



**MARIA CAROLINA ANDRADE**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS, PERFIL ENZIMÁTICO E  
UTILIZAÇÃO EM RESÍDUOS DO  
PROCESSAMENTO DE CAFÉ.**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**MARIA CAROLINA ANDRADE**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS, PERFIL  
ENZIMÁTICO E UTILIZAÇÃO EM RESÍDUOS DO  
PROCESSAMENTO DE CAFÉ.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza

Coorientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientador

Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Andrade, Maria Carolina.

Bioprospecção de fungos filamentosos, perfil enzimático e  
utilização em resíduos do processamento de café / Maria Carolina  
Andrade. – Lavras: UFLA, 2015.

131p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)-Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientadora: Sára Maria Chalfoun de Souza.

Bibliografia.

1. Bioprospecção. 2. Casca de café. 3. Fungos do solo. 4.  
Fermentação em estado sólido. I. Universidade Federal de Lavras.  
II. Título.

**MARIA CAROLINA ANDRADE**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS, PERFIL  
ENZIMÁTICO E UTILIZAÇÃO EM RESÍDUOS DO  
PROCESSAMENTO DE CAFÉ.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 7 de agosto de 2015.

Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza	UFLA/EPAMIG
Dra. Maria Cristina Mendes Costa	UNILAVRAS
Dra. Deila Magna dos Santos Botelho	UFLA

Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza  
Orientadora

Dr. Luís Roberto Batista  
Coorientador

Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2015**

*À meus amados pais, Sônia e Luciano*

*À minha irmã, Rafaella.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado o dom da vida e forças para realizar um sonho a muito desejado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

À minha orientadora, Sára Maria Chaulfon de Souza, pela orientação, amizade e confiança em todos os momentos.

Ao meu coorientador, Luís Roberto Batista, pela sabedoria transmitida e pelo grande auxílio durante este trabalho, sem você este trabalho seria inviável.

Ao professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, por me receber tão bem em seu laboratório na Universidade de Brasília, além de me fazer sentir em casa e por todos os conhecimentos repassados durante todo o período de minha permanência lá. O senhor foi muito mais que um professor, foi um amigo e um excelente coorientador.

À professora Rosane Freitas Schwan, por todo o apoio técnico no percorrer desta caminhada.

Ao professor Ludwig Pfenning e sua equipe do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, por toda a contribuição e orientação.

À Rita de Cássia Zanuncio Araújo, pesquisadora do INCAPER/ES, pela generosa disponibilização das cascas de café robusta.

Aos técnicos, Edinho, Vicentina, Marísia, Margarete, Ivani, e todos os funcionários que estiveram envolvidos no nosso dia a dia de trabalho.

À minha estagiária, Gabriela Swerts, pela grande ajuda, amizade e descontração.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Às amigas/irmãs Juliana Cunha Amorim e Camila Branda dos Reis por todo apoio, amizade, “puxões de orelha” e por fazerem minha vida em Lavras mais feliz. Levo vocês comigo para sempre!!

À família Enzimologia e todos os seus integrantes Hélder, Antonielle, Caio, Fran, Pedro Fontes, Brenda, Léo, Alonso, Pedro Hamman, Débora, Raíssa, Andreza, Diandra, Leonora, Jéssica, Guilherme, Deborazinha, Babi e Samuel. Obrigada por tão calorosa acolhida em

Brasília, pelos momentos de aprendizado e descontração que me ajudaram a amenizar a saudade de casa e por tudo o mais. Vocês foram essenciais!!!

Às amigas da vida toda Thays, Anny e Dai pela amizade sincera e por compreenderem minhas constantes ausências.

Ao Samuel, pela ajuda com as cascas de café.

Ao Sérgio e à Érica, pela ajuda com a estatística.

Ao amigo Fernando Puertas, pela ajuda na coleta do solo, estatística e bons momentos.

À minha base, meus pais Sônia e Luciano, pelo amor incondicional, e sempre me estimulando a buscar novos caminhos para realização dos meus sonhos.

À minha irmã, Rafaella, por ser, além de irmã uma companheira de vida.

À toda minha família, tios, primos e avós por ser minha fonte de energia constante.

A todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, da realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!!!!**

*“Pensar é o trabalho mais difícil que existe.  
Talvez por isso, tão poucos se dediquem a ele.”*

Henry Ford



## RESUMO

Os solos são ambientes complexos, hospedeiros de uma enorme biodiversidade. Sua microbiota compreende vários grupos taxonômicos, dentre eles: bactérias, cianobactérias, fungos micorrízicos, micoparasitas, patógenos de plantas e insetos, cuja principal função é a degradação da matéria orgânica. A bioprospecção é uma ferramenta útil para descoberta de novos microrganismos aplicáveis no mercado industrial biotecnológico. O objetivo do presente estudo é fazer uma bioprospecção em solo, para obtenção de uma ou mais cepas fúngicas capazes de produzir celulase e xilanase e caracterizar essas enzimas, bioquimicamente. Os fungos analisados foram isolados da camada superficial de matéria orgânica do solo, retirada de fragmentos florestais da Represa do Funil, no município de Lavras – MG. A técnica utilizada para o isolamento dos fungos foi a lavagem do solo e cultivo de partículas. No total, 55 fungos foram isolados e todos passaram por “screening” de atividade enzimática para celulasas e xilanases, através do teste de índice enzimático revelado por solução de Lugol. Os isolados foram identificados por MALDI-TOF e morfologia do micélio vegetativo, sendo os gêneros *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Clonostachys* e *Fusarium* encontrados entre eles. No presente trabalho buscou-se a produção dessas enzimas, a partir da casca de café arábica e robusta. Os fungos pré-selecionados por bioprospecção *Clonostachys rosea* e *Fusarium solani* juntamente com *Aspergillus japonicus* e *Penicillium chrysogenum* foram avaliados por fermentação submersa para verificação de qual o melhor produtor de celulasas e xilanases. Entre eles, *C. rosea* e *A. japonicus* foram escolhidos para fermentação sólida nas cascas de café arábica e robusta. Após análise enzimática desses isolados, optou-se por caracterizar o extrato bruto de *A. japonicus* cultivado em casca de café arábica. Grande produção de CMCases, xilanases e pectinases foram detectadas. O extrato bruto foi concentrado por ultrafiltração por membrana de retenção, 30 KDa, e sujeito à cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G 50). Duas frações principais foram encontradas e avaliadas quanto à termoestabilidade, temperatura e pH ótimos. A temperatura ótima foi descrita como 50°C e pH ótimo, em faixa ácida de 3,5 a 6,0. O pico 1 da cromatografia de exclusão molecular foi submetido à cromatografia de troca iônica Q Sepharose para purificação de CMCCase. Uma endo-1,4-β-glicosidase de aproximadamente 38 KDa foi semipurificada.

**Palavras-chave:** Bioprospecção, Fungos do solo, Fermentação em estado sólido, Casca de café.

## ABSTRACT

Soils are complex environments hosts a huge biodiversity. The microbiota comprises several taxonomic groups, including bacteria, cyanobacteria, mycorrhizal fungi, micoparasites, plant pathogens and insects, with major degradation function of organic matter. Bioprospecting is a useful tool for discovering new microorganisms applied in biotechnological industrial. The objective this study is make a bioprospecting in soil for obtention one or more fungal strains producers cellulase and xylanase, this way biochemistry feature this enzymes. The fungi were isolated analyzed the surface layer of soil organic matter taken from forest fragments of the Represa do Funil, in Lavras - MG. The technique used for the isolation of fungi was the washing and cultivation particulate soil. In total, 55 fungi were isolated and all have undergone screening of enzymatic activity to cellulase and xylanase through the index test revealed by Lugol solution. The isolates were identified by MALDI-TOF and morphology of the vegetative mycelium, and the *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Clonostachys* and *Fusarium* found among them. In the present study aimed to production of these enzymes from arabica and robusta coffee husks. The pre-selected fungi by bioprospecting *Clonostachys rosea*, *Fusarium solani*, *Aspergillus japonicus* and *Penicillium chrysogenum* were evaluated by submerged fermentation to check what the best producer of cellulases and xylanases. Between them. *C. rosea* and *A. japonicus* were chosen for solid fermentation in the arabica and robusta coffee husks, after enzymatic analysis of these isolates was decided to characterize the crude extract of *A. japonicus* cultivated in arabica coffee husk. Large production CMCases, xylanase and pectinase were detected. The crude extract was concentrated by ultrafiltration by membrane retention 30 kDa and subjected to molecular exclusion chromatography (Sephadex G 50). Two major fractions were found and evaluated for thermal stability, optimum temperature and pH. The optimum temperature was described as 50 ° C and optimum pH in acidic range 3,5 to 6,0. The Pico 1 of the molecular exclusion chromatography was subjected to ion exchange chromatography Q Sepharose for CMCCase purification. An endo-1,4-β-glucosidase of approximately 38 kDa was semi purified.

**Keywords:** Bioprospecting, Soil fungi, Solid state fermentation, Coffee husks.

## **ABREVIATURAS**

C: Concentrado

CCA: Casca de café arábica

CCR: Casca de café robusta

CMC: Carboximetilcelulose

CMCase: Carboximetilcelulase

CONC: Concentrado

DNS: Ácido dinitrosalicílico

DRBC: Dicloran Rosa Bengala Clortetraciclina

EB: Extrato bruto

EBC: Extrato bruto concentrado

FES: Fermentação em estado sólido

FSm: Fermentação submersa

KDa: Kilo Daltons

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight

PECT: Pectina

UF: Ultrafiltrado

XIL: xilana

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Evolução da produção brasileira. ....	19
Figura 2 Produção de café (Safra 2013). Participação percentual por estado. .....	19
Figura 3 Estrutura do fruto de café .....	21
Figura 4 Estrutura biomassa lignocelulósica .....	26
Figura 5 Representação estrutural da celulose, formada por celobiose.....	26
Figura 6 Representação das ligações das fibras de celulose. ....	27
Figura 7 Estrutura da molécula de pectina (extraída de YADAV, 2009). ....	31
Figura 8 Localização pontos de coleta de solo. ....	49
Figura 9 Fluxograma da técnica de lavagem de solo e cultivo de partículas	50
Figura 10 Bigplot da influência da temperatura, meios de cultura e fragmentos pela análise de correlação (AC). ....	55
Figura 11 Índice enzimático para CMCase e xilanase de isolados .....	58
Figura 12 Halos de degradação xilanolítica e celulolítica .....	59
Figura 13 Dendrograma dos isolados .....	60
Figura 14 Perfil enzimático de <i>Fusarium solani</i> .....	90
Figura 15 Perfil enzimático de <i>Aspergillus japonicus</i> .....	90
Figura 16 Perfil enzimático de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	91
Figura 17 Perfil enzimático <i>Clonostachys rosea</i> .....	91
Figura 18 Variação da umidade e pH durante fermentação sólida por <i>Aspergillus japonicus</i> .....	93
Figura 19 Variação da umidade e pH durante fermentação sólida por <i>Clonostachys rosea</i> .....	94
Figura 20 Perfil enzimático da fermentação de casca de café arábica por <i>Clonostachys rosea</i> .....	95
Figura 21 Perfil enzimático da fermentação de casca de café robusta por <i>Clonostachys rosea</i> .....	96
Figura 22 Perfil enzimático da fermentação de casca de café arábica por <i>Aspergillus japonicus</i> . ....	97
Figura 23 Perfil enzimático da fermentação de casca de café robusta por <i>Aspergillus japonicus</i> .....	98
Figura 24 Perfis proteicos de acompanhamento de ultrafiltração onde (A) Perfil enzimático Extrato Bruto em diferentes concentrações proteicas ( $\mu\text{g/ml}$ ) (B) Perfil enzimático Concentrado em diferentes concentrações	

proteicas ( $\mu\text{g/ml}$ ) (C) Perfil enzimático Ultrafiltrado em diferentes concentrações proteicas ( $\mu\text{g/ml}$ ) (D) Zimograma co-polimerizado com CMC 4 % contendo amostras de Extrato Bruto (EB), Concentrado (C) e Ultrafiltrado (UF) em diferentes concentrações proteicas.....	102
Figura 25 Perfil cromatográfico de Extrato Bruto Concentrado aplicado em coluna de exclusão molecular Sephadex G50.....	103
Figura 26 Efeito da temperatura sobre pectinases, celulasas e xilanases de diferentes amostras onde (A) efeito da temperatura sobre xilanases (B) efeito da temperatura sobre celulasas e (C) efeito da temperatura sobre pectinases. ....	105
Figura 27 Perfis enzimáticos correspondentes à termoestabilidade a 50°C por seis dias, onde (A) perfis de xilanases (B) perfis de celulasas e (C) perfis de pectinases.....	108
Figura 28 Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (A) efeito do pH sobre CMCCase de CONC (B) efeito do pH sobre xilanase de CONC (C) efeito do pH sobre pectinase de CONC.....	110
Figura 29 Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (D) efeito do pH sobre CMCCase de CMC (E) efeito do pH sobre xilanase de CMC (F) efeito do pH sobre pectinase de CMC .....	111
Figura 30 Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (G) efeito do pH sobre CMCCase de XIL (H) efeito do pH sobre xilanase de XIL (I) efeito do pH sobre pectinase de XIL.....	112
Figura 31 Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (J) efeito do pH sobre CMCCase de PICO 1 (K) efeito do pH sobre xilanase de PICO 1 (L) efeito do pH sobre pectinase de PICO 1 .....	113
Figura 32 Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (M) efeito do pH sobre CMCCase de PICO 2 (N) efeito do pH sobre xilanase de PICO 2 (O) efeito do pH sobre pectinase de PICO 2.....	114
Figura 33 Perfil cromatográfico de Pico 1 em coluna Q Sepharose. ....	115
Figura 34 Perfil eletroforético em gel de acrilamida 12% das frações cromatográficas oriundas de Sephadex G 50 e Q Sepharose. ....	116

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Composição da polpa e casca de café .....	24
Tabela 2 Biodiversidade relativa à temperatura de 36°C .....	53
Tabela 3 Biodiversidade relativa à temperatura de 28°C .....	54
Tabela 4 Biodiversidade relativa à temperatura de 20°C .....	54
Tabela 5 Identificação morfológicas melhores produtores enzimáticos.....	61
Tabela 6 Composição bromatológica de CCA e CCR fermentadas e não fermentadas.....	99

## SUMÁRIO

1 Introdução	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Café - Brasil e Importância Mundial.	18
2.2 Café	20
2.3 Potencial biotecnológico dos resíduos de café.	23
2.4 Materiais lignocelulósicos	25
2.4.1 Celulose	26
2.4.2 Hemicelulose	28
2.4.3 Lignina	28
2.4.4 Pectina	29
2.5 Pré-tratamento microbiológico	31
2.6 Fungos filamentosos	32
2.7 Utilização de MALDI-TOF	34
BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS A PARTIR DE SOLO PARA SCREENING ENZIMÁTICO	45
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1 Isolamento dos fungos filamentosos	49
2.1.2 Manutenção celular	50
2.2 Avaliação prévia da atividade celulolítica dos isolados em meio com Lugol	50
2.3 Identificação proteômica dos isolados por MALDI-TOF	51
2.4 Análises estatísticas	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Isolamento dos fungos filamentosos	52
3.2 Avaliação das atividades enzimáticas	57

5.3 Identificação proteômica por MALDI-TOF	59
6 Considerações finais	62
7 Perspectivas futuras	62
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO 3	76
SCREENING ENZIMÁTICO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CELULASE, XILANASE E PECTINASE DE <i>Aspergillus japonicus</i>	76
RESUMO	76
1 INTRODUÇÃO	78
2 MATERIAIS E MÉTODOS	81
2.1 Fermentação Submersa	81
2.1.2 Construção da curva de indução para produção de celulasas e xilanases	81
2.2 Preparação das cascas de café arábica e robusta	82
2.2.1 Análises químicas e físico-químicas da casca de café	82
2.2.3 Potencial hidrogeniônico (pH)	82
2.2.3 Extrato etéreo ou lipídios totais	82
2.2.4 Proteína Bruta	82
2.2.5 Celulose e hemicelulose.	83
2.2.6 Cinzas	83
2.3 Fermentação em estado sólido	83
2.4 Tratamento das amostras	84
2.5 Determinações analíticas	84
2.5.1 Umidade	84
2.5.2 pH	84
2.6 Atividade e caracterização enzimática	85



2.6.1	Determinação de atividade enzimática	85
2.6.2	Efeito da temperatura na atividade enzimática	85
2.6.3	Efeito do pH na atividade enzimática	85
2.6.4	Avaliação da termoestabilidade	86
2.7	Purificação das enzimas	86
2.7.1	Ultrafiltração	86
2.7.2	Cromatografia de exclusão molecular	86
2.7.3	Precipitação proteica com sulfato de amônio	87
2.7.4	Cromatografia de troca iônica	87
2.8	Determinação da concentração de proteína	88
2.9	Análise em gel	88
2.10	Zimograma	88
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1	Fermentação submersa e curva de indução enzimática	89
3.2	Fermentação sólida das cascas de café arábica e robusta	92
3.3	Análises químicas e físico-químicas da casca de café	99
3.4	Purificação das enzimas de interesse	101
3.5	Caracterização das amostras semipurificadas	103
11	Considerações finais	117
12	Perspectivas futuras	117
	REFERÊNCIAS	118
	ANEXO I	127
	ANEXO II	128

## CAPÍTULO 1

### 1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de café, representando 40% da produção total e o segundo maior mercado consumidor dessa bebida, destacando-se por ser o único país produtor que consome parcela significativa de sua produção. O estado de Minas Gerais destaca-se como principal produtor nacional, seguido de Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013). O café é um dos principais produtos agrícolas do Brasil. A planta do cafeeiro pertence ao gênero *Coffea*, sendo as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, as de maior relevância no mercado (CARMO, 2013).

A terceira estimativa da produção brasileira de café (arábica e robusta), para a safra de 2013, indica que o país colheu 47,54 milhões de sacas de café beneficiado. O resultado apresenta uma redução de 6,46% quando comparada à produção de 2012, com 50,83 milhões de sacas obtidas. Essa redução se deveu, sobretudo, ao ciclo negativo de bienalidade da produção, porém esse resultado representou uma produção recorde dentro deste ciclo, principalmente pela melhora dos tratamentos culturais das lavouras e a recuperação dos preços nos mercados, externo e interno (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

A grande produção e consumo de café no país levam também a geração de uma enorme quantidade de resíduos, principalmente pelo beneficiamento dos grãos de café pós-colheita, fundamental para uma bebida de boa qualidade (ANDRADE, 2011).

No Brasil, são utilizados dois tipos de processamento pós-colheita: por via seca e via úmida. No preparo por via seca, o café é seco sem a retirada da casca, através da derricha de frutos da planta, que são levados ao terreiro ou secador, podendo previamente passar ou não por um lavador, dando origem ao café natural em coco. Já no preparo por via úmida, os grãos são lavados, descascados, despulpados ou desmucilados, a depender do tipo de processamento (CARMO, 2013). Os sólidos residuais obtidos são denominados polpa, para designar os resíduos provenientes do

processamento por via úmida e casca para denominar os resíduos oriundos do processamento do café por via seca (PIMENTA, 2003).

A quantidade de casca de café gerada durante o processamento é equivalente ao total de grãos beneficiados. Estima-se que para cada tonelada de grãos de café produzida, a mesma quantidade de casca seja gerada durante o processamento por via seca, enquanto o processamento por via úmida gera aproximadamente o dobro de resíduos em relação à quantidade de material processado (SAENGER et al., 2001).

Os resíduos oriundos do processamento pós-colheita são ricos em materiais orgânicos e inorgânicos, que, atualmente, não possuem aplicação apropriada, sendo na maioria das vezes descartados sem tratamento prévio ao meio ambiente, o que geralmente causa poluição dos solos e corpos d'água que estão em contato com tais resíduos.

As ricas composições desses resíduos os tornam potenciais substratos para processos biotecnológicos e ajudam a resolver o problema de poluição ambiental (PANDEY et al., 2000).

Materiais lignocelulósicos são compostos de lignina, polímeros de carboidratos (hemicelulose e celulose), e pequenas partes de outros compostos (extratos, ácidos, sais e minerais) e são frequentemente chamados de lignocelulósicos (DIONISIO et al., 2009). A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos constituídos de hexoses e pentoses que estão envoltos em uma matriz amorfa, a lignina.

Uma forma interessante de agregar valor à casca do café e melhorar o decorrente problema ambiental de seu descarte indevido, seria a utilização deste resíduo para a produção da enzima celulase, muito utilizada em processos industriais.

Devido à presença de fatores antifisiológicos e antinutricionais, a polpa e a casca de café não são consideradas substrato adequado para processos de bioconversão. Porém, é neste contexto que os fungos filamentosos exercem sua habilidade de degradar biomassa lignocelulósica produzindo vários compostos de interesse industrial.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de se encontrar uma ou mais cepas de fungos filamentosos, bons produtores de celulasas e xilanases capazes de degradar a biomassa lignocelulósica presente nos resíduos do processamento de café, por via seca.

Esta dissertação será dividida em três capítulos. O primeiro capítulo refere-se ao referencial teórico, no qual foi baseado todo o estudo. O segundo capítulo apresenta o processo de bioprospecção dos fungos em serrapilheira que deram origem ao material biológico utilizado durante todo o procedimento experimental. No terceiro, são expostos os resultados de um *screening* enzimático para celulase e xilanase realizado a partir dos fungos oriundos da bioprospecção com posterior fermentação sólida, utilizando como substratos as cascas de café arábica e robusta e a caracterização do *pool* enzimático de *Aspergillus japonicus*, o melhor produtor de celulase encontrado durante todo o estudo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

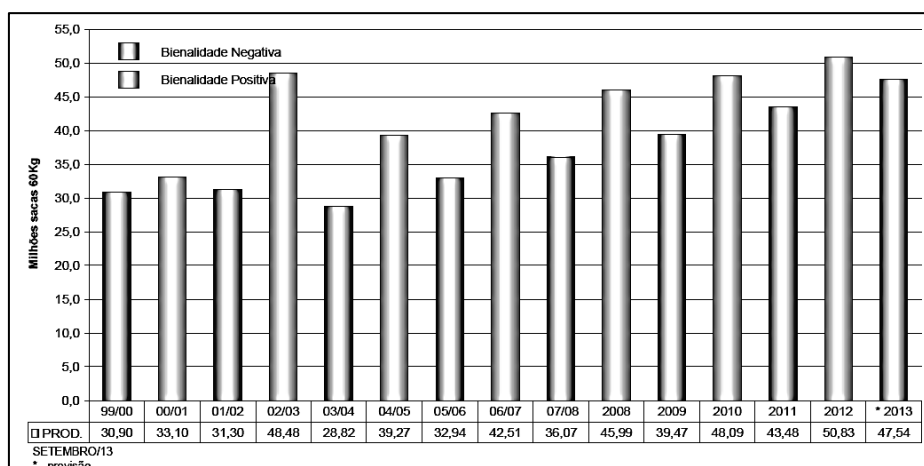
### 2.1 Café - Brasil e Importância Mundial.

