert, K. A.; Gams, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91(2):365-385.

Schroers, H. 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology* 46.

Schwarz, W. H.; 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:634-349.

Shallom, D. e Shoham, Y. 2003. Microbial Hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6:219-228.

Siqueira, F. G. 2010. Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases. Universidade de Brasília. Tese de Doutorado.

Siqueira, F. G. e Filho, E. X. F. 2010. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. *Bentham Science Publishers* 7:54-60.

Steenbakkens, P. J. M.; Li, X.; Ximenes, E. A.; Arts, J. G.; Chen, H.; Ljungdahl, L. G.; Camp, H. J. M. 2001. Noncatalytic Docking Domains of Cellulosomes of Anaerobic Fungi. *Journal of Bacteriology* 183(18):5325-5333.

Steenbakkers, P. J. M.; Harhangi, H. R.; Bosscher, M. W.; Hooft, M. M. C.; Keltjens, J. T.; Drift, C.; Vogels, G. D.; Camp, H. J. M. 2003. β -Glucosidase in cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. Strain E2 is a family 3 glycoside hidrolase. *Biochemical Journal* 370:963-970.

Sukumaran, R. K.; Singhania, R. R.; Pandey, A. 2005. Microbial cellulases – Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research* 64:832-844.

Sutton, J. C; Li, D.; Peng, G.; Yu, H.; Zhang, P.; Valdebenito-Sanhueza, R. M. 1997. *Gliocladium roseum* - A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *The American Phytopathological Society* 81(4):316-328.

Tejirian, A. e Xu, F. 2010. Inhibition of Cellulase-Catalyzed Lignocellulosic Hydrolysis by Iron and Oxidative Metal Ions and Complexes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(23):7673-7682.

Tejirian, A. e Xu, F. 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology* 48:239-247.

Toledo, A. V.; Virla, E.; Humber, R. A.; Paradell, S. L.; Lastra, C. C. L. 2006. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 92:7-10.

Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry* 6:24-25.

USDA. United States Department of Agriculture. 2015. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops.aspx>>. Acesso em 22/01/2015.

van den Brink, J. e de Vries, R. P. 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91:1477-1492.

Van Dyk, J. S. e Pletschke, B. I. 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* 30:1458-1480.

Vohra, R. M.; Shirkot, C. K.; Dhawan, S.; Gupta, K. G. 1980. Effect of Lignin and Some of its Components on the Production and Activity of Cellulase(s) by *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering* 22:1497-1500.

Watanabe, H. e Tokuda, G. 2001. Animal cellulases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:1167-1178.

Wilson, D. B. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology* 14:259-263.

Xiang, L.; Li, A.; Tian, C.; Zhou, Y.; Zhang, G.; Ma, Y. 2014. Identification and characterization of a new acid-stable endoglucanase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification* 102:20-26.

Ximenes, F. D. A.; Silveira, F. Q. D. P.; Filho, E. X. F. 1996. Production of β -Xylosidase Activity by *Trichoderma harzianum* Strains. *Current Microbiology* 33:71-77.

Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. 2010. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 46:170-176.

Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 48(1):54-60.

Yadav, S.; Yadav, P. K.; Yadav, D.; Yadav, K. D. S. 2009. Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry* 44:1-10.

Zhang, Y. P. e Lynd, L. R. 2004. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88(7):797-824.

Zhang, Y. P.; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24:452-481.

Zhang, L.; Yang, J.; Niu, Q.; Zhao, X.; Ye, F.; Liang, L.; Zhang, K. 2008. Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79:983-990.

Zheng, C.; Kim, C.; Bae, K. S.; Kim, Y.; Kim, W. 2006. Bionectins A-C, Epidithiodioxopiperazines with Anti-MRSA Activity, from *Bionectra byssicola* F120. *Journal of Natural Products* 69:1816-1819.

Zheng, C.; Kim, Y.; Kim, W. 2007a. Glioperazine B, as a new antimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*, and Glioperazine C: two new dioxopiperazines from *Bionectra byssicola*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(8):1979-1983.

Zheng, C.; Park, S.; Koshino, H.; Kim, Y.; Kim, W. 2007b. Verticillin G, a new antibacterial compound from *Bionectra byssicola*. *The Journal of Antibiotics* 60(1):61-64.

Zhou, Q.; Lv, X.; Zhang, X.; Meng, X.; Chen, G.; Liu, W. 2011. Evaluation of swollenin from *Trichoderma pseudokoningii* as a potential synergistic factor in the enzymatic hydrolysis of cellulose with low cellulase loadings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:1905-1910.

Zin, H. W.; Park, K.; Choi, T. J. 2014. Purification and characterization of a carboxymethyl cellulase from *Artemia salina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443:194-199.

Zou, C.; Tu, H.; Liu, X.; Tao, N.; Zhang, K. 2010. PacC in the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* controls virulence to nematodes. *Environmental Microbiology* 12(7):1868-1877.

Anexo 1 – Protocolo para Identificação Molecular de *Clonostachys byssicola*

O DNA genômico foi extraído do isolado fúngico *C. byssicola* utilizando o método fenol-clorofórmio (Raeder e Broda, 1985). A região espaçadora intergênica (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) foi amplificada utilizando o *forward primer* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ou ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e o *reverse primer* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). O gene β -tubulina foi amplificado utilizando os *primers* Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass e Donaldson, 1995). Cada reação de PCR continha 10 ng de DNA molde, 0,4 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1,0 U de Taq DNA polimerase e tampão Taq polimerase 1xIB (*Phoneutria*, Belo Horizonte, MG, Brasil). O ciclo de temperatura foi realizado com o seguinte programa: desnaturação do DNA a 95 °C durante 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento do *primer* a 50 °C durante 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, além de um período de alongamento final a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, EUA) e o sequenciamento da região rDNA ITS foi realizado utilizando o kit *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos foram corridos em sequenciador de DNA ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A sequência obtida foi então comparada com as sequências no banco de dados de nucleotídeos (NCBI) utilizando o algoritmo BLAST.

Glass, N. L. e Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323-1330.

Raeder, U. e Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiolog* 1:17-20.

White, T. J.; Bruns, T. D.; Lee, S. B.; Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: Inns, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (Eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, California; Academic Press pp. 315-322.