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas do mundo e a segunda maior commodity comercializada (JAYACHANDRA; VENUGOPAL; ANU APPAIAH, 2011), estando atrás apenas do petróleo bruto. A importância econômica do café deve-se, principalmente, por serem a bebida ou infusão, preparadas com os grãos torrados ou moídos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

O Brasil destaca-se por ser o maior produtor e exportador mundial de café, e o segundo mercado consumidor. Sua importância na economia não está somente no setor de exportações, bem como em sua industrialização e geração de grande número de empregos em toda sua cadeia produtiva.

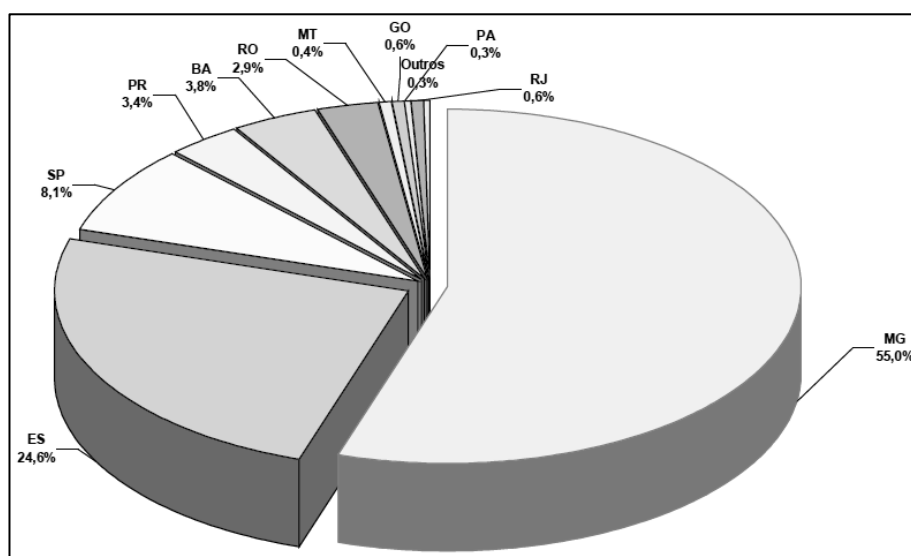
Em 2012, a produção mundial foi de 144,611 mil sacas de café, e o Brasil contribuiu com 35,15% dessa produção. A terceira estimativa da produção brasileira de café, de setembro de 2013, indicou que o país colheu neste mesmo ano 47,54 milhões de sacas (60 kg) de café beneficiado. Esse resultado apresenta redução de 6,46%, quando comparada à produção da temporada anterior, de 50,83 milhões de sacas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

O cafeeiro é uma planta que apresenta regime de bienalidade de produção, alternando safras baixas (negativas) e safras altas (positivas) (MATIELLO, 2010). A redução de 17,23% da produção de 2013 em relação a 2012 deve-se a este fenômeno da bienalidade negativa na maioria das áreas cultivadas e ao regime de chuvas bastante irregular, aliado às altas temperaturas. Porém, esse resultado apresenta maior safra de ciclo de baixa bienalidade já produzida no país, devido principalmente à maior utilização da mecanização aliada às inovações tecnológicas, às exigências do mercado, qualidade do produto e boa gestão das atividades. A figura 1 demonstra a evolução da produção brasileira.



**Figura 1** Evolução da produção brasileira.

A área plantada com a cultura de café (arábica e robusta), no país, totaliza 2.312.152 hectares. Minas Gerais é o maior estado produtor com maior área concentrada de produção, 53,49%, o que corresponde a 1.236,9 hectares, sendo espécie predominante, a arábica, com 98,82%. Espírito Santo é o segundo maior estado produtor, com uma área plantada de 499.082 hectares e a espécie prevalente é a robusta, com 62,35% de toda a área cultivada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013). A figura 2 ilustra a produção de café referente a setembro de 2013.



**Figura 2** Produção de café (Safrá 2013). Participação percentual por estado.

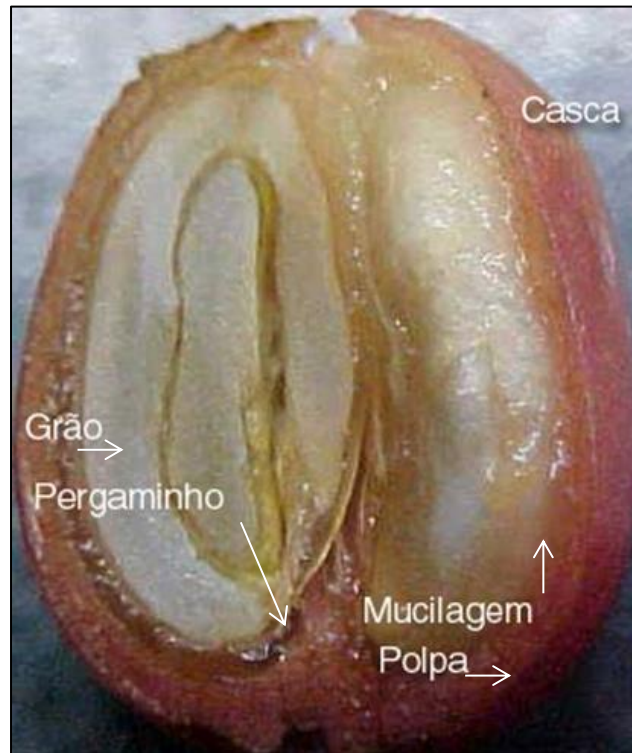
## 2.2 Café

A planta do café produz frutos com polpa doce e fina, em cujo interior encontram-se duas sementes, que são os grãos de café. Café é o nome dado à semente sadia e limpa pertencente à família dos *Rubiaceae*, gênero *Coffea* (HALAL, 2008). Das seis mil espécies dessa família, cem espécies são descritas neste gênero, porém, do ponto de vista econômico, as duas espécies mais importantes cultivadas no mundo são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Seus produtos são designados como café arábica e café robusta, respectivamente, sendo o primeiro mais explorado internacionalmente (CARMO, 2013).

A espécie arábica é mais complexa geneticamente, contendo 44 cromossomos, enquanto a espécie robusta possui apenas 22. Esta diferença promove, além da alteração de sabor das bebidas produzidas, a condução da planta em si. A espécie arábica produz cafés de melhor qualidade, mais finos e requintados, possui aroma intenso e os mais diversos sabores, com inúmeras variações de corpo e acidez. A espécie robusta tem trato mais rude e não possui sabores variados, sua acidez é mais baixa e apresenta maior quantidade de sólidos solúveis, o que aumenta sua utilização em indústrias de cafés solúveis, em todo o mundo (ORMOND; PAULA; FAVERET FILHO, 1999).

O fruto do cafeeiro (também chamado de baga ou cereja) consiste de uma resistente camada exterior lisa ou pericarpo, geralmente verde em frutos imaturos, mas que se tornam vermelho ou profundamente vermelho-violeta quando maduros (até mesmo amarelo ou laranja em genótipos específicos) (ESQUIVEL; JIMENEZ, 2012). O pericarpo recobre o mesocarpo (denominado polpa) macio, amarelado, fibroso e adocicado, representa 29% do peso seco do fruto inteiro, sendo composto de 76% de água, 10% de proteína, 2% de fibras, 8% de cinzas e 4% de extrato livre de nitrogênio, os quais são representados pelos taninos, substâncias pécticas, açúcares redutores e não-redutores, cafeína, ácido clorogênico e ácido caféico, celulose, hemicelulose, lignina, aminoácidos, minerais: como potássio, cálcio, ferro, sódio, magnésio e outros. A mucilagem está situada na parte interna do mesocarpo e está fortemente aderida ao pergaminho do grão. Ela funciona como um sistema de hidrogel, sendo quimicamente composta por água, substâncias pécticas, açúcares redutores e ácidos orgânicos (LIMA,

2008). O endocarpo é uma fina camada de coloração amarelada, também chamada de pergaminho, composto por celulose (40 – 49%), hemicelulose (25 – 32%), lignina (33 – 35%) e cinzas (0,5 – 1%). Finalmente uma fina camada prateada recobre cada hemisfério do grão de café (endosperma) (ESQUIVEL; JIMENEZ, 2012). O fruto do cafeeiro e seus componentes estão representados na figura 3.



**Figura 3 Estrutura do fruto de café (Imagem cedida por Luís Roberto Batista)**

O estágio cereja representa o ponto ótimo de maturação do café, em que toda a composição química dos frutos encontra-se em seu valor máximo (PIMENTA, 2003). Após a colheita, o preparo do café inicia-se com o processo de lavagem que é importante prática para reduzir ou eliminar determinados defeitos, como separação da fração boia, (ORNELLAS, 2001) e passa por um processamento que pode ser realizado por via seca, ou úmida.

Na forma de preparo por via seca, o fruto em sua forma integral é seco (com casca e mucilagem), sem separação entre os frutos verdes e cereja, e espalhado em terreiros para uma secagem natural preliminar, podendo ser levado em seguida a um secador rotativo, onde ocorre a secagem final. O teor de umidade mínimo é aproximadamente 12%, dando



origem aos cafés denominados coco, de terreiro ou natural. Depois de seco, o café é levado à máquina de beneficiamento que separa os grãos da casca (SILVA, 2012). Na forma de preparo por via úmida, a água permite a separação dos frutos em maduros, verdes e bagas danificadas, através de flotação. Originam-se os cafés despulpados, desmucilados e cereja descascados (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; LIMA et al., 2008). Na obtenção do café cereja descascado, a casca e a polpa do fruto são removidas de forma mecânica, e parte da mucilagem ainda permanece aderida ao pergaminho dos frutos (MALTA, 2010), ela então é seca juntamente com o pergaminho, num processo conhecido como intermediário entre o natural e o despulpado ou desmucilados, que, apesar de ter características próprias, tende comumente para as características do café natural, uma vez que os produtos da mucilagem são transferidos para o grão (BRANDO, 1999). Na obtenção do café despulpado, após o descascamento, a parte da mucilagem que ainda estava aderida aos frutos é removida em tanques de fermentação “controlada” (12 - 48h) e lavagem em tanques de concreto ou lavagem mecânica. A mucilagem é, portanto, hidrolisada por enzimas tanto dos tecidos do grão de café quanto dos microrganismos encontrados na superfície da casca (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). A população de microrganismos possui influência direta sobre a qualidade final dos grãos de café (AVALLONE et al., 2002). Se a remoção desta mucilagem for realizada mecanicamente, tem-se então o café desmucilado (MALTA, 2010). A fração boia tem seu preparo exclusivo por via seca (LIMA et al., 2008).

Em virtude do método de processamento do café cereja, os sólidos residuais obtidos têm diferentes terminologias, sendo polpa o termo designado para os sólidos provenientes do processamento por via úmida e casca, os resíduos oriundos do processamento de café por via seca (PANDEY; SOCCOL; NIGAM, 2000). Para se evitar complicações oriundas de mesma nomenclatura, faz-se destacar a diferença entre polpa, mesocarpo externo do fruto de café, e resíduo de polpa de café constituído do epicarpo e parte do mesocarpo. Dessa maneira, casca é obtida seca e polpa é obtida úmida e não contém o pergaminho, que fica preso ao grão como forma de proteção (MATIELLO, 2010).

### **2.3 Potencial biotecnológico dos resíduos de café.**

Uma grande quantidade de resíduos é gerada todo ano decorrente do processamento industrial de produtos agrícolas ou animais. Eles são constituídos principalmente por açúcares, fibras, proteínas e minerais que são compostos de interesse industrial, devido à rica composição e à grande disponibilidade para reutilização em outros processos, do ponto de vista econômico e ambiental (HALAL, 2008).

Os aspectos econômicos para tamanho interesse são baseados no fato de que tais resíduos podem ser utilizados como materiais de baixo custo que podem ter valor agregado durante a produção de produtos biotecnológicos, além da expectativa de reduzir os custos de produção. Como preocupação ambiental, os resíduos agroindustriais contêm compostos fenólicos e outros compostos potencialmente tóxicos que podem ser a causa de poluição ambiental quando depositados na natureza sem tratamento prévio (MUSSATTO et al., 2012).

Os atuais métodos de pré-tratamento de resíduos agroindustriais têm se restringido ao corte, moagem, esterilização ou pasteurização e pré-tratamento químico com adição de nutrientes para aumentar sua acessibilidade à digestão enzimática, e aumento na produção de biogás (JAYACHANDRA; VENUGOPAL; ANU APPAIAH, 2011).

A quantidade de casca de café gerada durante o processamento é equivalente ao total de grãos beneficiados. Estima-se que para cada tonelada de grãos de café produzida, a mesma quantidade de casca é gerada durante o processamento por via seca, enquanto o processamento por via úmida gera aproximadamente o dobro de resíduos, em relação à quantidade de material processado (SAENGER et al., 2001). Durante a safra de 2012, somente até outubro, o Brasil gerou 36.530 toneladas de resíduos de café (BRASIL, 2012).

No Brasil, os cafés são geralmente processados pelo método de via seca, resultam em cascas de café ricas em nutrientes, matéria orgânica, cafeína, taninos e polifenóis. A composição da casca é diferente da polpa de café, porém a natureza dos compostos presentes é similar. Esta diferença pode ser percentual na composição dos constituintes, dependendo do tipo de processamento, cultivar analisada, condições de cultivo, dentre outros

(PANDEY et al., 2000). A tabela 1 mostra a composição da polpa e da casca de café, por alguns autores.

**Tabela 1 Composição da polpa e casca de café**

	POLPA			CASCA	
	Bressa -ni. 1972	Barcelos et al, 1997	Barcelos et al, 2001	Barcelos et al, 2001	Souza et al, 2001
Matéria Seca	87,4	87,7 - 89,7	88,57	88,37	83,48
Fibra Bruta	21	*	*	*	*
Extrato etéreo	2,5	1,8 - 1,9	2,56	2,81	1,62
Proteína Bruta	11,2	10,3 - 11,4	12,94	9,92	10,99
Cálcio	0,554	0,21 - 0,43	0,34	0,36	*
Fósforo	0,116	0,09 - 0,12	0,18	0,19	*
Potássio	1,76	*	*	*	*
Cafeína	1,5	*	*	*	*
FDN	*	48,4 - 51,7	78,08	77,19	50,28
FDA	*	33 - 42	54,45	52,2	35,59
Celulose	*	*	37,26	36,68	22,72
Hemicelulose	*	*	24,98	23,63	14,69
Ferro	*	*	1240	1251	*
Zinco	*	*	21,3	21,24	*
Manganês	*	*	71,54	70,95	*

Obs.: Os valores obtidos na tabela são expressos em porcentagem de peso seco. Dados não disponíveis estão representados por (\*).

Atualmente, vários estudos têm sido realizados para desenvolver métodos de reutilização dos resíduos de café; grande parte tem sido direcionada à produção de ração animal e geração de energia, fertilizantes, vermicompostagem, etanol, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, metabólitos secundários biologicamente ativos, dentre outros (PANDEY et al., 2000).

Um dos usos mais promissores para a polpa de café foi proposto por Salmenes et al. (2005), em que os resíduos foram convertidos para alimentação humana através da produção de cogumelos comestíveis, em

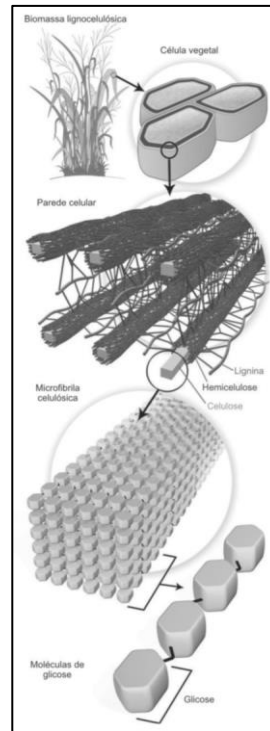
grandes países produtores. Este recurso pode ser ainda restrito devido à presença de fatores indesejáveis não completamente degradados pela cepa utilizada, como polifenóis, taninos e cafeína.

De acordo com estimativas, 1 tonelada de polpa de café pode produzir cerca de 131 m<sup>3</sup> de biogás, por digestão anaeróbica, que se torna equivalente a 100 l de petróleo em combustível (GAUTHO; RANTALA; MAATT, 1991). Kida, Ikkal e Sonoda (1992) estudaram a digestão anaeróbica dos resíduos sólidos do beneficiamento de café em um sistema de duas fases. Os autores concluíram que os resíduos sólidos de café robusta e arábica geraram cerca de 650 e 730 m<sup>3</sup> de metano por sólidos voláteis, respectivamente, estando acima de qualquer outro resíduo agroindustrial (bagaço de cana – 230 m<sup>3</sup>, sisal – 400 m<sup>3</sup> e farelo de milho – 450 m<sup>3</sup>).

#### **2.4 Materiais lignocelulósicos**

Materiais lignocelulósicos são compostos de lignina, polímeros de carboidratos (hemicelulose e celulose), e pequenas partes de outros compostos (extratos, ácidos, sais e minerais) e são frequentemente chamados lignocelulósicos (DIONISIO et al., 2009). A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos constituídos de hexoses e pentoses que estão envolvidos em uma matriz amorfa que age como barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos, porém podem ser hidrolisados a açúcares, e eventualmente, fermentados a etanol (SANTOS et al., 2012).

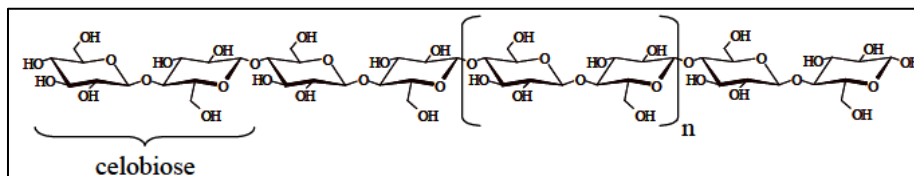
A composição química básica da biomassa lignocelulósica, geralmente, contém 23-53% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-30% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Esta composição química varia em função do tipo de biomassa (HARGREAVES, 2008).



**Figura 4 Estrutura biomassa lignocelulósica**

#### 2.4.1 Celulose

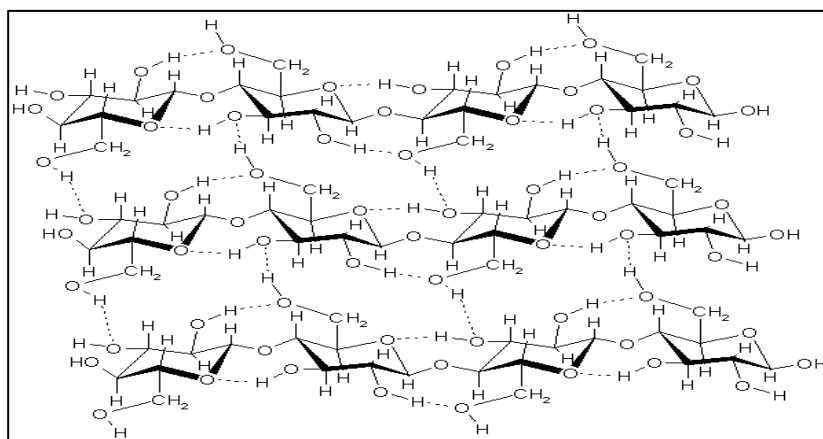
A celulose é o polímero linear de maior ocorrência mundial, cujas fibras encontram-se imersas numa matriz complexa, protegida pela rede de hemicelulose e lignina. Esse homopolissacarídeo, de ocorrência natural, é composto por cadeias com grau de polimerização de 4.000 a 15.000 unidades de glicose, cada unidade une-se a outra por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$  e cada par dessa hexose é definida como celobiose (unidade conformacional mínima da celulose) e a glicose é a unidade fundamental da cadeia homopolimérica (HARGREAVES, 2008).



**Figura 5 Representação estrutural da celulose, formada por celobiose.**

Sua estrutura pode ser classificada em três níveis organizacionais: o primeiro é definido pela sequência de resíduos  $\beta$ -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose

com ligações  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas, de forma geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ ; o segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos, e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares; o terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma estrutura cristalina, estes conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em grande número de outros solventes de difícil acessibilidade enzimática (SANTOS et al., 2012).



**Figura 6** Representação das ligações das fibras de celulose.

Celulose, geralmente, está presente no ambiente como uma forma cristalina e em pequenas quantias de cadeias celulósicas para-cristalinas não organizadas de forma amorfa. Nesta última conformação é mais susceptível à degradação enzimática (SÁNCHEZ, 2009).

A hidrólise completa da celulose requer a ação de três tipos de atividades enzimáticas distintas: (i) endo-1,4- $\beta$ -glicanase (conhecida por endocelulase ou endoglicanase) que atua catalisando a hidrólise aleatória de ligações glicosídicas presentes em porções internas das regiões amorfas da fibra de celulose gerando duas novas extremidades, uma redutora e uma não redutora; (ii) exo-1,4- $\beta$ -glicanase (conhecida como celodextrinase ou celobiohidrolase) atua nas extremidades redutoras e não redutoras das fibras de celulose gerando glicose (celodextrinase) ou celbiose (celobiohidrolase) como produto final; e (iii)  $\beta$ -glicosidade (conhecida por celobiase) que libera monômeros de D-glicose por meio de catálise da hidrólise de celbiose e das extremidades não redutoras de celulose. Entretanto, a hidrólise completa da celulose é limitada pela recalcitrância da biomassa vegetal e consequente

dificuldade do acesso das enzimas hidrolíticas. Para contornar esse problema, alguns fungos produzem proteínas, chamadas swoleninas, responsáveis por promover uma desordem molecular de regiões cristalinas da fibra de celulose resultando em afrouxamento e conseqüente exposição e solubilização das moléculas de celulose, um processo denominado amorfogênese (MARTINS, 2012).

#### **2.4.2 Hemicelulose**

As hemiceluloses são um grupo de heteropolissacarídeos complexos compostos por polímeros de pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e ácidos de açúcares (ácido-D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico) (SAHA, 2003). São geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto, como por exemplo, xilanas, mananas e glucanas (ODEGA; PETRI, 2010).

A composição química e características estruturais variam amplamente através das espécies, localizações subcelulares e estágios de desenvolvimento. Geralmente as hemiceluloses estão quimicamente associadas ou reticuladas a outros polissacarídeos, proteínas ou ligninas. São estruturalmente mais semelhantes à celulose do que à lignina, pois a interação entre suas microfibrilas são mais fortes. Sua estrutura apresenta ramificações (baixo grau de polimerização – 70 a 200) que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado.

Comparadas à celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Essa reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo desses polissacarídeos (SANTOS et al., 2012).

#### **2.4.3 Lignina**

A lignina, depois da celulose é a macromolécula mais abundante dentre as biomassas lignocelulósicas. É um heteropolímero amorfo tridimensional não solúvel em água, opticamente inativo que forma uma vedação física impermeável na parede celular da planta, devido à sua interação com as fibras de celulose e hemicelulose. Está presente principalmente na lamela média e nas paredes secundárias, onde confere

resistência mecânica, impermeabilização celular, proteção química (estresse oxidativo) e biológica, além de contribuir para a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (SÁNCHEZ, 2009).

Consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico. A proporção de cada unidade pode variar conforme o tecido e conforme os diferentes grupos de plantas vasculares. Além disso, tais unidades podem se organizar de diversas formas, o que promove a grande heterogeneidade de ligações observadas na molécula e um desafio à sua biodegradação (MARTINS, 2012).

A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares. A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (BORTOLAZZO, 2011).

No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (SANTOS et al., 2012).

Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material (BORTOLAZZO, 2011)

#### **2.4.4 Pectina**

Substâncias pécticas e celulosas são os carboidratos mais abundantes presentes nas plantas. Substância péctica é o nome genérico usado para os compostos que agem sobre as enzimas pectinolíticas como pectina, protopectina e ácidos pécticos, presentes na parede celular e lamela média contribuem na firmeza e estrutura dos tecidos vegetais (GUMMADI; PANDA, 2003; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Quimicamente, as substâncias pécticas são polissacarídeos complexos de ácidos coloidais, com um esqueleto principal de resíduos de ácidos galacturônicos ligados por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas e os grupos carbonila são esterificados de 60 – 90% com metanol, de alto peso molecular (25 - 360 KDa), carga negativa e ácidas. (GUMMADI; PANDA, 2003) Pode



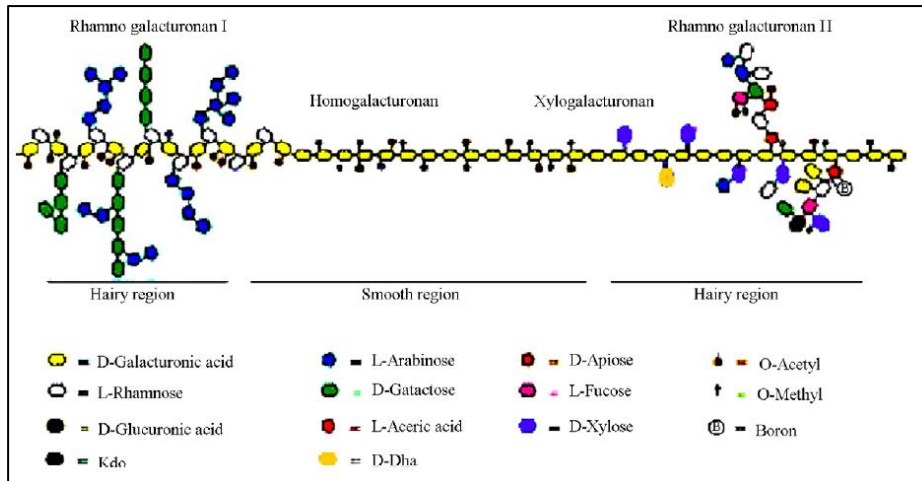
ser dividida em duas regiões: “região lisa” e “região peluda”. O grau de esterificação varia dependendo da fonte. A maioria consiste de três polissacarídeos estruturalmente bem caracterizados: homogalacturanas (HGA), ramnogalacturanas I e ramnogalacturanas II (RGI e RGII). Esses três polissacarídeos formam uma rede que tem um considerável potencial de modulação de suas estruturas pela ação das enzimas de degradação da parede celular (YADAV et al., 2009).

As homogalacturanas representam a cadeia principal da molécula de pectina, contendo resíduos de ácido galacturônico ligados por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas, que podem ser metilados na posição O-6. As ramnogalacturanas I estão localizadas em uma área altamente ramificada contendo grande número de cadeias laterais de resíduos de  $\alpha$ -D-ramnopiranosose ligados por ligações  $\alpha$ -1,2, enquanto a estrutura mais complexa das ramnogalacturanas II tem sido identificada na parede celular de algumas plantas como polímero estrutural (YADAV et al., 2009).

A molécula de pectina é ramificada na parte das ramnogalacturanas por cadeias laterais como arabinogalacturanas que estão ligadas por ligações  $\beta$ -1,4 à ramnose. Nas cadeias principais, as unidades de arabinose estão unidas por ligações  $\alpha$ -1,5 e as unidades de galactose por ligações  $\beta$ -1,4.

As substâncias pectínicas estão presentes em várias formas nas plantas e isto é uma provável razão para a existência de várias formas de enzimas pectinolíticas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As substâncias pectínicas representam de 0,5 – 4% do peso de materiais frescos. Em frutos imaturos, a pectina está ligada às microfibrilas de celulose na parede celular. Tais pectinas são insolúveis e, portanto, conferem rigidez à parede celular. Porém, durante a maturação, a estrutura da pectina é alterada pela ocorrência natural de enzimas nos frutos. Essas alterações envolvem a quebra da cadeia pectínica ou das suas cadeias laterais ligadas às unidades da cadeia principal. Nesse caso, as pectinas tornam-se mais solúveis e sua aderência à parede celular é perdida, deixando os tecidos vegetais mais macios (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).



**Figura 7** Estrutura da molécula de pectina (extraída de YADAV, 2009).

## 2.5 Pré-tratamento microbiológico

O pré-tratamento refere-se à solubilização e separação de um ou mais dos quatro principais componentes da biomassa: hemicelulose, celulose, lignina e extratos, para tornar a biomassa sólida mais acessível a posteriores tratamentos. A hidrólise quebra as ligações de hidrogênio de hemicelulose e celulose em pentoses e hexoses, porém, se o pré-tratamento ocorrer de forma muito agressiva, os açúcares liberados podem ser degradados em compostos inibidores das enzimas diminuindo o rendimento. Entretanto, se condições muito brandas forem utilizadas, haverá pequena disponibilidade para a enzima (DIONISIO et al., 2009).

Devido à presença de fatores antifisiológicos e antinutricionais, tais como taninos e fenóis, a polpa e a casca de café não são consideradas um substrato adequado para processos de bioconversão. Consequentemente, grande parte desses recursos não é utilizada ou o são de forma escassa.

Se estes constituintes tóxicos forem removidos, ou pelo menos degradados a um nível razoavelmente baixo, novos caminhos serão abertos para a utilização desses resíduos como substratos para grandes processos biotecnológicos. Portanto, processos de detoxificação (pré-tratamentos) destes fazem-se necessários e podem ser químicos (ácidos, alcalinos ou oxidativos), físicos (calor), microbiológicos (hidrólise enzimática) ou de fracionamento da parede vegetal por solvente (ácido fosfórico ou líquidos iônicos) (OROZCO et al., 2008).

Alguns dos métodos químicos e físicos não são economicamente viáveis, mesmo que sejam eficientes. O que nos leva ao desenvolvimento de

métodos biológicos. Um dos processos mais promissores para a transformação de materiais celulósicos é a hidrólise enzimática, seguida da fermentação por microrganismos (GAUTAM, 2010).

Vários tratamentos biológicos incluem o uso de microrganismos como leveduras, bactérias e fungos filamentosos (OROZCO et al., 2008), especialmente basidiomicetos. Um estudo realizado por Roussos et al (1995), avaliou a microflora endofítica da casca e polpa de café revelando uma ampla variedade de microrganismos em diferentes tratamentos do substrato. Como resultado, obtiveram uma maior população de bactérias quando a polpa foi seca ao sol, logo após o despolpamento, uma maior população de leveduras; quando a polpa foi liofilizada, após término do beneficiamento e quando utilizaram a casca do café, e uma maior população de fungos filamentosos foi identificada em virtude da presença de celulose.

## **2.6 Fungos filamentosos**

Os fungos compõem um grupo extenso e diversificado, encontrados em larga escala na natureza em diversas partes do solo, vegetais, grãos e animais. Possuem morfologia complexa exibindo diferentes formas estruturais durante seu ciclo de vida, podendo ser encontrados como organismos unicelulares (leveduriformes) ou pluricelulares (filamentosos), sendo a última, a forma mais abundante (PAPAGIANNI, 2004; MARTINS, 2012). Sua habilidade de degradar biomassa lignocelulósica faz com que este grupo seja capaz de se adaptar facilmente a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, permitindo-os ocupar uma série de nichos ecológicos como solos, madeira e outros resíduos de materiais orgânicos. Dentre os fungos saprófitos, destacam-se os filos Ascomycota e Basidiomycota (MARTINS, 2012).

Entre os fungos mais efetivos na biodegradação natural da biomassa lignocelulósica, estão os fungos de decomposição branca (“White-rot-fungi”), os fungos de decomposição marrom (“Brown-rot-fungi”) e os fungos de decomposição branda ou macia, de acordo com a morfologia da degradação (OKAMOTO et al., 2011; MELLO; AZEVEDO, 2008).

Os fungos de decomposição branca possuem em comum a capacidade de degradar lignina deixando a celulose praticamente intacta (SÁNCHEZ, 2009; MELLO; AZEVEDO, 2008). São geralmente

basidiomicetos que oxidam compostos fenólicos, relacionados à lignina, que está principalmente associada a enzimas extracelulares lignocelulolíticas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase (MnP) e lacases (KIRK; CROAN; TIEN, 1986; JORGENSEN et al., 2005; HATAKKA, 1990; LEE; MOON, 2003; FERRAZ, 2004).

Os fungos de decomposição marrom atacam extensivamente a celulose e a hemicelulose, fazendo a hidrólise de seus polissacarídeos, deixando a lignina intacta ou, às vezes, modificada estruturalmente (RAY et al., 2010; LEE; MOON, 2003). Recebem esta denominação devido à aparência final do processo, coloração amarronzada e aparência frágil, devido à quebra das microfibrilas da celulose. (LEE; MOON, 2003). Tais fungos representam somente 6% do Filo Basidiomycota (DURÁN; ESPOSITO, 1977).

Já os fungos de decomposição branca atacam principalmente os polissacarídeos da madeira. Pertencem às classes Ascomycota e Deuteromycota e promovem uma degradação de forma suave e aparência úmida, atacam preferencialmente a camada S2 da parede celular secundária, sendo que a camada S2 e a lamela média são resistentes ao ataque, provavelmente, pelo alto teor de lignina (OKAMOTO et al., 2011; JORGENSEN, 2005). Esses fungos são mais eficientes na despolimerização de compostos sintéticos de lignina, porém sua taxa de hidrólise é mais lenta quando comparada utilizando fungos de degradação branca ou marrom (MELLO; AZEVEDO, 2008).

Fungos são considerados os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas, e os principais produtores celulolíticos de celulasas e xilanases incluem: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporum lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus* sp, *Schizophyllum* sp, *Chaetomium* sp e *Humicola* sp, dentre vários outros (BORTOLAZZO, 2011).

## 2.7 Utilização de MALDI-TOF

A Matriz Assistida de Laser Dessorção/Ionização por Tempo de Voo surge como uma das mais confiáveis ferramentas para uma identificação, diferenciação e classificação de microrganismos (CHALUPOVÁ et al., 2014), por ser uma técnica rápida e fácil capaz de analisar compostos orgânicos, incluindo aqueles com alto peso de massa molecular (SILVA et al., 2015).

Desde o advento da espectrometria de massas, numerosas identificações de microrganismos são baseadas no perfil de proteínas da superfície celular. Elas incluem a célula intacta ou esporo intacto para a espectrometria, mas também dependem de uma extração inicial de proteínas por solventes ácidos (CHALUPOVÁ et al., 2014). O MALDI-TOF trabalha com uma suave ionização das moléculas, resultando em fragmentação mínima. O espectro é gerado a partir de proteínas ribossomais abundantes e altamente expressas, de peso molecular entre 2 e 20KDa são utilizadas como biomarcadores (OLIVEIRA et al., 2015).

O MALDI-TOF é comumente usado para a identificação de vários microrganismos como bactérias Gram positivas, enterobacteriaceas, bactérias não fermentativas, micobactérias e vários gêneros de fungos filamentosos, incluindo dermatófitos, zigomicetos e leveduras (PANDA et al., 2015).

As maiores e mais importantes vantagens da espectrometria de massas MALDI são:

- 1- Uma pequena quantidade de material biológica é necessária ( $10^6$ - $10^7$  células microbianas)
- 2- Ambas as medidas e as interpretações dos dados são processos rápidos e relativamente fáceis (CHALUPOVÁ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

## REFERÊNCIAS

ACUMEDIA, C. Drbc agar (7591). **NEOGEN Corporation**, Lansing, p. 6–7, Nov. 2014.

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, Winnipeg, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.005

ANDRADE, K. **Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir da casca e borra de café (*Coffea arabica L.*)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

AOAC. **AOAC: Official Methods of Analysis**. Arlington, Virginia USA, 1990. (Volume 1)

AUER, C. G. et al. Fungos em acículas da serapilheira de Floresta. **Floresta**, Curitiba, v. 36, n.3, p. 433–438, 2006.

AVALLONE, S. et al. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, Montpellier, v.37; p. 191–198, 2002.

BÅÅTH, E. A critical examination of the soil washing technique with special reference to the effect of the size of the soil particles. **Journal of Botany**, Canadian, v. 66, n. 8, p. 1566–1569, 1988.

BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*Coffea arabica L.*) como provável fonte de substâncias bioativas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Heidelberg: Springer (Chapter 21); **Food Chemistry**, Berlin, (4th ed.); 2009.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, Colney, v.18, p. 355–383, 2000.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento de fungos celulotícos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Piracicaba:Universidade de São Paulo ESALQ, 2011.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Athens, v. 254, n. 1, p. 248–25, 1976.

BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and microbial technology**, Curitiba, v. 27. n. 1-2, p.127–133, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862912>. Acesso em: 15 mar. 2015.

BRANDO, C. H. J. Cereja descascado, desmucilado, fermentado, despulpado ou lavado. **Congresso Brasileiro De Pesquisas Cafeeiras**; Rio de Janeiro: MAA/PROCAFÉ, 1999. p.342-346.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Informe Estatístico do Café. **Cafés do Brasil**, Brasília, v. 13; out. 2012.

BROOKES, P. C. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, Harpenden, v. 4, 1340–1351, 2010. doi:10.1038/ismej.2010.58

Carmo, J. R. do. **Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando resíduos do processamento do café (*Coffea arabica* L.).** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013.

CARVALHAL, F.; RODRIGUES, S. S.; BERCHEZ, F. A. **Mata Atlântica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2015.

CARVALHO, V. G. C. Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2012.

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

CHAKRADHAR, D.; JAVEED, S.; SATTUR, A. P. Studies on the production of nigerloxin using agro-industrial residues by solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Misore, v.36, p.1179–1187, 2009. doi:10.1007/s10295-009-0599-7

CHALUPOVÁ, J. et al. Identintification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, Olomouc, v. 32, p. 230–241, 2014. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.002

CHAVES, F. et al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annals of Microbiology**, Lavras, v. 65, n. 1,, fev., 2015. doi:10.1007/s13213-015-1050-0

CHELKOWSKI, J. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity*. New York: Elsevier, 1989. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=\\_1KeBQAAQBAJ&dq=fusarium&lr=&hl=pt-BR&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.br/books?id=_1KeBQAAQBAJ&dq=fusarium&lr=&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s)>. Acesso em: 23 maio 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira: Café. Brasília, 2013.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry: A review. **Journal of Food Engineering**, Vigo, v.76, n. 3, p. 291–302, 2006. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022

DAVIES, L. O. et al. Light Structures Phototroph , Bacterial and Fungal Communities at the Soil Surface. **PLoS ONE**, Coventry, v. 8, n. 7, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0069048

DELABONA, P. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

DIONISIO, F. G. et al. Aplicação de complexo enzimático lignocelulósico para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009. Maringá. **Anais...** Maringá, 2009..

DO, T. T. et al. Molecular characterization of a glycosyl hydrolase family 10 xylanase from *Aspergillus niger*. **Protein Expression and Purification**, Hanoi, v.92, n. 2, p. 196–202, 2013. doi:10.1016/j.pep.2013.09.011

DOMSCH, K. H.; GAMS, W. **Compendium of Soil Fungi**. 2.ed. London: Academic Press, 1980)

DUARTE, E. A. A. et al. Bioprospection of bacteria and yeasts from Atlantic Rainforest soil capable of growing in crude-glycerol residues. **Genetics and Molecular Research**, Ilhéus,, v.12, n. 4, p. 4422–4433, 2013.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna; CNPM/EMBRAPA, 1997. p. 269-292.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, San Pedro, v. 46, n.2, p. 488–495, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.028

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educ; 2004. p. 510-225.

GAUTAM, S. P. Cellulase production by *pseudomonas* sp . isolated from municipal solid waste compost. **International Journal of Academic Research**, Jabalpur, v.2, n.6, p.330–333, 2010.

GAUTHUO, B.; RANTALA, P.; MÄÄTTÄ, A. R. Coffee Industry Wastes. **Water Science Technology**; v. 24; n.7; p.53-60; 1991.

GHOSE, T. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, New Delhi , v.59, p.257–268, 1987.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. Forage fiber analyses. **Agricultural Research Service**, Ithaca, v. 379, 1970.

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



GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal.** Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 2010.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, Chennai, v. 38, p.987–996, 2003.

HALAL, S. L. M. **Composição , processamento e qualidade do café.** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2008.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da Floresta Amazônica e Otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana.** Rio de Janeiro:Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

HATAKKA, A. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science and technology**, Helsinki, v. 24; p. 23-63; 1990.

JAYACHANDRA, T.; VENUGOPAL, C.; ANU APPAIAH, K. A. Utilization of phytotoxic agro waste— Coffee cherry husk through pretreatment by the ascomycetes fungi *Mycotypha* for biomethanation. **Energy for Sustainable Development**, Karnataka, v.15, n.1, p.104–108, 2011. doi:10.1016/j.esd.2011.01.001

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes : A review. **Process Biochemistry**, Shimla, v. 40, p. 2931–2944, 2005. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026

JØRGENSEN, H. et al. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, Lyngby-Tårnbæk, v. 36, p. 42-48, 2005.

KASANA, R. C. et al. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram ' s Iodine. **Current Microbiology**, Palampur v. 57, n.5, p. 503–507, 2008. doi:10.1007/s00284-008-9276-8

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector : a review. **Bioresource technology**, Chandigarh , v. 77, p. 215–227, 2011.

KIDA, K; IKBAL, I.; SONODA, Y; Treatment of Coffee Waste by Slurry-state Anaerobic Digestion; **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Kumamoto v.73; n.5; 390-395p.; 1992.

KIRK, T.K.; CROAN, S.; TIEN, M.. Production of multiple ligninases by *phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme and Microbial Technology**, Madison, v. 8; p. 27-32; 1986.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Brasília, v.1, n. 1, p. 147–155, 2005.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, Cambridge, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE, S.; MOON, S. H. Electroenzyme oxidation of veratryl alcohol by lignina peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 102; p. 261–268; 2003.

LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Solid state cultivation – an efficient method to use toxic agro-industrial residues. **Journal Basic Microbiology**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 187–197, 2000.

LI, J. et al. Synergism of cellulase , xylanase , and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Guanzhou, v.155, p. 258–265, 2014. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.113

LIMA, M. V. et al. Preparo do café despulpado , cereja descascado e natural na região sudoeste da Bahia. **Revista Ceres**, Campo dos Goytacazes v.55, n. 2, p. 124–130, 2008.

LISBOA, C. C. **Vulnerabilidade da matéria orgânica do solo ao aumento de temperatura**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2008.

LO SCIUTO, D. Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase. Brasília: Universidade de Brasília, 2015.

MALTA, M. R. **Colheita e processamento do café**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2010. (Circular técnica 92).

MARTINS, P. A. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico**. Brasília: Universidade de Brasília, 2012.

MATIELLO, J. B. Ciclo Bienal de Produção de Café no Brasil. **Revista do Café**, Varginha; v. 89; n. 833; mar. 2010.

MEDEIROS, G. A. et al. Enzimas e líquidos iônicos: uma combinação promissora para um biodiesel limpo. **Revista Virtual de Química**, Brasília, v. 5, n.1, p. 74–94, 2013. doi:10.5935/1984-6835.20130008

MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. **EMBRAPA – Meio Ambiente**, Jaguariúna, v. 2; p. 304-319; 2008.

MERCK MILLIPORE. **Agar extracto de malte**. 105398 | Agar extracto de malte, 2014. Disponível em <[http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Agar-extracto-de-malte,MDA\\_CHEM-105398#documentation](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Agar-extracto-de-malte,MDA_CHEM-105398#documentation)>. Acesso em 26 jun. 2015.

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. **Research in Biotechnology**, Mubi, v. 2, n. 6, p. 21–26, 2011.

MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 3, n. 3, p.426–428, 1959.

MIRANDA, M. C. M. Produção de enzimas celulolíticas de fungo *Aspergillus ustus* isolados da Amazônia. In: Congresso de Iniciação Científica da UFAM, 17., 2012, Manaus. **Anais...** Manaus, 2012.

MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em Brasília / DF**. Brasília: Universidade de Brasília, 2014.

MOREIRA, L. R. de S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização , degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos**. Brasília: Universidade de Brasília, 2013.

MUSSATTO, S. I. **Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes**: In Industrial Waste. Portugal: InTech's Journals, 2012.

NIELSEN, U. N. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity – function. **European Journal of Soil Science**, Fort Collins, v. 62, p. 105–116, fev. 2011. doi:10.1111/j.1365-2389.2010.01314.x

O'BRIEN, H. E. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples †. **Applied and Environmental Microbiology**, Durham, v.71, n. 9, p. 5544–5550, 2005. doi:10.1128/AEM.71.9.5544

ODEGA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OKAMOTO et al. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the White rot fungus *Trametes hirsute*. **Enzyme and Microbial Technology**, Koyama-cho-Minami, v.48, p. 273-277, 2011.

OKINO, S. et al. Effects of Tween 80 on cellulase stability under agitated conditions. **Bioresource Technology**, Ibaraki, v. 142, p. 535–539, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.078

OLIVEIRA, M. M. E. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Institut Pasteur**, Rio de Janeiro, v. 166, p. 102–110, 2015. doi:10.1016/j.resmic.2014.12.008

ORMOND, J. G.; PAULA, S. R. L.; FAVEET FILHO, P. Café: (re)conquista dos mercados. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v.10, p. 3–56, set. 1999.

ORNELLAS, L. H. **Técnicas dietéticas**: seleção e preparo de alimentos. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

OROZCO, A. L. et al. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Madrid, v.81, n. 2, p. 247–252, 2008. doi:10.1016/j.jaap.2007.12.002

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

PANDA, A. et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. **Journal of Microbiological Methods**, New Delhi, 109, 93–105, 2015. doi:10.1016/j.mimet.2014.12.014

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Trivandrum, v. 13(July 2002), p. 81–84, 2003.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Curitiba, v. 77, n. 1, 149–162, 1999.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Trivandrum, v. 6, n. 2, p. 153–162, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959086>. Acesso em 15 jul. 2015.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, Curitiba, v. 35, p. 1153–1169, 2000.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Thessaloniki, v. 22, p. 189–259, 2004. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.09.005

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. de. Diversity of Microfungi in Tropical Soils. In MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Eds.). **Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems**. Wallingford: CABI Publishing, 2008.

PIMENTA, C.J. **Qualidade do café**. Lavras, MG: Editora UFLA, 2003.

PULLEMAN, M. et al. Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services — an overview of European approaches. **Environmental Sustainability**, Wageningen, v. 4, n. 10, p. 529–538, out. 2012. doi:10.1016/j.cosust.2012.10.009

RAY, M. J. Brown rot fungal early stage decay mechanism as a biological pretreatment for softwood biomass in biofuel production; **Biomass and Bioenergy**, London, v. 34, p. 1257-1262, 2010.

ROBERTI, R. et al. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Science**, Bologna, v.175, p. 339–347, 2008. doi:10.1016/j.plantsci.2008.05.003

ROBI, D. et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, São Paulo, v. 13, n. 94, p. 1-12, 2013.

ROUSSOS, S. et al. Biotechnological management of coffee pulp – isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degradation fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Appl. Microbiology Biotechnology**, Montpellier, v.42, p. 756–762; 1995.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORSNISELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, Rio Claro, v. 27, n. 2, p. 205–211, 2004.

SAENGER, M. Combustion of coffee husks. **Renewable Energy**, Hamburg, v. 23, n. 1, p. 103–121, 2001. doi:10.1016/S0960-1481(00)00106-3

SAHA, B. (2003). Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiology Biotechnology**, Peoria, v.30, p. 279–291, 2003.

SALES, M. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Recife, 45(11), 1290–1296, 2010.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K. N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource technology**, Xalapa v. 96, n. 5, p. 537–44, 2005. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.019

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Tlaxcala, v.27, n. 2, p.185–194, 2009. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Recife, v. 108, p. 375–385, 2010. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x

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

SANTOS, S. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SEHNEM, N. T. et al. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Applied Microbial and Cell Physiology**, Caxias do sul, v. 76, p. 163–167, 2006. doi:10.1007/s00253-005-0251-z

SHRESTHA, P. et al. Systematic Search for Cultivable Fungi That Best Deconstruct Cell Walls of Miscanthus and Sugarcane in the Field. **Applied and Environmental Microbiology**, Berkeley, v.77, n. 75, p. 5490–5504, 2011. doi:10.1128/AEM.02996-10

SILVA, C. O. G. *Emericella nidulans* e bagaço de cana-de-açúcar: ferramentas para produção de endo- $\beta$ -1. Brasília:Universidade de Brasília, 2014.

SILVA, J. P. da. **Caracterização da Casca de Café (*coffea arábica*, L) in natura, e de seus Produtos Obtidos pelo Processo de Pirólise em Reator Mecanicamente Agitado** **Caracterização da Casca de Café (*coffea arábica*, L) in natura, e de seus Produtos Obtidos pelo Proc.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

SILVA, F. C. et al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annual Microbiology**, Lavras, v. 65, n. 2, fev. 2015. doi:10.1007/s13213-015-1050-0

SIQUEIRA, F. G. **Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases** Félix Gonçalves de Siqueira. Brasília:Universidade de Brasília, 2010.

SOUSA, T. M. M. **Regulação transcricional de genes de hidrolases em fungos filamentosos: sistemas PacC / CreA em *Hemicella grisea* var. *thermoidea* e sistema Xyr1 em *Trichoderma reesei***. Brasília: Universidade de Brasília, 2012.

SOUZA, A. L. de et al. Composição Químico - Bromatológica da Casca de Café Tratada com Amônia Anidra e Sulfeto de Sódio. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 983–991, 2001.

SPROCATI, A. R. et al. Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils. **Environmental Science Pollution Research**, Rome, v. 21, p. 6824–6835, 2014. doi:10.1007/s11356-013-1907-3

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied and Environmental Microbiology**, Ontario, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, Tartu v. 346, n. 6213, p. 1078–1090, 2014. doi:10.1126/science.aaa1185

TORSVIK, V.; ØVREAS, L. Microbial diversity and function in soil : from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Bergen, v. 5, p. 240–245, maio 2002.

TRESENDER, K. K.; HOLDEN, S. R. Fungal Carbon Sequestration. **Science**, Irvine, v. 339, p.1528 – 1529, 2013.

VISAGIE, C. M. et al. Aspergillus, Penicillium and Talaromyces isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology**, Utrecht , v. 78, p. 63–139, 2014. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.002

WAGG, C. et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **PNAS**, Zürich , v. 111, n. 14, p. 5266–5270, 2014. doi:10.1073/pnas.1320054111

WALL, D. H. et al. **Soil Ecology and Ecosystem Services**. Unites Kingdom: Oxford United Press, 2013.

WARDLE, D. A.; LINDAHL, B. Disentangling global soil fungal diversity. **Science**, Umeå, v. 346, n. 6213, p.1052–1053, 2014.

WARREN, R. A. J. Microbial hidrolisis of polysaccharides. **Annual Reviews Microbiology**, Vancouver, v. 50, p. 183–212, 1996.

WRAY, W. Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, Houston, v.118, p. 197–203, 1981.

XIMENES, E. A.; FELIX, C. R.; ULHOA, C. J. Production of Cellulases by *Aspergillus fumigatus* and Characterization of One  $\beta$ -Glucosidase. **Current Microbiology**, Brasília, v. 32, p. 119–123, 1996.

YADAV, S. et al. Pectin lyase : A review. **Process Biochemistry**, Gorakhpur , v. 44, p. 1–10, 2009. doi:10.1016/j.procbio.2008.09.012

ZHANG, Y. P.; HIMMEL, M. E. MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement : Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Blacksburg, v.24, p. 452–481, 2006. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.03.003

ZHOU, Y. et al. Soil fungal diversity in three nature reserves of Jiuzhaigou. **Annual Microbiology**, Chengd, v. 64, p. 1275–1290, 2014. doi:10.1007/s13213-013-0772-0

## CAPÍTULO 2

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS A PARTIR DE SOLO PARA SCREENING ENZIMÁTICO****RESUMO**

Os solos são ambientes complexos, hospedeiros de uma enorme biodiversidade. Sua microbiota compreende vários grupos taxonômicos, dentre eles: bactérias, cianobactérias, fungos micorrízicos, micoparasitas, patógenos de plantas e insetos, cuja principal função é a degradação da matéria orgânica. A bioprospecção é uma ferramenta útil para descoberta de novos microrganismos aplicáveis no mercado industrial biotecnológico. O objetivo deste capítulo foi realizar a bioprospecção de fungos filamentosos em solos de diferentes fragmentos florestais da Represa do Funil, no município de Lavras – MG. A técnica utilizada para o isolamento dos fungos foi a lavagem de solo e cultivo de partículas. No total, 55 fungos foram isolados e todos passaram por screening de atividade enzimática para celulasas e xilanases, através do teste de índice enzimático revelado por solução de Lugol. Os isolados I54, I33, I36, I2, I5, I4, I38, I53, I59, I47, I35, I37, I22 e I31 apresentaram as melhores atividades enzimáticas. Os isolados foram identificados por MALDI-TOF e morfologia do micélio vegetativo, sendo encontrados entre eles, os gêneros *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Clonostachys* e *Fusarium*.

**Palavras-chave:** Bioprospecção, Lavagem de solo, MALDI-TOF, Biodiversidade do solo.



## CHAPTER 2

### BIOPROSPECTING FILAMENTOUS FUNGI FROM SOIL FOR ENZYMATIC SCREENING

#### ABSTRACT

Soils are complex environments hosts a huge biodiversity. The microbiota comprises several taxonomic groups, including bacteria, cyanobacteria, mycorrhizal fungi, mycoparasite, plant pathogens and insects, with major degradation function of organic matter. Bioprospecting is a useful tool for discovering new microorganisms applied in biotechnological industrial market. The objective this chapter was realize the bioprospecting of filamentous fungi of soil organic matter from forest fragments of the Represa do Funil, in Lavras - MG. The technique used for the isolation of fungi was the washing and particulate cultivation soil. In overall, 55 fungi were isolated and all have undergone screening of enzyme activity to cellulase and xylanase enzyme through the index test revealed by Lugol solution. The isolated I54, I33, I36, I2, I5, I4, I38, I53, I59, I47, I35, I37, I22 and I31 showed the best enzymatic activities. The isolates were identified by MALDI-TOF and morphology of the vegetative mycelium, and the *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Clonostachys* and *Fusarium* found among them.

**Keywords:** Bioprospecting, soil washing, MALDI-TOF, soil biodiversity.

## 1 INTRODUÇÃO

Os solos têm um papel importante no desenvolvimento do sistema terrestre, constituídos de materiais notáveis, extraordinariamente diversos entre compostos orgânicos e minerais. Estes compostos formam uma complexa organização espacial de redes de poros que afetam seu funcionamento, regulando gases, líquidos, solutos, partículas e organismos que podem se movimentar através de sua matriz. A rede de poros também fornece uma ampla taxa de nichos que resulta em níveis extremos da biodiversidade, às vezes excedendo a que ocorre na superfície do solo. (WALL et al., 2013)

Solos são hospedeiros de uma enorme biodiversidade, em termos de abundância, números de espécies e funções de organismos (PULLEMAN et al., 2012). Foi estimado que 1g de solo contém mais de 1 bilhão de células bacterianas que consiste em milhares de táxons, mais de 200 milhões de hifas fúngicas e uma ampla taxa de cupins, protozoários, nematoides, minhocas e artrópodes. (WAGG et al., 2014)

A biota presente no solo é essencial para muitos processos e funções, incluindo a liberação de exopolissacarídeos, reciclagem de nutrientes, formação da estrutura, regulação de pragas e biorremediação de contaminantes (PULLEMAN et al., 2012).

As medidas de propriedades e características da biodiversidade em solos variam consideravelmente, mas podem ser atribuídas a três grandes grupos: relacionados à decomposição (tais como a perda de massas das folhas da liteira ou madeiras ao longo do tempo), relacionados à respiração (fluxos de CO<sub>2</sub> isolados ou em resposta a adição de nutrientes) ou relacionados à biota (tais como a biomassa ou abundância de vários organismos como microrganismos, nematoides ou artrópodes), portanto referidas como decomposição, respiração e biota, respectivamente. (NIELSEN et al., 2011)

A microbiota dos solos compreende vários grupos taxonômicos, dentre eles: bactérias, cianobactérias, fungos micorrízicos, micoparasitas, patógenos de plantas e insetos (DAVIES et al., 2013; WAGG et al., 2014). A principal função desses organismos no solo é a degradação da matéria orgânica, tendo papel importante na degradação da celulose, lignina,

sacarose, glicina e compostos fenólicos. (AUER et al., 2006; NIELSEN et al., 2011)

Bioprospecção é descrita como a pesquisa por materiais biológicos naturalmente ocorrentes, especialmente em ambientes extremos ou com grande biodiversidade (SPROCATI et al., 2014). Uma vez que menos de 1% dos microrganismos observados ao microscópio são cultiváveis e conhecidos (TORSVIK & ØVREAS, 2002). Processos como a bioprospecção fazem-se necessários, tanto para conhecimento da biodiversidade quanto para aplicações biotecnológicas.

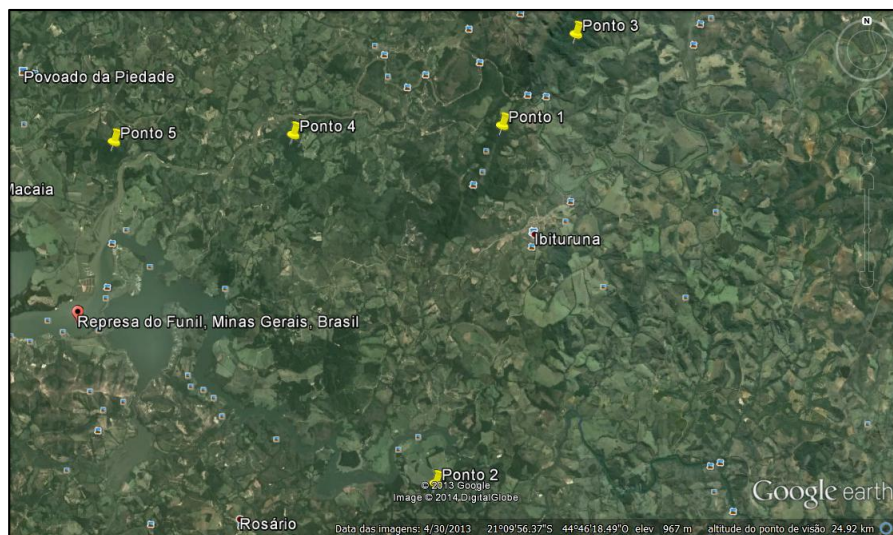
Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos da bioprospecção de fungos filamentosos em solos para screening enzimático de celulasas e xilanases, presentes em altos índices neste ambiente.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento dos fungos filamentosos

Na bioprospecção realizada em abril de 2014, os fungos analisados foram isolados da camada superficial de matéria orgânica do solo, retirada de fragmentos de transição entre os domínios do Cerrado e florestas semidecíduas montanas, presentes em cinco fragmentos florestais da Represa do Funil, no município de Lavras – MG.

A escolha dos fragmentos foi realizada a partir da diversidade vegetal apresentada, em diferentes localidades, com possível distinção de solos.



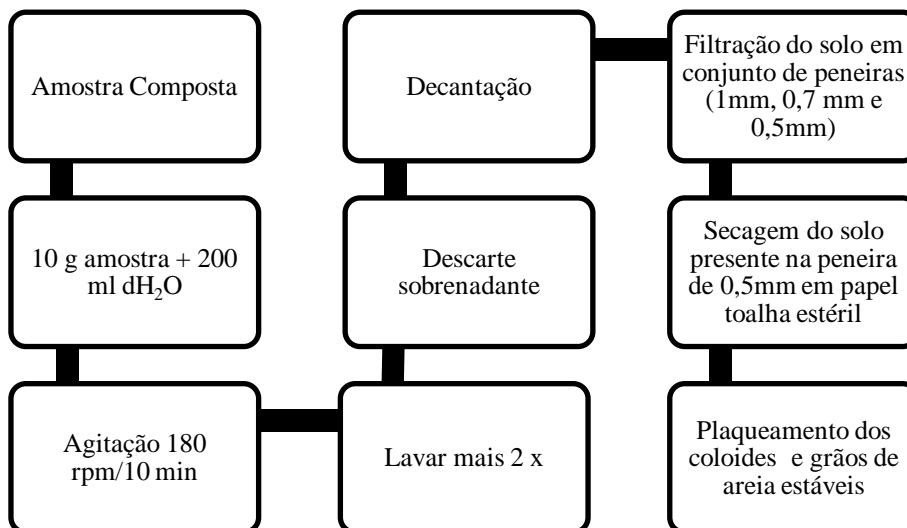
**Figura 8 Localização pontos de coleta de solo.**

Em cada fragmento, conforme figura 8, oito amostras foram coletadas de maneira aleatória entre as áreas selecionadas no campo. As amostras de solo foram combinadas, formando uma amostra composta por fragmento.

O isolamento foi realizado pela técnica de lavagem de solo descrita por Pfenning e Abreu (2008), onde os coloides estáveis e os grãos de areia foram cuidadosamente retirados da última peneira e secos em papel toalha estéril e transferidos (sete partículas por placa) para três placas de Petri, contendo meio malte 2%, acrescido de estreptomicina (50mg/l) e ciclosporina (10mg/l) e meio DRBC. Essas placas foram incubadas a temperaturas de 20°C, 28°C e 36°C em estufa de demanda de oxigênio

(BOD), durante 30 dias para crescimento total de todos os fungos. O isolamento foi realizado diariamente durante este período.

As colônias de fungos filamentosos que se desenvolveram nesse processo foram transferidas para placas de Petri em meio malte 2% e incubadas às temperaturas de 20°C, 28°C e 36°C até esporulação.



**Figura 9 Fluxograma da técnica de lavagem de solo e cultivo de partículas**

### 2.1.2 Manutenção celular

A manutenção rotineira dos fungos isolados foi realizada por meio de repiques periódicos (em média a cada três meses) em placas de Petri, contendo meio malte 2%, mantidas sob refrigeração. Para manutenção prolongada, uma suspensão de esporos em solução salina estéril (NaCl 9 g/L + 20% de glicerol) foi realizada.

### 2.2 Avaliação prévia da atividade celulolítica dos isolados em meio com Lugol

Os fungos isolados em ambos os meios foram inoculados no meio descrito por Nogueira e Cavalcanti (1996) (3 g/L de Na NO<sub>3</sub>, 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g/L de KCl, 10 mg/L Fe SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10 g/L CMC, 20 g/L de ágar) para *screening* de seleção celulolítica e xilanolítica (havendo substituição de CMC por xilana).

Após o crescimento em BOD por quatro dias à respectiva temperatura de origem, foi avaliada a atividade celulolítica e xilanolítica através da metodologia de Kasana et al (2008).

Os halos de degradação foram utilizados para cálculo do índice enzimático, de acordo com Teather e Wood (1982). Através deste, foram selecionadas as cepas com índice enzimático acima de 1,20/celulases e 1,15/xilanases para seguimento do trabalho.

### **2.3 Identificação proteômica dos isolados por MALDI-TOF**

Todos os isolados obtidos na bioprospecção foram identificados utilizando o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) – Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper<sup>TM</sup>, seguindo a metodologia, com adaptações, descrita por CHAVES et al. (2015).

Os fungos desenvolvidos em 48 horas, ou até obtenção de micélio vegetativo, tiveram uma pequena amostra de seu micélio (aproximadamente 1µg) retirada e transferida para um eppendorf, contendo 6µl da solução orgânica (água/acetonitrila/ ácido trifluoroacético [50:47,5:2,5]) homogeneizada em vórtex por 1 minuto. Em seguida, 0,5 µl dessa suspensão foi transferida para a placa de aço inox do MALDI, e adicionado, cuidadosamente, 1µl da solução matriz (75 mg/ml de ácido 2,5-di-hidroxibenzoico em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético). Todas as amostras da placa foram secas à temperatura ambiente para posterior análise em sistema Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen Alemanha). As análises foram realizadas em triplicata, para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros.

Os espectros gerados no intervalo de massa  $m/z = 2000$  a  $20000$  foram obtidos e analisados no software Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics).

### **2.4 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software *RStudio*. Os dados foram submetidos à Análise de Correspondência Multivariada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Isolamento dos fungos filamentosos

A tabela apresentada como anexo I exhibe os fungos isolados pela técnica de lavagem dos solos dos cinco fragmentos de diferentes biomas, nos dois meios de cultura avaliados.

A estimativa da diversidade de fungos do solo depende do método utilizado para retirada destes do seu ambiente. O método de diluição e plaqueamento é o mais comumente utilizado para isolamento e quantificação de bactérias e fungos do solo, por ser uma técnica simples que apresenta bons resultados. A técnica de lavagem do solo é uma opção que privilegia o isolamento de fungos que estão crescendo ativamente nas partículas de solo, em detrimento daqueles que estão presentes, sob a forma de grandes quantidades de esporos. Através desta técnica, após sucessivas lavagens das amostras do solo e descarte do sobrenadante, o excesso de esporos é eliminado, favorecendo aqueles fungos que apresentam dificuldade de esporulação e crescimento mais lento (PFENNING; ABREU, 2008).

Os métodos tradicionais de isolamento de fungos em solo envolvem taxa de respiração, ciclagem de nutrientes, decomposição de materiais orgânicos (NIELSEN et al., 2011), porém nestes métodos, assim como no método de diluição seriada e plaqueamento, os fungos produtores de grandes quantidades de esporos e de rápido crescimento tendem a ser isolados em meios de cultura ricos em nutrientes (BÅÅTH, 1988; PFENNING; ABREU, 2008). Muitos fungos possuem requerimentos específicos de crescimento, taxas metabólicas limitadas que impossibilitam a esporulação em placa ou mesmo seu crescimento, que em métodos tradicionais atrapalham seu isolamento (O'BRIEN et al., 2005; ZHOU et al., 2014). Baseado nestes fatos, novos métodos para isolamento têm sido desenvolvidos. Shrestha et al. (2011) utilizaram a técnica de diluição até esgotamento em microplaca para isolar fungos degradadores da parede celular de *Miscanthus sp* e cana de açúcar, obtendo 950 UFC's degradadores das 4.560 UFC's de fungos não produtores de esporos abundantes e de crescimento rápido. A técnica de lavagem do solo foi utilizada por Carvalho (2012) para avaliar a diversidade fúngica na Mata Atlântica, a partir de 2.500 partículas de solo obteve 1.829 UFC's e 142 espécies de fungos pertencentes a 67 gêneros.

Os meios de cultura malte 2% e DRBC utilizados para isolamento dos fungos são meios seletivos para o crescimento de fungos filamentosos e leveduras. O meio DRBC (Dicloran Rosa Bengala Clortetraciclina) possui, em sua formulação rosa de bengala que suprime o crescimento de bactérias, discerne colônias de leveduras, quando em ausência de luz e juntamente com o Dicloran, restringe o tamanho das colônias de fungos filamentosos. O antibiótico cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias (ACUMEDIA, 2014). O meio malte 2% é composto por extrato de malte que apresenta em sua constituição carboidratos complexos oriundos do malte germinado; acrescido de ciclosporina, diminui a taxa metabólica de fungos filamentosos, ocasionando a redução no tamanho de suas colônias e, em consórcio com o antibiótico estreptomicina, inibe o crescimento de bactérias (MERCK MILLIPORE, 2014).

As leveduras são fungos unicelulares, que sendo parte pertencente da comunidade do solo (DUARTE et al., 2013) e os meios utilizados neste procedimento de bioprospecção serem seletivos para fungos, não poderiam deixar de serem notadas durante a triagem inicial dos fungos filamentosos. A tabela a seguir apresenta a biodiversidade geral de fungos (filamentosos e leveduras), dada em UFC's por fragmento e temperatura.

**Tabela 2 Biodiversidade relativa à temperatura de 36°C**

	<b>Meio DRBC</b>		<b>Meio Malte 2%</b>	
<b>Fragmento 1</b>	11 FF	22 LEV	146 FF	20 LEV
<b>Fragmento 2</b>	29 FF	10 LEV	39 FF	22 LEV
<b>Fragmento 3</b>	27 FF	12 LEV	96 FF	12 LEV
<b>Fragmento 4</b>	15 FF	12 LEV	17 FF	87 LEV
<b>Fragmento 5</b>	13 FF	27 LEV	6 FF	3 LEV

(FF) Fungos filamentosos (LEV) Leveduras. Obs.: Dados relativos à triplicatas biológicas



**Tabela 3 Biodiversidade relativa à temperatura de 28°C**

	<b>Meio DRBC</b>		<b>Meio Malte 2%</b>	
<b>Fragmento 1</b>	39 FF	13 LEV	46 FF	4 LEV
<b>Fragmento 2</b>	43 FF	0 LEV	64 FF	5 LEV
<b>Fragmento 3</b>	96 FF	6 LEV	51 FF	5 LEV
<b>Fragmento 4</b>	44 FF	3 LEV	30 FF	9 LEV
<b>Fragmento 5</b>	49 FF	19 LEV	57 FF	1 LEV

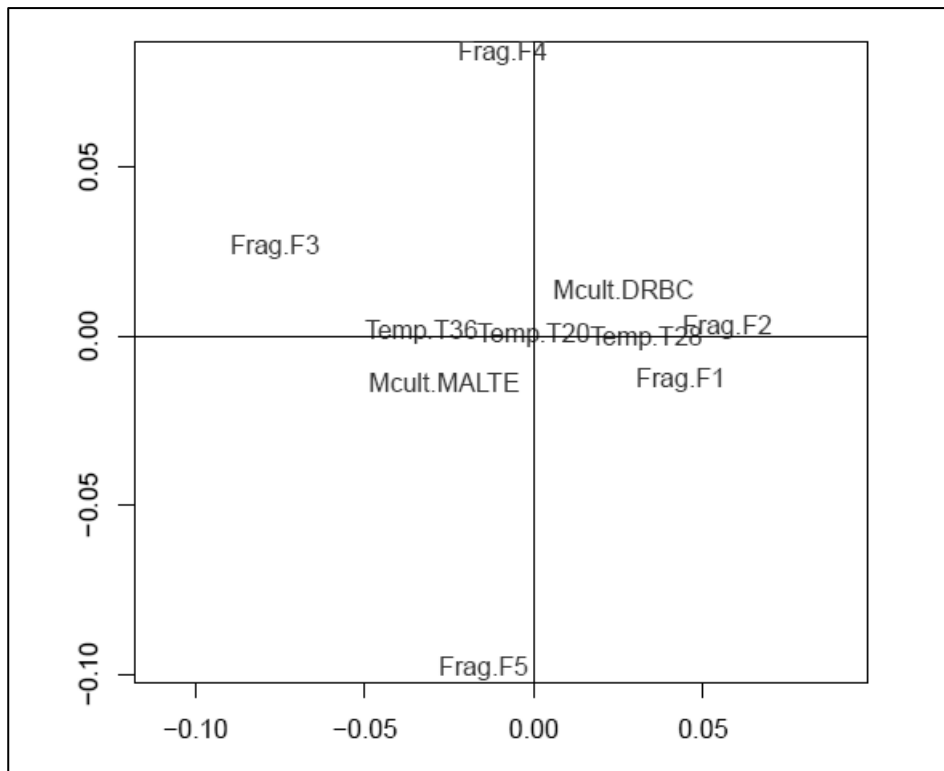
(FF) Fungos filamentosos (LEV) Leveduras. Obs.: Dados relativos à triplicatas biológicas

**Tabela 4 Biodiversidade relativa à temperatura de 20°C**

	<b>Meio DRBC</b>		<b>Meio Malte 2%</b>	
<b>Fragmento 1</b>	57 FF	0 LEV	52 FF	14 LEV
<b>Fragmento 2</b>	66 FF	0 LEV	80 FF	2 LEV
<b>Fragmento 3</b>	38 FF	0 LEV	47 FF	0 LEV
<b>Fragmento 4</b>	33 FF	0 LEV	62 FF	1 LEV
<b>Fragmento 5</b>	25 FF	0 LEV	33 FF	1 LEV

(FF) Fungos filamentosos (LEV) Leveduras. Obs. 1: Dados relativos à triplicatas biológicas. Obs. 2: Apesar das leveduras terem sido contabilizadas elas não fizeram parte dos dados analisados pela análise estatística.

A biodiversidade fúngica do solo esteve, por muito tempo, ligada à biodiversidade vegetal, porém Tedersoo et al., (2014) verificaram que os fatores climáticos seguidos de padrões edáficos e espaciais são os fatores que influenciam direta e indiretamente na riqueza e composição da comunidade fúngica em escala global, exceto quando há simbiose entre raízes e ectomicorrizas. A análise de correlação multivariada (ACM) nos ajuda a entender o padrão da influência da temperatura e dos meios sobre os fragmentos deste experimento. O gráfico a seguir apresenta tais interações.



**Figura 10 Bigplot da influência da temperatura, meios de cultura e fragmentos pela análise de correlação (AC).**

Após análise detalhada, verificamos que os isolados obtidos a partir do fragmento 3 são influenciados pela temperatura de 36°C e pelo meio malte 2%. Esse fragmento corresponde a uma parcela de Mata Atlântica fechada.

A Mata Atlântica é uma Floresta Tropical que abriga uma rica biodiversidade vegetal e animal. Possui condições edafoclimáticas peculiares de sua natureza, como solos geralmente rasos, com pH ácido, pouca ventilação e luminosidade, além de umidade intensa ocasionada pelo alto índice pluviométrico apresentado com médias anuais entre 1.800 e 3.600 mm/ano (CARVALHAL; RODRIGUES; BERCHEZ, 2015). Essas características tornam este bioma propício para o crescimento e manutenção de uma comunidade fúngica consistente. Wardle e Lindahl (2014) comprovaram que a riqueza fúngica de um ambiente está diretamente relacionada a sua média de precipitação anual. Segundo Carvalho (2012) a influência da pluviosidade pode ser através das mudanças nas propriedades do solo, como a umidade ou então, por lixiviação de nutrientes do solo.

A decomposição da matéria orgânica depende de fatores abióticos como a temperatura e umidade para ciclagem de carbono e nutrientes (NIELSEN et al., 2011). Durante o mecanismo de degradação dos compostos orgânicos, a temperatura está intrinsecamente ligada à decomposição e é um dos fatores que a controlam. Segundo Lisboa (2008) a matéria orgânica do solo está distribuída em frações com diferentes sensibilidades à temperatura, sendo a fração de carbono mais velha e recalcitrante menos sensível a ela. As altas temperaturas podem modificar a estrutura da comunidade microbológica e interferir no processo de decomposição, através de alterações nos seus mecanismos de proteção. Portanto, microrganismos adaptados a elas conseguem melhorar seu processo de decomposição e em alguns casos, como neste, obterem maiores vantagens frente a outros microrganismos adaptados a temperaturas menores.

Os fungos são geralmente acidófilos (em relação às bactérias), Brookes et al. (2010) realizaram um estudo para testar se as comunidades bacterianas são mais afetadas pelo pH do solo, que as comunidades fúngicas, através da técnica de pirosequenciamento e confirmaram que a influência do pH do solo na comunidade fúngica teve menos efeitos que na comunidade bacteriana. Tedersoo et al. (2014) também comprovaram que fungos saprófitas (3,8%), fitopatogênicos (2,8%), leveduras (11,7%) e fungos ectomicorrízicos (0,7%) têm sua comunidade afetada substancialmente pelo pH do solo e latitude em que se encontram. O meio malte 2% apresenta pH ácido (5,0) semelhante ao pH encontrado nos solos da Mata Atlântica, ou seja, próximo às condições naturais de seu ambiente nativo.

Os fragmentos 1 e 2 são parcelas de Mata de transição secundária e Mata de transição Cerrado/Cerradão, respectivamente. As características desse tipo de bioma suportam os resultados apresentados pela análise de correspondência, ou seja, a influência da temperatura de 28°C e o meio DRBC sobre os fungos isolados desses fragmentos.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro superado apenas pela Amazônia. Possui a mais rica flora dentre as savanas mundiais (>7.000 espécies), com alto índice de endemismo. A fauna é igualmente grande, embora a incidência de mamíferos seja relativamente pequena. O clima é estacional, onde o período chuvoso é seguido por um período de seca. A

precipitação média anual é de 1.500 mm e as temperaturas são geralmente amenas, entre 22 e 27°C. Os solos são muito antigos, intemperizados, ácidos, depauperados de nutrientes, mas que possuem elevadas concentrações de alumínio. A grande quantidade de alumínio facilita os incêndios florestais que são comuns nos períodos de seca (KLINK; MACHADO, 2005). Em estudo realizado por Tresender e Holden (2013) afirmam que os incêndios florestais diminuem a abundância de fungos ectomicorrízicos e que a redução dessa abundância fúngica pode persistir por vários anos.

Os isolados dos fragmentos 4 e 5 não apresentaram qualquer influência de temperatura ou meio de cultura. Tratam-se de parcelas de Matas de Transição primária com alta ação antropogênica como culturas agrícolas (fragmento 4) e criação de gado (fragmento 5). Sabe-se que em solos degradados há um declínio da biodiversidade mundial, seja ela, vegetal, animal ou microbiológica (NIELSEN et al., 2011). Os impactos gerados ao solo são uma preocupação para os organismos, bem como para numerosas funções do ecossistema como aquisição de nutrientes pelas plantas, a ciclagem de recursos entre comunidades acima e abaixo do solo, retenção de água pelo solo (WAGG et al., 2014).

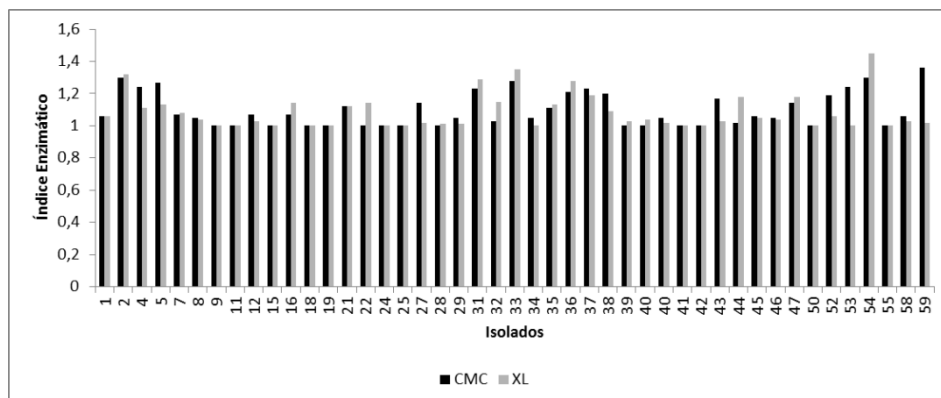
Microrganismos decompositores de matéria orgânica têm sido utilizados como bioindicadores através de modificações na quantidade de biomassa lignocelulósica (littera), suas estruturas (corpos de frutificação) e atividade metabólica (PULLEMAN et al., 2012). Torsvik e Øvreas (2002) utilizaram a diversidade catabólica para investigar os efeitos do estresse e distúrbio na diversidade e resiliência das comunidades microbianas do solo; aquelas com baixa uniformidade catabólica eram mais resistentes ao estresse e aos distúrbios (presentes em culturas agrícolas) do que aquelas com alta uniformidade catabólica (presente em pastos).

Quando se estuda a biodiversidade de solos é difícil aplicar os fatores responsáveis pelo aumento ou decréscimo do número de isolados obtidos, uma vez que os fatores bióticos e abióticos estão intimamente relacionados em um ambiente complexo como é o solo.

### **3.2 Avaliação das atividades enzimáticas**

Todos os 55 isolados obtidos foram testados quanto à produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

O índice enzimático de cada isolado foi construído a partir da divisão do tamanho do halo de degradação, formado na placa pelo tamanho da colônia do fungo. O gráfico a seguir apresenta os índices enzimáticos de cada isolado para CMCase e xilanase.



(\*) Valores relativos às médias das duplicatas

**Figura 11 Índice enzimático para CMCCase e xilanase de isolados**

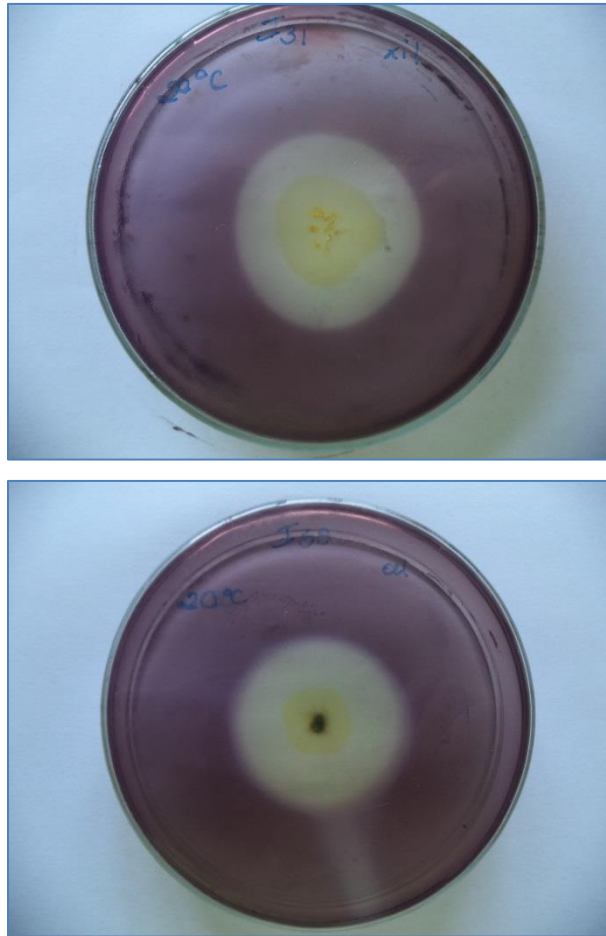
Todos os isolados apresentaram atividades enzimáticas de celulase e xilanase.

Os isolados que apresentaram bons índices enzimáticos para ambas as enzimas testadas foram: I54 (1,30 para CMC e 1,45 para XIL), I33 (1,28 para CMC e 1,35 para XIL), I36 (1,21 para CMC e 1,28 para XIL) e I2 (1,30 para CMC e 1,32 para XIL).

Os isolados que apresentaram bons índices enzimáticos para CMCCase foram: I5 (1,27), I4 (1,24), I38 (1,20), I53 (1,24), I59 (1,36).

Os isolados que apresentaram bons índices enzimáticos para xilanase foram: I47 (1,18), I35 (1,13), I37 (1,19), I22 (1,14) e I31 (1,29).

Os isolados I19, I18, I50, I25, I11, I39, I42, I24, I41 e I15 apresentaram baixo índice enzimático, porém foram bons produtores enzimáticos, devido à degradação de todo o substrato presente no meio. Em contraste a esse fato, alguns isolados apresentaram pequenos tamanhos de colônia e índices consideráveis. O mesmo resultado foi obtido por Ruegger e Tauk-Torsnisielo (2004) podendo-se concluir que o índice enzimático não corresponde a um parâmetro enzimático confiável para comparar as atividades entre diferentes linhagens.



**Figura 12 Halos de degradação xilanolítica e celulolítica**

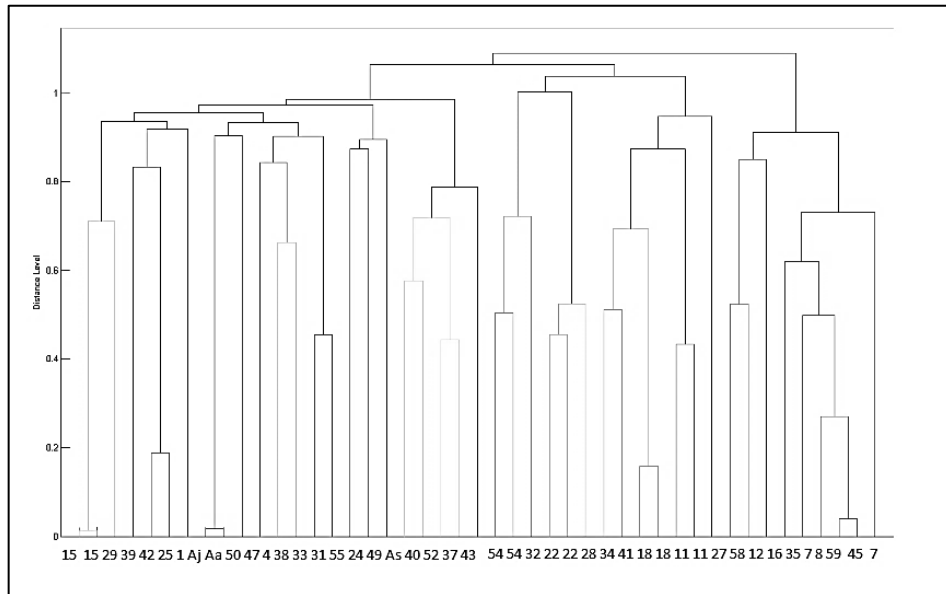
### **5.3 Identificação proteômica por MALDI-TOF**

A espectrometria de massa de matriz assistida a laser por ionização/dessorção por tempo de voo (MALDI-TOF) tem surgido como uma ferramenta confiável para uma rápida e fácil identificação, diferenciação e classificação de microrganismos. Opera com um único perfil de espectrometria de massa (*fingerprints*) adquirido pela dessorção de proteínas ribossomais específicas, altamente preservadas que atuam como biomarcadores particulares ( OLIVEIRA et al., 2015; CHALUPOVÁ et al., 2014).

Dos 55 isolados encontrados durante a bioprospecção, 39 foram submetidos ao processo de identificação proteômica por MALDI-TOF. Os 16 isolados não identificados pertencem a réplicas e a isolados que perderam a viabilidade durante o processamento. Carvalho (2012) também teve perda de isolados durante seu processo de identificação. Esse fato foi explicado por

Torsvik e Øvreas (2002), eles afirmaram que menos de 1% dos isolados conseguem se manter *in vitro* por muito tempo.

Ao final das identificações, um dendrograma filogenético e de agrupamento é gerado para identificação e demonstração do grau de parentesco entre as espécies (SANTOS et al, 2010). O dendrograma a seguir foi obtido a partir das identificações dos 39 isolados.



**Figura 13 Dendrograma dos isolados**

Os isolados fúngicos do presente estudo não obtiveram *score* satisfatório (entre 2.000 e 20.000) para uma identificação confiável, porém a geração dos espectros e dendrograma elucidam a diversidade de gêneros presentes nos solos. Em estudo Santos et al. (2010) afirmam que a identificação de fungos decompositores de madeira é geralmente problemática. Desse modo, sendo os isolados deste trabalho, fungos degradadores de matéria orgânica, o banco de dados utilizado não apresentou cepas referência que pudessem identificá-los, portanto são necessários outros métodos de identificação molecular, bioquímica ou morfológica.

A validação da identificação por MALDI-TOF pode ser realizada através de cepas referência contidas nos bancos de dados e micotecas (SANTOS et al., 2010). Será necessário realizar a conferência dos espectros gerados neste estudo com outros bancos de dados (particulares ou de outras instituições) que não aquele utilizado.

Os isolados que obtiveram os melhores índices enzimáticos para celulase e xilanase descritos no item acima (5.2) foram identificados por metodologia morfológica do micélio vegetativo (macroscópica e microscópica), no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos – Departamento de Fitopatologia/UFLA. A tabela a seguir apresenta a identificação morfológica dos melhores produtores enzimáticos.

**Tabela 5 Identificação morfológicas melhores produtores enzimáticos**

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>
<b>I38</b>	<i>Talaromyces spp.</i>
<b>I36</b>	<i>Fusarium solani</i>
<b>I59</b>	<i>Aspergillus spp.</i>
<b>I35</b>	<i>Aspergillus spp.</i>
<b>I4</b>	<i>Talaromyces spp.</i>
<b>I31</b>	<i>Clonostachys rosea</i>
<b>I33</b>	<i>Clonostachys rosea</i>
<b>I47</b>	<i>Fusarium spp.</i>

As espécies identificadas podem ser consideradas como tipicamente do solo, envolvidas na decomposição da matéria orgânica (DOMSCH; GAMS, 1980).

Os gêneros *Aspergillus* e *Talaromyces* pertencem à família Eurotiomycetes, estão frequentemente associados a alimentos e são de extrema importância na indústria (VISAGIE et al., 2014). O gênero *Fusarium* é característico por ser um saprófita comum dos solos, patógeno de cereais em todos os seus estágios de desenvolvimento e grande produtor de micotoxinas (CHELKOWSKI, 1989). O fungo *Clonostachys rosea* é um saprófita mundial, fitopatogênico e agente de biocontrole de outros fungos, como *Fusarium culmorum* (ROBERTI et al., 2008). Essas espécies foram relatadas com grande frequência em outros estudos de bioprospecção de solos, DELABONA (2011) verificou a presença de cepas de *Aspergillus* e *Talaromyces* em bioprospecção por fungos celulolíticos nos solos Amazônicos. Ruegger e Tauk-Torsnisielo (2004) e Carvalho (2012) relataram a presença dessas e várias outras espécies em bioprospecção por fungos celulolíticos em solos de Mata Atlântica com pouca e relativa ação antropogênica, respectivamente.



## **6 Considerações finais**

A bioprospecção de fungos filamentosos em solos com grande quantidade de matéria orgânica em decomposição é uma ferramenta útil para encontrar bons produtores de celulases e xilanases, com possíveis aplicações à indústria biotecnológica. A divergência de biomas com suas características edafoclimáticas e vegetais atuam diretamente sobre a biodiversidade desses ambientes.

## **7 Perspectivas futuras**

1. Testar outros métodos de isolamento de fungos a partir do mesmo solo para comparação da biodiversidade.
2. Identificar todos os isolados por metodologia morfológica e molecular para validar a identificação por MALDI-TOF.

## REFERÊNCIAS

ACUMEDIA, C. Drbc agar (7591). **NEOGEN Corporation**, Lansing, p. 6–7, Nov. 2014.

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, Winnipeg, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.005

ANDRADE, K. **Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir da casca e borra de café (*Coffea arabica L.*)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

AOAC. **AOAC: Official Methods of Analysis**. Arlington, Virginia USA, 1990. (Volume 1)

AUER, C. G. et al. Fungos em acículas da serapilheira de Floresta. **Floresta**, Curitiba, v. 36, n.3, p. 433–438, 2006.

BÅÅTH, E. A critical examination of the soil washing technique with special reference to the effect of the size of the soil particles. **Journal of Botany**, Canadian, v. 66, n. 8, p. 1566–1569, 1988.

BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*Coffea arabica L.*) como provável fonte de substâncias bioativas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, Colney, v.18, p. 355–383, 2000.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento de fungos celulóticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Piracicaba:Universidade de São Paulo ESALQ, 2011.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Athens , v. 254, n. 1, p. 248–25, 1976.

BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and microbial technology**, Curitiba, v. 27. n. 1-2, p.127–133, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862912>. Acesso em: 15 mar. 2015.

BROOKES, P. C. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, Harpenden, v. 4, 1340–1351, 2010. doi:10.1038/ismej.2010.58

Carmo, J. R. do. **Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando resíduos do processamento do café (*Coffea arabica* L.).** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013.

CARVALHAL, F.; RODRIGUES, S. S.; BERCHEZ, F. A. **Mata Atlântica.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2015.

CARVALHO, V. G. C. Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2012.

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

CHAKRADHAR, D.; JAVEED, S.; SATTUR, A. P. Studies on the production of nigerloxin using agro-industrial residues by solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Misore, v.36, p.1179–1187, 2009. doi:10.1007/s10295-009-0599-7

CHALUPOVÁ, J. et al. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, Olomouc, v. 32, p. 230–241, 2014. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.002

CHAVES, F. et al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annals of Microbiology**, Lavras, v. 65, n. 1., fev., 2015. doi:10.1007/s13213-015-1050-0

CHELKOWSKI, J. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity*. New York: Elsevier, 1989. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=\\_1KeBQAAQBAJ&dq=fusarium&lr=&hl=pt-BR&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.br/books?id=_1KeBQAAQBAJ&dq=fusarium&lr=&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s)>. Acesso em: 23 maio 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da Safra Brasileira: Café*. Brasília, 2013.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry: A review. **Journal of Food Engineering**, Vigo, v.76, n. 3, p. 291–302, 2006. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022

DAVIES, L. O. et al. Light Structures Phototroph, Bacterial and Fungal Communities at the Soil Surface. **PLoS ONE**, Coventry, v. 8, n. 7, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0069048

DELABONA, P. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

DIONISIO, F. G. et al. Aplicação de complexo enzimático lignocelulósico para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009. Maringá. **Anais...** Maringá, 2009..

DO, T. T. et al. Molecular characterization of a glycosyl hydrolase family 10 xylanase from *Aspergillus niger*. **Protein Expression and Purification**, Hanoi, v.92, n. 2, p. 196–202, 2013. doi:10.1016/j.pep.2013.09.011

DOMSCH, K. H.; GAMS, W. **Compendium of Soil Fungi**. 2.ed. London: Academic Press, 1980)

DUARTE, E. A. A. et al. Bioprospection of bacteria and yeasts from Atlantic Rainforest soil capable of growing in crude-glycerol residues. **Genetics and Molecular Research**, Ilhéus,, v.12, n. 4, p. 4422–4433, 2013.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, San Pedro, v. 46, n.2, p. 488–495, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.028

GAUTAM, S. P. Cellulase production by *pseudomonas* sp . isolated from municipal solid waste compost. **International Journal of Academic Research**, Jabalpur, v.2, n.6, p.330–333, 2010.

GHOSE, T. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, New Delhi , v.59, p.257–268, 1987.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. Forage fiber analyses. **Agricultural Research Service**, Ithaca, v. 379, 1970.

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

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 2010.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, Chennai, v. 38, p.987–996, 2003.

HALAL, S. L. M. **Composição , processamento e qualidade do café**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2008.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da Floresta Amazônica e Otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana**. Rio de Janeiro:Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

JAYACHANDRA, T.; VENUGOPAL, C.; ANU APPAIAH, K. A. Utilization of phytotoxic agro waste— Coffee cherry husk through pretreatment by the ascomycetes fungi *Mycotypha* for biomethanation. **Energy for Sustainable Development**, Karnataka, v.15, n.1, p.104–108, 2011. doi:10.1016/j.esd.2011.01.001

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes : A review. **Process Biochemistry**, Shimla, v. 40, p. 2931–2944, 2005. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026

KASANA, R. C. et al. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram ' s Iodine. **Current Microbiology**, Palampur v. 57, n.5, p. 503–507, 2008. doi:10.1007/s00284-008-9276-8

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector : a review. **Bioresource technology**, Chandigarh , v. 77, p. 215–227, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Brasília, v.1, n. 1, p. 147–155, 2005.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, Cambridge, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Solid state cultivation – an efficient method to use toxic agro-industrial residues. **Journal Basic Microbiology**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 187–197, 2000.

LI, J. et al. Synergism of cellulase , xylanase , and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Guanzhou, v.155, p. 258–265, 2014. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.113

LIMA, M. V. et al. Preparo do café despulpado , cereja descascado e natural na região sudoeste da Bahia. **Revista Ceres**, Campo dos Goytacazes v.55, n. 2, p. 124–130, 2008.

LISBOA, C. C. **Vulnerabilidade da matéria orgânica do solo ao aumento de temperatura**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2008.

LO SCIUTO, D. Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase. Brasília: Universidade de Brasília, 2015.

MARTINS, P. A. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico**. Brasília: Universidade de Brasília, 2012.

MEDEIROS, G. A. et al. Enzimas e líquidos iônicos: uma combinação promissora para um biodiesel limpo. **Revista Virtual de Química**, Brasília, v. 5, n.1, p. 74–94, 2013. doi:10.5935/1984-6835.20130008

MERCK MILLIPORE. **Agar extracto de malte**. 105398 | Agar extracto de malte, 2014. Disponível em <[http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Agar-extracto-de-malte,MDA\\_CHEM-105398#documentation](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Agar-extracto-de-malte,MDA_CHEM-105398#documentation)>. Acesso em 26 jun. 2015.

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. **Research in Biotechnology**, Mubi, v. 2, n. 6, p. 21–26, 2011.

MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 3, n. 3, p.426–428, 1959.

MIRANDA, M. C. M. Produção de enzimas celulolíticas de fungo *Aspergillus ustus* isolados da Amazônia. In: Congresso de Iniciação Científica da UFAM, 17., 2012, Manaus. **Anais...** Manaus, 2012.

MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em Brasília / DF**. Brasília: Universidade de Brasília, 2014.

MOREIRA, L. R. de S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização , degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos**. Brasília: Universidade de Brasília, 2013.

MUSSATTO, S. I. **Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes**: In Industrial Waste. Portugal: InTech's Journals, 2012.

NIELSEN, U. N. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity – function. **European Journal of Soil Science**, Fort Collins, v. 62, p. 105–116, fev. 2011. doi:10.1111/j.1365-2389.2010.01314.x



O'BRIEN, H. E. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples †. **Applied and Environmental Microbiology**, Durham, v.71, n. 9, p. 5544–5550, 2005. doi:10.1128/AEM.71.9.5544

ODEGA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OKINO, S. et al. Effects of Tween 80 on cellulase stability under agitated conditions. **Bioresource Technology**, Ibaraki, v. 142, p. 535–539, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.078

OLIVEIRA, M. M. E. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Institut Pasteur**, Rio de Janeiro, v. 166, p. 102–110, 2015. doi:10.1016/j.resmic.2014.12.008

ORMOND, J. G.; PAULA, S. R. L.; FAVEET FILHO, P. Café: (re)conquista dos mercados. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v.10, p. 3–56, set. 1999.

OROZCO, A. L. et al. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Madrid, v.81, n. 2, p. 247–252, 2008. doi:10.1016/j.jaap.2007.12.002

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

PANDA, A. et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. **Journal of Microbiological Methods**, New Delhi, 109, 93–105, 2015. doi:10.1016/j.mimet.2014.12.014

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Trivandrum, v. 13(July 2002), p. 81–84, 2003.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Curitiba, v. 77, n. 1, 149–162, 1999.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Trivandrum, v. 6, n. 2, p. 153–162, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959086>. Acesso em 15 jul. 2015.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, Curitiba, v. 35, p. 1153–1169, 2000.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Thessaloniki, v. 22, p. 189–259, 2004. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.09.005

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. de. Diversity of Microfungi in Tropical Soils. In MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Eds.). **Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems**. Wallingford: CABI Publishing, 2008.

PULLEMAN, M. et al. Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services — an overview of European approaches. **Environmental Sustainability**, Wageningen, v. 4, n. 10, p. 529–538, out. 2012. doi:10.1016/j.cosust.2012.10.009

ROBERTI, R. et al. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Science**, Bologna, v.175, p. 339–347, 2008. doi:10.1016/j.plantsci.2008.05.003

ROBI, D. et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, São Paulo, v. 13, n. 94, p. 1-12, 2013.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORSNISELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, Rio Claro, v. 27, n. 2, p. 205–211, 2004.

SAENGER, M. Combustion of coffee husks. **Renewable Energy**, Hamburg, v. 23, n. 1, p. 103–121, 2001. doi:10.1016/S0960-1481(00)00106-3

SAHA, B. . (2003). Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiology Biotechnology**, Peoria, v.30, p. 279–291, 2003.

SALES, M. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Recife, 45(11), 1290–1296, 2010.

SALMONES, D., MATA, G.; WALISZEWSKI, K. N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource technology**, Xalapa v. 96, n. 5, p. 537–44, 2005. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.019

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Tlaxcala, v.27, n. 2, p.185–194, 2009. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Recife, v. 108, p. 375–385, 2010. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x

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

SANTOS, S. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SEHNEM, N. T. et al. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Applied Microbial and Cell Physiology**, Caxias do sul, v. 76, p. 163–167, 2006. doi:10.1007/s00253-005-0251-z

SHRESTHA, P. et al. Systematic Search for Cultivable Fungi That Best Deconstruct Cell Walls of *Miscanthus* and Sugarcane in the Field. **Applied and Environmental Microbiology**, Berkeley, v.77, n. 75, p. 5490–5504, 2011. doi:10.1128/AEM.02996-10

SILVA, C. O. G. *Emericella nidulans* e bagaço de cana-de-açúcar: ferramentas para produção de endo- $\beta$ -1. Brasília:Universidade de Brasília, 2014.

SILVA, J. P. da. **Caracterização da Casca de Café (*coffea arábica*, L) in natura, e de seus Produtos Obtidos pelo Processo de Pirólise em Reator Mecanicamente Agitado** Caracterização da Casca de Café (*coffea arábica*, L) in natura, e de seus Produtos Obtidos pelo Proc. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

SILVA, F. C. et al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annual Microbiology**, Lavras, v. 65, n. 2, fev. 2015. doi:10.1007/s13213-015-1050-0

SIQUEIRA, F. G. **Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases** Félix Gonçalves de Siqueira. Brasília:Universidade de Brasília, 2010.

SOUSA, T. M. M. **Regulação transcricional de genes de hidrolases em fungos filamentosos: sistemas PacC / CreA em *Humicola grisea* var .**

thermoidea e sistema Xyr1 em *Trichoderma reesei*. Brasília: Universidade de Brasília, 2012.

SOUZA, A. L. de et al. Composição Químico - Bromatológica da Casca de Café Tratada com Amônia Anidra e Sulfeto de Sódio. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 983–991, 2001.

SPROCATI, A. R. et al. Bioprospecting at former mining sites across Europe : microbial and functional diversity in soils. **Environmental Science Pollution Research**, Rome, v. 21, p. 6824–6835, 2014. doi:10.1007/s11356-013-1907-3

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied and Environmental Microbiology**, Ontario, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, Tartu v. 346, n. 6213, p. 1078–1090, 2014. doi:10.1126/science.aaa1185

TORSVIK, V.; ØVREAS, L. Microbial diversity and function in soil : from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Bergen, v. 5, p. 240–245, maio 2002.

TRESENDER, K. K.; HOLDEN, S. R. Fungal Carbon Sequestration. **Science**, Irvine, v. 339, p.1528 – 1529, 2013.

VISAGIE, C. M. et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology**, Utrecht , v. 78, p. 63–139, 2014. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.002

WAGG, C. et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **PNAS**, Zürich , v. 111, n. 14, p. 5266–5270, 2014. doi:10.1073/pnas.1320054111

WALL, D. H. et al. **Soil Ecology and Ecosystem Services**. Unitet Kingdom: Oxford United Press, 2013.

WARDLE, D. A.; LINDAHL, B. Disentangling global soil fungal diversity. **Science**, Umeå, v. 346, n. 6213, p.1052–1053, 2014.

WARREN, R. A. J. Microbial hidrolysis of polysaccharides. **Annual Reviews Microbiology**, Vancouver, v. 50, p. 183–212, 1996.

WRAY, W. Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, Houston, v.118, p. 197–203, 1981.

XIMENES, E. A.; FELIX, C. R.; ULHOA, C. J. Production of Cellulases by *Aspergillus fumigatus* and Characterization of One  $\beta$ -Glucosidase. **Current Microbiology**, Brasília, v. 32, p. 119–123, 1996.

YADAV, S. et al. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, Gorakhpur, v. 44, p. 1–10, 2009. doi:10.1016/j.procbio.2008.09.012

ZHANG, Y. P.; HIMMEL, M. E. MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement : Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Blacksburg, v.24, p. 452–481, 2006. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.03.003

ZHOU, Y. et al. Soil fungal diversity in three nature reserves of Jiuzhaigou. **Annual Microbiology**, Chengd, v. 64, p. 1275–1290, 2014. doi:10.1007/s13213-013-0772-0

### CAPÍTULO 3

## SCREENING ENZIMÁTICO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CELULASE, XILANASE E PECTINASE DE *Aspergillus japonicus*

### RESUMO

A busca por produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas para utilização em indústrias tecnológicas de diferentes setores tem levado a uma aplicação ampla do metabolismo de microrganismos em geral. Os fungos filamentosos destacam-se na produção destas enzimas quando submetidos ao crescimento em meios contendo materiais lignocelulósicos. No presente trabalho buscou-se verificar a produção dessas enzimas a partir de casca de café arábica e robusta. Os fungos pré-selecionados por bioprospecção *Clonostachys rosea* e *Fusarium solani* juntamente com as cepas referência de produção celulolítica e xilanolítica *Aspergillus japonicus* e *Penicillium chrysogenum* foram avaliados por fermentação submersa para verificação do melhor produtor de celulases e xilanases. Os fungos *C. rosea* e *A. japonicus* foram escolhidos para fermentação sólida nas cascas de café arábica e robusta. Após análise enzimática desses isolados, realizou-se a caracterização do extrato bruto de *A. japonicus* crescido em casca de café arábica. Grande produção de CMCases, xilanases e pectinases foram detectadas. O extrato bruto foi concentrado por ultrafiltração e sujeito à cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G 50). Duas frações principais foram encontradas e avaliadas quanto à termoestabilidade, temperatura e pH ótimos. A temperatura ótima foi descrita como 50°C e pH ótimo, em faixa ácida de 3,5 a 6,0. O pico 1 da cromatografia de exclusão molecular foi submetido à cromatografia de troca iônica Q Sepharose para purificação de CMCCase. Uma endo-1,4-β-glicosidase de aproximadamente 38 KDa foi semipurificada.

**Palavras-chave:** Celulase, Xilanase, Casca de café arábica, Casca de café robusta, *Aspergillus japonicus*, Fermentação em estado sólido.

## CHAPTER 3

### ENZYMATIC SCREENING AND BIOCHEMISTRY CHARACTERIZATION OF CELLULASE, XYLANASE AND PECTINASE THE *Aspergillus japonicus*

#### ABSTRACT

The search for production of xylanases and cellulases for use in technological industries from different sectors has led to wide application of microorganisms. The filamentous fungi are highlighted in the production of these enzymes when subjected to growth on media containing lignocellulosic material. In the present study aimed to production of these enzymes from arabica and robusta coffee husks. The fungi pre-selected by bioprospecting *Clonostachys rosea*, *Fusarium solani*, and reference strain of the cellulolytic and xylanolytic production *Aspergillus japonicus* and *Penicillium chrysogenum* were evaluated by submerge fermentation to check the best producer of cellulases and xylanases. The fungi *C. rosea* and *A. japonicus* were chosen for solid fermentation in arabica and robusta coffee husks, after enzymatic analysis of these isolates was realized the characterization the crude extract of *A. japonicus* grown arabica coffee. Large production CMCases, xylanase and pectinase were detected. The crude extract was concentrated by ultrafiltration and subjected to size exclusion chromatography (Sephadex G 50). Two major fractions were found and evaluated for thermal stability, optimum temperature and pH. The optimum temperature was described as 50 ° C and optimum pH in acidic range 3.5 to 6.0. The first peak of the molecular exclusion chromatography was subjected to ion exchange Q Sepharose chromatography for CMCCase purification. An endo-1,4-β-glucosidase of approximately 38 kDa was semipurified.

**Keywords:** Cellulase, Xylanase, Arabica coffee husks, Robusta coffee husks, *Aspergillus japonicus*, Solid state fermentation.



## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são macromoléculas predominantemente proteicas capazes de catalisar reações biológicas para viabilizar a manutenção e desenvolvimento de células, imprescindíveis aos seres vivos. São classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada em seis grandes grupos: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. As enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica são agrupadas em quatro estruturas principais: celulases, hemicelulases, ligninases e pectinases (LO SCIUTO, 2015; MEDEIROS et al, 2013; MIRANDA, 2012).

Os microrganismos representam excelente fonte de sistemas enzimáticos com diversas atividades glicosil-hidrolases envolvidas na quebra dos polissacarídeos da parede celular das plantas, com diferentes especificidades e modos de ação (MIRANDA, 2012; SIQUEIRA, 2010). As glicosil-hidrolases são de dois tipos básicos: enzimas de retenção e enzimas de inversão. Enzimas de retenção usam um mecanismo de duplo deslocamento para catalisar a hidrólise com a retenção da configuração de um centro anomérico, enquanto as enzimas de inversão usam um mecanismo principal de deslocamento simples para inversão da configuração do centro anomérico. Ambos os mecanismos envolvem pares de ácidos carboxílicos. Cada grupo relacionado ao tipo de mecanismo é subdividido em enzimas que hidrolisam ligações  $\beta$ - ou  $\alpha$ -glicosídicas. Cada um desses subgrupos é subdividido de acordo, ainda, com a preferência da enzima para um monossacarídeo particular e sua posição da ligação no glicosídeo (WARREN, 1996).

Biomassa é definida como qualquer material, excluindo combustíveis fósseis, que um organismo vivo pode utilizar como combustível, quer seja diretamente ou após processo de conversão. Diferentes tipos de biomassa - madeira, plantas herbáceas, gramíneas, plantas aquáticas, culturas agrícolas e resíduos, lixos sólidos municipais e adubos - contêm diferentes quantias de holocelulose (celulose, hemicelulose e pectina), lignina e extrativos (AGBOR et al, 2011; ROBI et al., 2013; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Celulases, hemicelulases e pectinases têm um amplo potencial de aplicações na biotecnologia (ZHANG

et al., 2006). A produção de enzimas envolvidas na degradação da holocelulose é regulada principalmente no nível transcricional (SOUSA, 2012).

A eficiência da bioconversão destes polímeros a açúcares fermentáveis depende da recalcitrância da biomassa e de um mecanismo intrínseco dos sistemas enzimáticos que incluem um amplo grupo de glicosidade (AGBOR et al., 2011; SIQUEIRA, 2010).

Celulases e hemicelulases têm suas propriedades biotecnológicas utilizadas desde o início da década de 1980, primeiramente para alimentação animal seguida de aplicações no setor alimentício. Subsequentemente, essas enzimas foram utilizadas nas indústrias têxteis e lavanderia, assim como nas indústrias de polpa e papel, além da extensiva investigação como ferramentas para produção viável de etanol de segunda geração (BHAT, 2000; ROBI et al., 2013). As hemicelulases incluem enzimas acessórias, que são um grupo de enzimas capazes de aumentar o rendimento de açúcares redutores durante a hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos (ROBI et al., 2013).

As pectinases apresentam grande diversidade devido às diferentes estruturas das substâncias pécnicas, elas são classificadas em enzimas de despolimerização e de desesterificação de acordo com seu mecanismo de ação nos grupos metilados e substrato preferido (GUMMADI; PANDA, 2003; KASHYAP et al., 2001; YADAV et al., 2009). Desde 1940, as pectinases são exploradas para muitas aplicações industriais, sua importância no processo de produção de sucos, polpas e purê de frutas, clarificação e filtração destes, preservação da madeira, bem como nas indústrias de polpa e papel junto às celulases (GUMMADI; PANDA, 2003). A degradação da pectina previne a formação de géis, bem como a redução da viscosidade e quantidade de sólidos em suspensão que comprometem o aspecto visual do produto final (GOMES, 2014).

Existem dois tipos de processos fermentativos que são utilizados para a produção de enzimas: a fermentação submersa (FSm) e fermentação em estado sólido (FES). Os processos fermentativos submersos são amplamente conhecidos e aplicados, porém a fermentação sólida tem se tornado atraente sob o ponto de vista econômico (PALMA, 2003).

A fermentação em estado sólido é definida como a fermentação envolvendo sólidos na ausência (ou próxima dela) de água livre, porém o substrato deve possuir umidade suficiente para crescimento e metabolismo do microrganismo (PANDEY, 2003).

Os resíduos agroindustriais são geralmente considerados os melhores substratos para o processo de FES, pois, além de serem fontes de nutrientes, são suportes físicos para o crescimento do microrganismo. (COUTO; SANROMÁN, 2006; PANDEY, 2003)

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são os microrganismos utilizados no processo de FES. As bactérias estão principalmente envolvidas em compostagem, ensilagem e alguns processos de produção alimentar. As leveduras podem ser utilizadas para produção de etanol e produção de rações animais. (MIENDA; IDI; UMAR, 2011) Os fungos filamentosos são os microrganismos de maior importância usados em FES, pois possuem suas próprias propriedades fisiológicas, bioquímicas e enzimológicas (MIENDA; IDI; UMAR, 2011). As condições desse tipo de cultivo são muito próximas das condições naturais de crescimento desses microrganismos (PALMA, 2003)

O capítulo a seguir apresenta os resultados de um screening enzimático realizado a partir dos fungos filamentosos obtidos na bioprospecção dos solos, apresentados no capítulo anterior, e o melhor produtor *-Aspergillus japonicus-*, com suas enzimas caracterizadas bioquimicamente.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Fermentação Submersa

O meio base para os ensaios de produção de celulasas e xilanasas, foi o de Mandels, modificado (MANDELS E WEBER, 1969), composto de 5g/l de glicose, 0,5g/l CMC ou xilana, 2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,4 g/L de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 0,3 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,4 mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg/L de  $\text{CoCl}_2$ , 1 ml/L de Tween 80 e 1 g/L de peptona.

#### 2.1.2 Construção da curva de indução para produção de celulasas e xilanasas

Para acompanhamento da produção de celulasas e xilanasas foi construída uma curva de indução para essas enzimas. Nela, os isolados I36 (*Fusarium solani*), I31 (*Clonostachys rosea*) e as cepas referência da coleção do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, *Penicillium chrysogenum* (CCDA 0253) e *Aspergillus japonicus* (CCDA 0106), foram os que na avaliação prévia (capítulo 1), obtiveram os melhores resultados de produção enzimática. Foram inoculados no meio de cultura descrito no item acima (9.1).

Para preparação dos inóculos, os fungos foram cultivados em meio BDA por 7 dias, raspados com lâmina de vidro e diluídos em solução de NaCl 0,9% (m/v) e Tween 80 0,4% (v/v), de modo a obter uma suspensão contendo de  $10^5$  a  $10^7$  esporos/ml. A contagem de esporos foi feita em microscópio ótico com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Foram inoculados 1 ml de solução de esporos para 250ml do meio. Os cultivos foram realizados em duplicata e conduzidos a 120 rpm e 28°C.

Alíquotas dos cultivos foram retiradas, a cada 24 horas durante 7 dias, e realizados, testes de atividade de celulase, xilanase, pectinase e mananase. Os substratos utilizados foram CMC 1%, xilana solúvel *Oat spelts*, pectina cítrica 1% e manana 1%. (galactomanana de alfarroba), respectivamente.

As curvas de indução de produção de celulase e xilanase foram realizadas em duplicata biológica e técnica.

## **2.2 Preparação das cascas de café arábica e robusta**

As cascas de café arábica foram originárias da Região Sul do Estado de Minas Gerais e as cascas de café robustas, do Espírito Santo. As amostras foram congeladas e armazenadas em freezer a  $-5^{\circ}\text{C}$  e descongeladas no momento da utilização. Após descongelamento, as amostras foram tratadas de acordo com Santos (2007), com algumas adaptações.

a) Moagem: visando ajustar as cascas à granulometria adequada ao processo, foram trituradas em moinho multiuso e, em seguida, peneiradas a uma granulometria média de 0,8 mm.

b) Esterilização: as cascas foram esterilizadas em autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$ , por 60 minutos, visando a eliminação de possíveis contaminantes ao processo, e atuando com pré-tratamento.

As cascas de café robusta e café arábica foram analisadas separadamente, durante todo o experimento.

### **2.2.1 Análises químicas e físico-químicas da casca de café**

As cascas de café trituradas foram caracterizadas química e físico-quimicamente quanto aos parâmetros potencial hidrogeniônico (pH), extrato etéreo, proteína bruta, celulose e hemicelulose. Todos os parâmetros foram analisados no Laboratório de Análise de Qualidade do Café, localizado na Fazenda Experimental da EPAMIG, em Lavras-MG.

### **2.2.3 Potencial hidrogeniônico (pH)**

O pH foi mensurado pelo método potenciométrico proposto pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

### **2.2.3 Extrato etéreo ou lipídios totais**

O teor de extrato etéreo da casca de café foi determinado pelo método de Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente, conforme metodologia descrita pela AOAC (1990).

### **2.2.4 Proteína Bruta**

Para determinar o conteúdo de proteína bruta presente na casca de café, foi adotado o método de microkejedal, utilizando-se o fator de

conversão (de nitrogênio em proteína) igual a 6,25, de acordo com AOAC (1990).

### **2.2.5 Celulose e hemicelulose.**

Os teores de celulose e hemicelulose foram determinados de acordo com as metodologias propostas por Goering e Soest (1970), Silva (1998) e Soest (1963). Inicialmente foram analisados os teores de fibra em detergente ácido (FDA), e em detergente neutro (FDN). O teor de celulose foi determinado através da equação 1 e o de hemicelulose, através da equação 2.

$$C (\%) = FDA - L$$

Em que:

C: celulose

FDA: fibra em detergente ácido

L: porcentagem de lignina.

(2)

$$HC (\%) = FDN - FDA$$

Em que:

HC: hemicelulose

FDA: fibra em detergente ácido

FDN: fibra em detergente neutro

### **2.2.6 Cinzas**

O conteúdo de cinzas, ou resíduo mineral fixo, foi determinado pelo método gravimétrico, baseado na determinação da perda de peso do material submetido a 550°C em mufla, como descrito em AOAC (1990).

## **2.3 Fermentação em estado sólido**

Para a realização das fermentações, os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 250 ml de volume contendo 30g do substrato previamente preparado, que foi então inoculado com 30 ml de solução salina 0,9% coloidal, contendo  $10^6$  esporos/ml dos isolados que apresentaram melhores resultados de atividades enzimáticas avaliadas no item 8.1.2.

Os frascos Erlenmeyer foram incubados em BOD, devidamente fechados, à temperatura de 28°C, por 7 dias. O cultivo foi conduzido em condições estáticas, sendo retirado um frasco a cada 24 h para as análises de pH, umidade, proteínas totais e atividade de xilanases e celulases. Os testes foram realizados em duplicata.

## **2.4 Tratamento das amostras**

O meio fermentado proveniente dos frascos retirados a cada 24h foi homogeneizado e, deste material foram retiradas 1 g para determinação de umidade e 1g para determinação do pH. O restante da amostra teve sua extração enzimológica, imediatamente após incubação.

A extração das enzimas do meio fermentado foi realizada através da incubação relativa de 1 g de amostra, a cada 7 ml de tampão citrato de sódio 50 mM, a pH 5,0 e temperatura de 30°C, em velocidade de agitação de 200 rpm por 30 minutos. A amostra foi filtrada a vácuo utilizando papel Whatman n°5 e funil de Büchner, armazenada em frascos âmbar a -4°C e acrescida de azida sódica 0,2% para inibir o crescimento de microrganismos. O conteúdo dessa amostra foi denominado Extrato Bruto (EB) (DELABONA, 2011).

## **2.5 Determinações analíticas**

### **2.5.1 Umidade**

A umidade inicial do meio foi determinada colocando-se 1,0 g de amostra em estufa a 35°C, por um período de 24h. O resultado foi obtido gravimetricamente através da relação entre o peso inicial e o peso final da amostra (AOAC, 1990).

### **2.5.2 pH**

Para determinação do pH do meio fermentado foi utilizada 1,0g da amostra retirada, conforme item 8.4 e suspensa em 10 ml de água destilada e vortexada. O pH foi lido em pHmetro digital (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

## 2.6 Atividade e caracterização enzimática

Para quantificações enzimáticas, as atividades foram expressas em unidades internacionais por mililitro de extrato enzimático.

UI = nº de  $\mu$ mols de produto liberado/ min – nas condições especificadas para cada atividade.

### 2.6.1 Determinação de atividade enzimática

A análise das atividades hemicelulolíticas (xilanases), celulolíticas (celulases) e pectinolíticas (pectinases) presentes no extrato bruto foi realizada pela dosagem de açúcares redutores, usando DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) como descrito por Miller (1959).

Para cada ensaio, foram incubadas 10  $\mu$ l de substrato (xilana e carboximetilcelulose e pectina), com 5  $\mu$ l de extrato bruto a 50°C, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu$ l de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 43,84 mM; NaOH 400 mM; tartarato de sódio e potássio 1,06 mM) a cada ensaio e incubados a 97°C, por mais 10 minutos para interrupção da reação e observação da cor gerada, como produto da mudança do DNS. Ao final, foram adicionadas 150  $\mu$ l de água destilada, de modo que a absorbância se adeque à curva de cada açúcar redutor em questão. Para quantificar a intensidade de cor, foi realizada a leitura em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 Microplate Reader (Molecular Devices, LLC), a 540 nm (GHOSE, 1987). Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata.

### 2.6.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi avaliado realizando-se os ensaios nas temperaturas de 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C e 80°C, nas mesmas condições descritas no item anterior.

### 2.6.3 Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado realizando-se ensaios em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 3,0 – 6,0), tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0 – 7,05) e tampão Tris HCl 50 mM (pH 7,5 – 9,0). Esses ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas no item 8.6.1, alterando-se somente as quantidades de solução enzimática (25  $\mu$ l) e



substrato xilana 1%, pectina 1% e CMC 4% (50 µl), adicionados de 75 µl de tampão, perfazendo um volume final de ensaio dez vezes maior que o valor descrito anteriormente (GHOSE, 1987).

Foram utilizados três diferentes tampões devido à dificuldade de se encontrar um único tampão que alcançasse a faixa de pH desejada e também para verificar se o tampão de mesmo pH exerce efeito sobre a atividade enzimática.

#### **2.6.4 Avaliação da termoestabilidade**

As enzimas foram pré-incubadas em tubos eppendorf à temperatura de 50°C, por 6 dias. Alíquotas foram retiradas diariamente e submetidas a ensaios enzimáticos como descritos no item 9.6.1, para quantificação da atividade residual de celulase, xilanase e pectinase. As atividades foram expressas como atividade relativa, sendo o tempo zero considerado como 100% de atividade.

### **2.7 Purificação das enzimas**

#### **2.7.1 Ultrafiltração**

O extrato bruto foi concentrado através do método de ultrafiltração. Nesse procedimento, o extrato bruto foi submetido a uma pressão de 5 kgf/cm<sup>2</sup>, produzido por injeção de ar comprimido na câmara de ultrafiltração e forçado através de uma membrana com *cut-off* de 30kDa. Foram obtidas duas frações: o concentrado e o ultrafiltrado (MARTINS, 2012).

A membrana utilizada na ultrafiltração é produzida a partir de celulose, e como a amostra apresenta atividade celulolítica, o processo foi realizado a 4°C. Algumas xilanases de fungos filamentosos têm certa dificuldade em atravessar tal membrana, portanto este procedimento foi utilizado como etapa de purificação.

#### **2.7.2 Cromatografia de exclusão molecular**

Para a purificação em cromatografia de exclusão molecular, 435 ml de resina Sephadex G-50 fine foram empacotadas em uma coluna, utilizando o sistema de bancada a um fluxo constante de 12 ml/h. A pressão máxima foi

calculada através da lei de Darcy e dos parâmetros fornecidos no manual da resina.

Para a corrida foi utilizada 13 ml de amostra precipitada e dialisada. A eluição foi isocrática em tampão citrato de sódio 50 mM a pH 5,0, acrescido de NaCl 0,15M a um fluxo constante de 12 ml/h e por dois volumes de coluna. As frações de 2,6 ml foram coletadas automaticamente por dois coletores, totalizando 175 tubos e analisadas para detecção de atividade celulolítica e xilanolítica, para confecção do cromatograma (MARTINS, 2012).

As frações coletadas foram submetidas à leitura de absorbância, a 280 nm para detecção de proteínas e a ensaios enzimáticos de celulase, xilanase e pectinase, conforme o item 8.6.1. Os tubos que apresentaram atividades celulolíticas, xilanolíticas e pectinolíticas foram reunidos para prosseguimento do processo de purificação.

### **2.7.3 Precipitação proteica com sulfato de amônio**

A frações reunidas da cromatografia de exclusão molecular Sephadex G50 correspondente ao PICO 1 foram submetidas a uma condição de saturação de 70% (m/v) de sulfato de amônio macerado e adicionado lentamente à solução, a uma temperatura de 4°C sob leve agitação. Após 24 horas de incubação, a solução foi centrifugada a 6000g por 20 minutos. Ao final, foi obtido um *pellet*, composto pela fração proteica precipitada, que foi ressuspensa em citrato de sódio 50 mM a pH 5,0, em volume 120 vezes menor que o volume inicial do concentrado (MARTINS, 2012).

### **2.7.4 Cromatografia de troca iônica**

As frações reunidas da coluna Sephadex G50 foram aplicadas em uma coluna de cromatografia de troca iônica *Q Sepharose* (3 x 6 cm) previamente lavada, conforme manual do fabricante, e equilibrada com tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0, sem adição de NaCl.

Após total eluição das proteínas não aderidas, um gradiente de NaCl (0 – 1M) foi aplicado após 60 ml de corrida para eluir proteínas aderidas à resina. Frações de 3 ml foram coletadas a um fluxo de 12 ml/h.

As frações coletadas foram submetidas à leitura de absorbância e ensaios enzimáticos, como descritos no item 8.7.2.

## 2.8 Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração proteica de cada solução enzimática (extrato bruto e frações das etapas de purificação) foi obtida utilizando-se o método de *Bradford* e o *Kit Protein Assay* (Bio-RadLaboratories, EUA). Uma solução de BSA (albumina sérica bovina) (0,1 mg/ml) foi usada para a construção da curva padrão, de acordo com as instruções do fabricante (BRADFORD, 1976).

A intensidade colorimétrica foi quantificada em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 Microplate Reader (Molecular Devices, LLC) a 595nm.

## 2.9 Análise em gel

Os géis utilizados nesse procedimento de eletroforese foram os géis de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético e suspensas em seguida com o tampão de amostra 1X (Tris HCl 72,5 mM, 2% SDS m/v, 10% sacarose m/v, DTT 50 mM, 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8) e submetidas a 100°C por 5 minutos; aplicadas em géis com concentração de 12% de poliacrilamida, preparadas segundo o protocolo tradicional de LAEMMLI (1970).

A eletroforese foi realizada em sistema Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems (Bio-RadLaboratories, EUA), em tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,19M, SDS 3,45 mM), aplicada uma corrente constante de 25 mA por gel. Para cada gel, foi utilizada 3µl do marcador Unstained Protein MW Marker # 26610 contendo sete proteínas purificadas com peso molecular de 14,4 KDa a 116KDa ( $\beta$ -galactosidase- 116, albumina sérica bovina- 66,2 KDa, ovoalbumina – 45KDa, lactato desidrogenase – 35KDa, REase Bsp98I – 25KDa,  $\beta$ -lactoglobulina – 18,4KDa e lisozima – 14,4 KDa) (MARTINS, 2012).

A coloração dos géis com nitrato de prata foi realizada segundo WRAY et al (1981).

## 2.10 Zimograma

Para análise das atividades xilanolítica *in gel*, as amostras foram tratadas conforme protocolo descrito por Sunna e Antranikian (1997). Um gel de poliacrilamida 15% co-polimerizado com suspensão de xilana *Oat*

*Spelts* foi confeccionado a concentração de 0,2% (m/v). Para atividade celulolítica o gel de poliacrilamida, 12% co-polimerizado, com suspensão de carboximetilcelulose Sigma-Aldrich® 0,4% (m/v) e para atividade pectinolíticas, o gel de poliacrilamida 15% foi co-polimerizado com suspensão de pectina de maçã Sigma-Aldrich® 0,2% (m/v).

Após a corrida, o gel foi lavado em solução de Triton X-100 2,5%, por 60 minutos, para retirada do SDS. Em seguida, foi incubado em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0, por 90 minutos em banho-maria a 50°C e, posteriormente, deixado a 4°C, por 16 horas. O gel foi, então, incubado por 20 minutos, em solução de *Congo Red* 0,1%, sob leve agitação e descorado, a seguir, com solução de NaCl 1M até o aparecimento das bandas. Por fim, foi adicionada solução de ácido acético 0,5% (v/v), para finalizar a visualização das bandas.

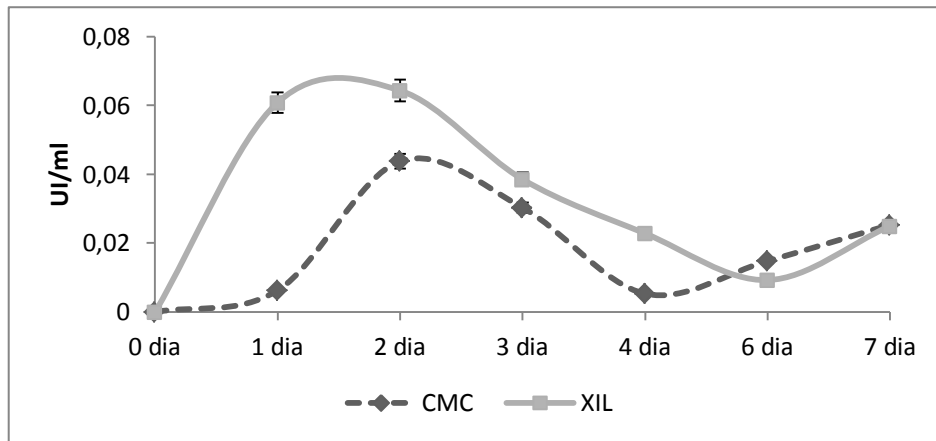
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Fermentação submersa e curva de indução enzimática

Atualmente, a fermentação submersa é utilizada, em grande maioria, para produção de enzimas, devido, principalmente, à facilidade de recuperação do produto final e ao tempo de fermentação para alcançar rendimentos satisfatórios (CASTRO, 2010). Contudo, nesse experimento a fermentação submersa foi utilizada para a construção de uma curva de indução enzimática, para seleção dos melhores produtores celulolíticos e xilanolíticos, para posterior fermentação sólida, em casca de café.

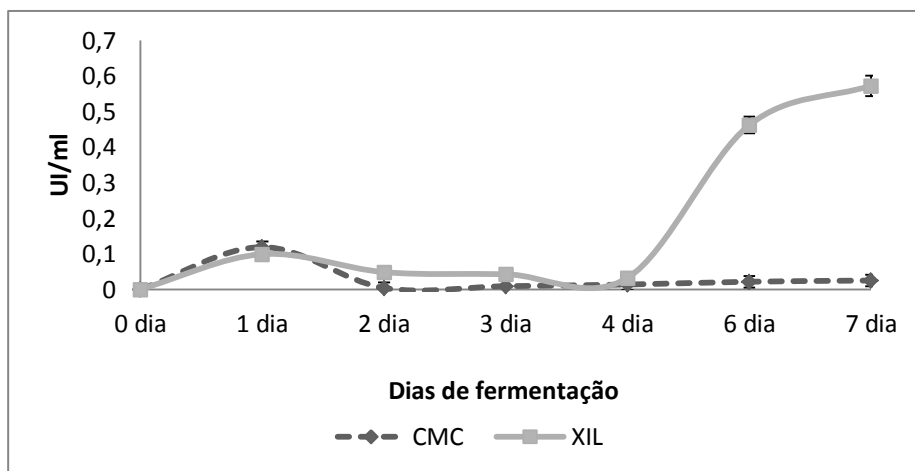
Inicialmente, foram avaliados os potenciais de *Fusarium solani*, *Clonostachys rosea*, *Aspergillus japonicus* e *Penicillium chrysogenum* para produção de enzimas celulolíticas (CMCase) e hemicelulolíticas (xilanase), durante sete dias.

A seguir, os perfis de produção enzimática referente aos dias de cultivo, por cada fungo em especial.



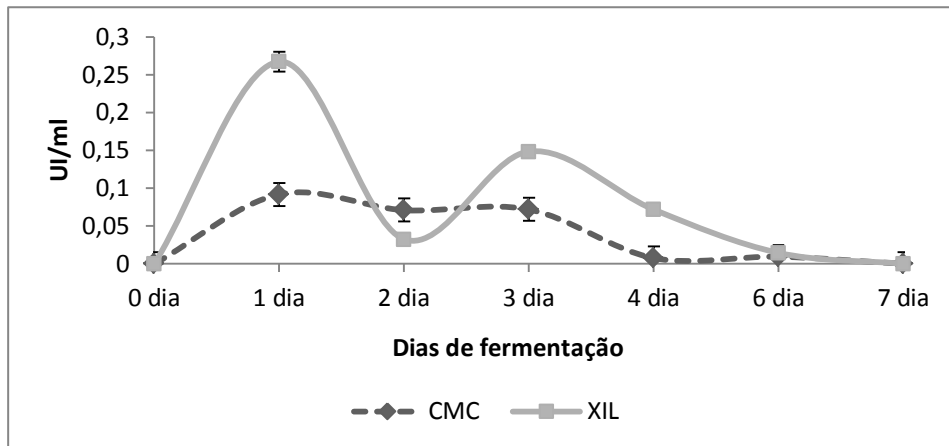
**Figura 14** Perfil enzimático de *Fusarium solani*

*Fusarium solani* obteve pico de produção enzimática, tanto para CMCCase (0,04 UI/ml) quanto para xilanase (0,06 UI/ml) no segundo dia de incubação. A expressão de proteínas (dados não mostrados) foi crescente do segundo ao quarto dia, com decréscimo até o fim do cultivo.



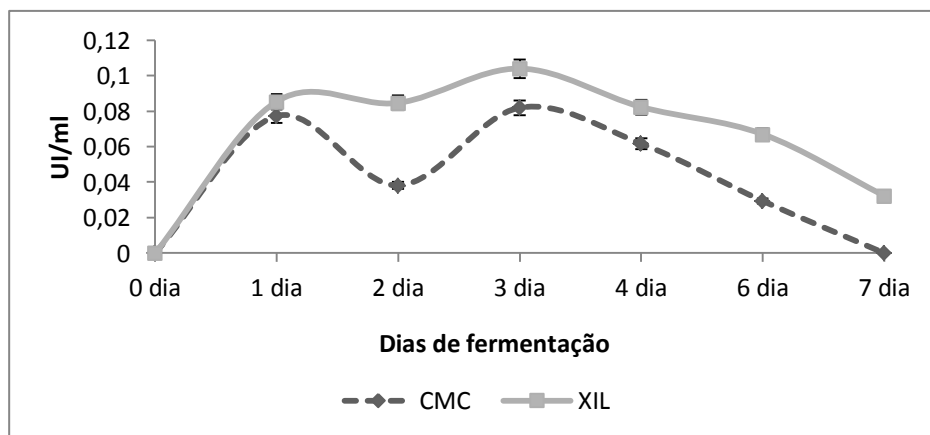
**Figura 15** Perfil enzimático de *Aspergillus japonicus*

Para *Aspergillus japonicus*, a atividade máxima de CMCCase ocorreu no primeiro dia (0,12 UI/ml), com decréscimo até o final do cultivo. Porém a partir do quarto dia de cultivo, houve crescimento da atividade de xilanase até o final, com tendência a aumentar. A atividade máxima de xilanase foi 0,57 UI/ml. A expressão de proteínas foi inversamente proporcional à atividade enzimática, com ápice no primeiro dia de crescimento e brusco decréscimo até o final.



**Figura 16** Perfil enzimático de *Penicillium chrysogenum*

Para *Penicillium chrysogenum*, a atividade de CMCase ocorreu no primeiro dia (0,09 UI/ml) de cultivo, mantendo-se estável até o terceiro dia; o ápice de atividade xilanólítica ocorreu no primeiro (0,27 UI/ml) e no terceiro dia (0,15 UI/ml). A expressão de proteínas manteve-se constante durante todo o cultivo.



**Figura 17** Perfil enzimático *Clonostachys rosea*

Para *Clonostachys rosea*, as atividades enzimáticas mantiveram-se constantes do primeiro ao sexto dia para xilanase, com médias entre 0,07 e 0,09 UI/ml, e 0,06 e 0,08 UI/ml, para CMCase do primeiro ao quarto dia. A expressão de proteínas manteve-se constante durante todo o cultivo.

O perfil geral das curvas de indução para celulase e xilanase demonstrou que o consumo dos substratos ocorre entre o primeiro e o quarto dia de fermentação, exceto para *A. japonicus* que começa a degradar a

xilana, a partir do quarto dia. A expressão de proteínas mantém-se constante durante todo o cultivo, exceto para *A. japonicus*. Os resultados obtidos são condizentes com os resultados obtidos por Monclaro (2014), na produção de xilanases, em diferentes resíduos têxteis (piolho de algodão limpo, piolho de algodão limpo tratado, pó de filtro não tratado e pó de filtro tratado). Ela verificou que, para todos os resíduos, a atividade xilanolítica e a expressão de proteínas iniciaram-se ao segundo dia e mantiveram-se constantes durante os 14 dias de cultivo. Lo Sciuto (2015) cultivou *Clonostachys byssicola* em casca de soja por 25 dias e obteve aumento da produção de celulases até o sétimo dia, mantendo-se constante até o final do cultivo. Da mesma forma, Sales et al (2010) verificaram as atividades de celulases totais de *Aspergillus aculeatus* cultivado em bagaço de cana residual, ao sétimo dia de cultivo, em pH 6,0. Sehnem et al (2006) testaram o efeito indutor de lactose para atividade de celulases em *Penicillium echinulatum*, com diferentes concentrações de celulose e lactose, sendo as maiores atividades de celulase foram detectadas nos tratamentos contendo lactose 1% e celulose 1% após o quarto dia de cultivo.

Os rendimentos de CMCase deste estudo foram considerados baixos em relação a experimentos semelhantes, tal fato se deve ao substrato CMC 1%, subestimando, portanto, as atividades específicas. Para que este não fosse um empecilho na caracterização, houve troca desse substrato para CMC 4%.

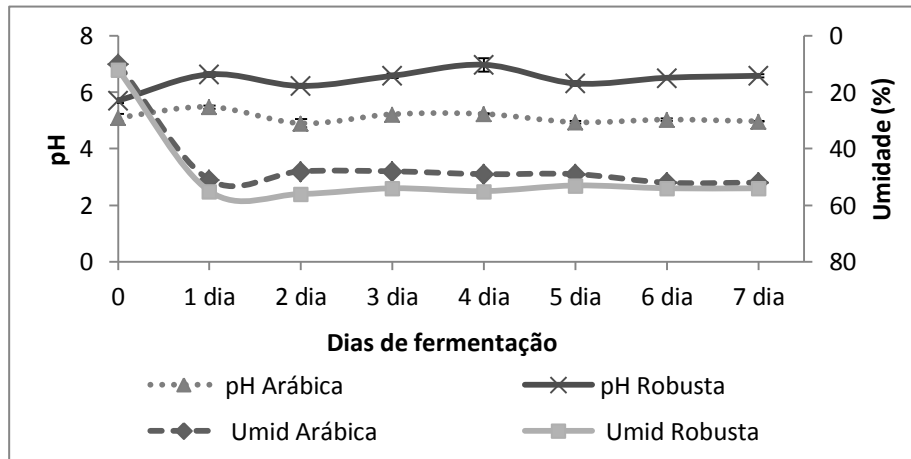
Com base nos resultados obtidos, os fungos *Clonostachys rosea* e *Aspergillus japonicus* foram selecionados para cultivo sólido das cascas de café, arábica e robusta.

### **3.2 Fermentação sólida das cascas de café arábica e robusta**

Durante o período de fermentação, um Erlenmeyer foi utilizado a cada dia de cultivo para construção de uma curva de indução sólida e acompanhamento das condições fermentativas.

Para acompanhamento da fermentação, foram utilizados como parâmetros, o pH e a umidade. Os gráficos a seguir demonstram a variação do pH e da umidade, em função dos dias de fermentação

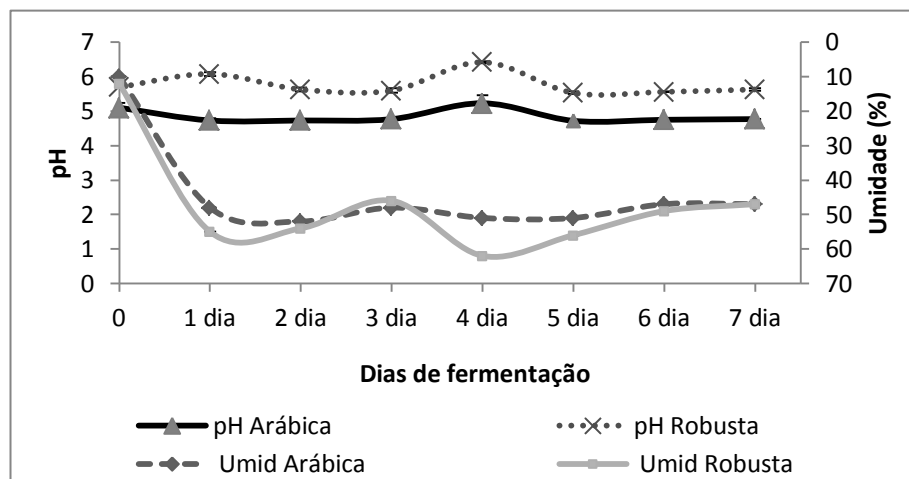
As fermentações das cascas de café, arábica e robusta, por *A. japonicus* apresentaram pequenas diferenças entre si. O pH referente à casca de café arábica oscilou entre 4,94 e 5,48, enquanto que para a casca de café robusta permaneceu entre 5,7 e 6,98, havendo poucas modificações em relação ao pH natural delas, 5,1 e 5,7 para arábica e robusta, respectivamente. Quanto à umidade, para arábica conservou-se em média de 50% e 54% para robusta.



**Figura 18** Variação da umidade e pH durante fermentação sólida por *Aspergillus japonicus*

As cascas de café arábica e robusta não apresentaram diferenças significativas durante a fermentação por *C. rosea*, o pH manteve-se estável durante todo o processo, com médias entre 4,72 e 5,23, em café arábica e 5,53 e 6,42, em casca de café robusta. A umidade manteve-se estável em torno de 49% para arábica e 52% para robusta.





**Figura 19** Variação da umidade e pH durante fermentação sólida por *Clonostachys rosea*.

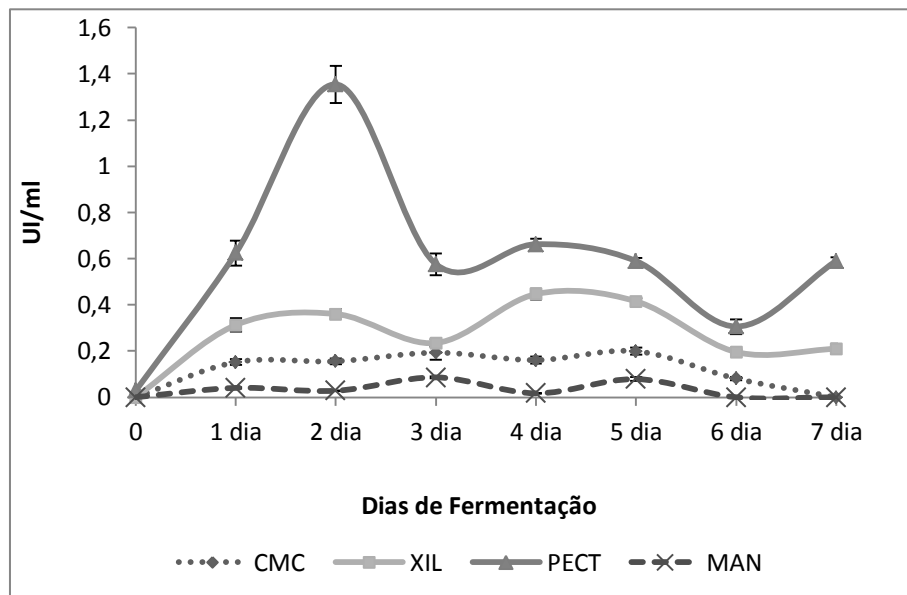
Fatores bioquímicos e fisicoquímicos como o pH, a umidade, o tamanho da partícula do substrato e temperatura de incubação são importantes (alguns críticos) durante o processo de fermentação sólida, tendo em vista o metabolismo do microrganismo e o produto de interesse (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Alguns estudos confirmam que a faixa de umidade entre 50 e 60% corresponde a maiores níveis de atividades enzimáticas. Delabona (2011) testou vários resíduos agroindustriais e diferentes umidades para produção de endoglucanases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*, observou que a 50% *A. niger* obteve valor máximo de 78,3 U/g cultivado em farelo de trigo. Leifa, Pandey e Soccol (2000) analisaram diferentes níveis de umidade para crescimento de *Lentinula edodes* em casca de café; objetivando detoxificação dessa casca, eles verificaram que o substrato contendo de 55 - 60% de umidade resultaram em máximo de proteínas e mínimo de fibras. Chakradhar, Javeed, e Sattur (2009) buscaram produzir nigerloxina e glicoamilase através do crescimento de *Aspergillus niger* em farelo de trigo, notaram um maior rendimento do produto, a uma umidade de 65% e pH flutuando entre 4 e 5. Todos estes resultados corroboram com Pandey (2003) que afirma que altas umidades no processo de fermentação em estado sólido levam a uma formação subótima do produto, devido à redução da porosidade do substrato, decréscimo da transferência de massa e oxigênio, além de baixa disponibilidade de nutrientes para a cultura.

Além do acompanhamento das condições fermentativas, foram avaliadas as atividades enzimáticas durante o cultivo.

As atividades enzimáticas mais evidentes, durante o cultivo de CCA por *C. rosea*, foram as pectinases e as xilanases (Figura 20). As pectinases alcançaram atividade máxima (1,35 UI/ml), no segundo dia de cultivo, mantendo-se constante a partir do terceiro dia. As xilanases permaneceram com atividades constantes (0,44 UI/ml) a partir do primeiro dia até o fim do cultivo. Celulases e mananases apresentaram baixas atividades, porém constantes durante toda a fermentação, 0,15 UI/ml e 0,08 UI/ml para CMCase e mananase, respectivamente.

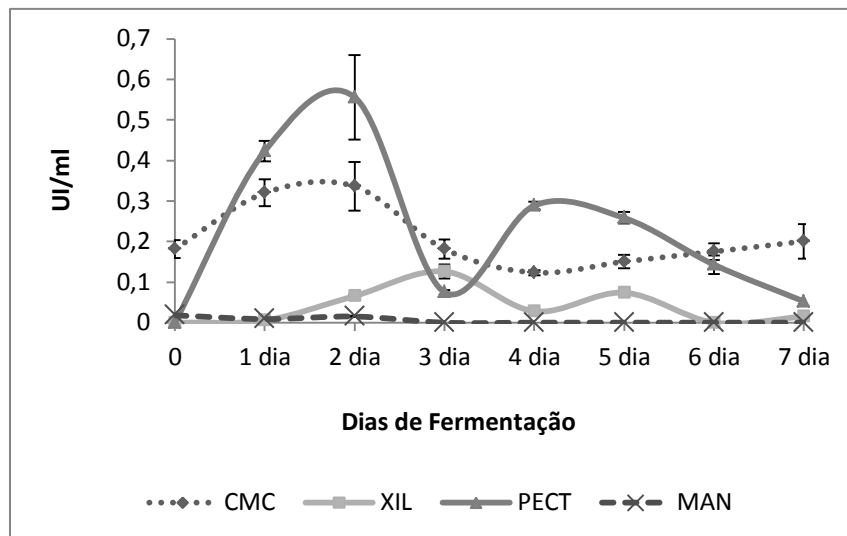
A expressão de proteínas (dados não mostrados), manteve-se constante a partir do segundo dia.



**Figura 20 Perfil enzimático da fermentação de casca de café arábica por *Clonostachys rosea*.**

Para a fermentação em CCR por *C. rosea*, as enzimas que apresentaram maiores atividades foram as pectinases e as celulasas, seguidas pelas xilanases e mananases (Figura 21). A atividade máxima de pectinase ocorreu no segundo dia (0,55 UI/ml), com redução significativa até o fim do cultivo. A atividade máxima de CMCase ocorreu no segundo dia (0,34 UI/ml), permanecendo constante durante toda fermentação. A atividade de xilanase foi detectada somente do segundo ao quinto dia, com atividade máxima de 0,13 UI/ml, no terceiro dia. A atividade de mananase foi insignificante.

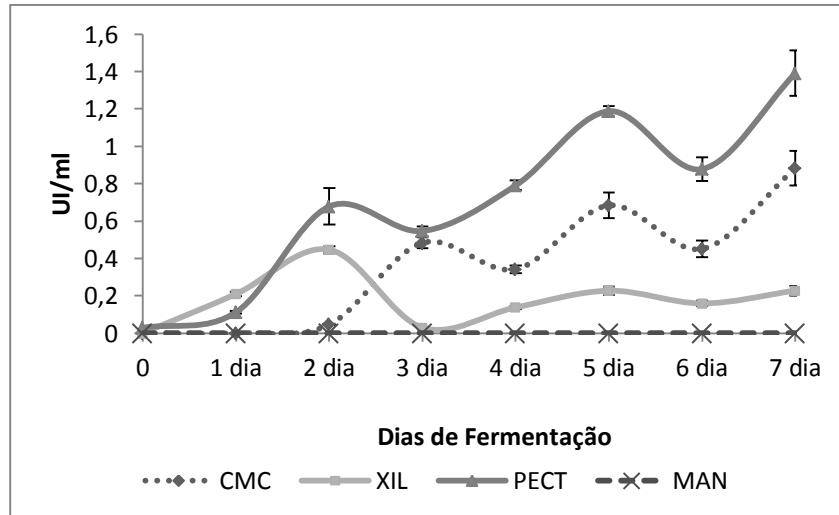
A expressão de proteínas alcançou picos máximos nos segundo e quarto dias de fermentação.



**Figura 21 Perfil enzimático da fermentação de casca de café robusta por *Clonostachys rosea***

As atividades enzimáticas obtidas a partir da fermentação de CCA por *A. japonicus* apresentaram perfis semelhantes para pectinases e celulasas (Figura 22). As pectinases foram expressas a partir do primeiro dia mantendo-se em constante elevação até o fim do cultivo, atingindo sua atividade máxima de 1,39 UI/ml. Para CMCase, sua expressão teve início no segundo dia, seguindo o perfil da pectinase, até atingir pico de atividade (0,88 UI/ml) no sétimo dia de fermentação. A atividade de xilanase foi máxima no segundo dia (0,45 UI/ml) e manteve-se constante até o final do cultivo. Não houve atividade de mananase.

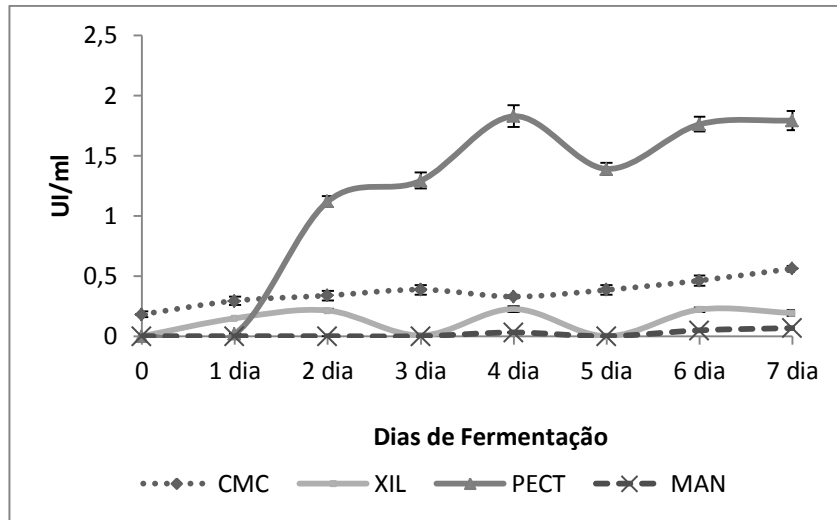
A expressão de proteínas alcançou pico no primeiro dia, com posterior redução e constância.



**Figura 22 Perfil enzimático da fermentação de casca de café arábica por *Aspergillus japonicus*.**

Para a fermentação de CCR por *A. japonicus*, a única atividade enzimática em evidência pertence à pectinase, expressa no primeiro dia obtendo sua atividade máxima no quarto dia (1,83 UI/ml), mantendo-se constante até o final do cultivo. A atividade de CMCase permaneceu constante durante toda a fermentação, atingindo sua atividade máxima no sétimo dia (0,56 UI/ml). A atividade de xilanase prosseguiu constante com atividades médias de 0,22 UI/ml, durante todo o cultivo. Não houve atividade de mananase.

A expressão de proteínas alcançou pico no primeiro dia, com posterior redução e constância.



**Figura 23 Perfil enzimático da fermentação de casca de café robusta por *Aspergillus japonicus***

Em resumo, houve diferenças de rendimentos das atividades enzimáticas entre os dois substratos utilizados. Ambos apresentaram altos índices de produção de pectinases, porém para as atividades de CMCase e xilanase, a casca de café arábica obteve melhores resultados em relação à casca de café robusta. Com relação aos fungos utilizados, *A. japonicus* apresentou maiores produções enzimáticas comparadas às produções de *C. rosea*, exceto para xilanase em CCA. A atividade de mananase foi insignificante para ambos os fungos e substratos.

Essas diferenças estão diretamente relacionadas à composição dos substratos utilizados. Pandey, Soccol e Mitchell (2000) afirmam que o substrato escolhido para a FES deve fornecer todos os nutrientes necessários para crescimento do microrganismo de interesse, para ser considerado um substrato ideal, porém alguns nutrientes podem estar disponíveis em concentrações subótimas ou mesmo ausentes nestes substratos, havendo a necessidade de suplementação externa, ser for o caso.

Para evidenciar as diferenças entre as cascas de café, arábica e robusta, as análises bromatológica composicionais são apresentadas no item 3.3.

### 3.3 Análises químicas e físico-químicas da casca de café

As composições bromatológica de ambas as cascas de café são apresentadas na tabela a seguir.

**Tabela 6 Composição bromatológica de CCA e CCR fermentadas e não fermentadas**

	Arábica		Robusta	
	Não Fermentada	Fermentada	Não Fermentada	Fermentada
<b><i>Clonostachys rosea</i></b>				
pH	5,10	4,81	5,70	5,78
Extrato Etéreo (%)	1,23	1,06	1,53	1,10
Proteína Bruta (%)	8,4	3,67	10,15	4,46
FDA (%)	47,25	21,75	55,75	29,8
FDN (%)	60,6	30,85	62,85	31,5
Cinzas (%)	6,35	1,95	7,7	2,3
<b><i>Aspergillus japonicus</i></b>				
pH	5,10	5,11	5,70	6,54
Extrato Etéreo (%)	1,23	0,95	1,53	1,18
Proteína Bruta (%)	8,4	3,72	10,15	4,55
FDA (%)	47,25	29,0	55,75	27,3
FDN (%)	60,6	39,2	62,85	32,25
Cinzas (%)	6,35	3,75	7,7	2,05

A composição bromatológica da casca de café varia conforme a espécie analisada, como pode ser observada pelos dados deste estudo. Segundo Baggio (2006) e Souza et al. (2001), os parâmetros de proteínas, fibras, extrato etéreo e quantidades mínimas e máximas de nutrientes são correspondentes aos valores obtidos. De acordo com esses autores, as quantidades máximas e mínimas desses nutrientes são: 7,25% a 11,7% de proteína bruta, 1,4% a 6% de extrato etéreo, 6,5% a 7,8% de cinzas, 48,4% a 51,7% de FDN e 33% a 42% de FDA.

Quando comparadas as fermentações de ambos os substratos, podemos notar o grau de recalcitrância de cada um deles e como os fungos, em especial, lidaram com este aspecto.

Ambos os fungos reduziram significativamente todos os compostos analisados, porém, quando contrapostos, houve maiores diferenças entre os substratos: *C. rosea* degradou em média 54% de FDA e 49% de FDN em CCA, enquanto para CCR, 46% de FDA e 50% de FDN; *A. japonicus* deteriorou 39% de FDA e 35% de FDN em CCA, enquanto para CCR, 51% de FDA e 49% de FDN. Esses resultados influenciam diretamente na quantidade de enzimas específicas expressas para degradação dos substratos em questão, quanto mais recalcitrante o substrato, maior o tempo de exposição e expressão das enzimas de interesse.

Uma ampla gama de estudos para detoxificação da casca de café por microrganismos tem sido realizada, devido à presença de compostos fenólicos como: taninos e a cafeína que impedem esses resíduos de serem apropriadamente utilizados pela indústria (OROZCO et al., 2008). Em estudo realizado por Leifa, Pandey e Soccol (2000), a casca de café foi utilizada como substrato para crescimento de *Lentinula edodes* em condições semelhantes a do presente estudo. Eles evidenciaram um aumento do conteúdo proteico durante o curso da fermentação enquanto o conteúdo de fibras era reduzido substancialmente. Brand et al (2000) buscaram eliminar os compostos fenólicos da casca de café, por diferentes cepas de fungos filamentosos (*Rhizopus*, *Phanerochaete* e *Aspergillus*), que apresentaram degradação parcial dos compostos com *Aspergillus sp* degradando 92% de cafeína e 70% de taninos, em condições de pH 4,0 e 28°C. Eles verificaram ainda que a degradação desses tipos de compostos fenólicos está diretamente relacionada ao pH do substrato e ao tempo de fermentação.

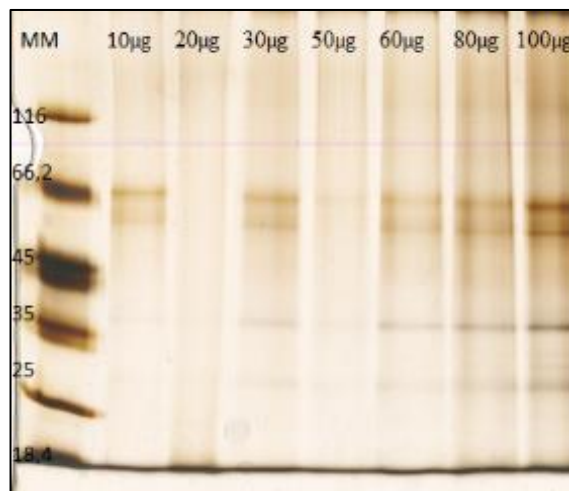
Com base nos resultados obtidos, podemos supor que houve detoxificação dos compostos fenólicos, através da fermentação pelos microrganismos em questão, porém, para afirmarmos, serão necessários testes de compostos fenólicos, e esta análise está entre as perspectivas futuras deste trabalho.

### 3.4 Purificação das enzimas de interesse

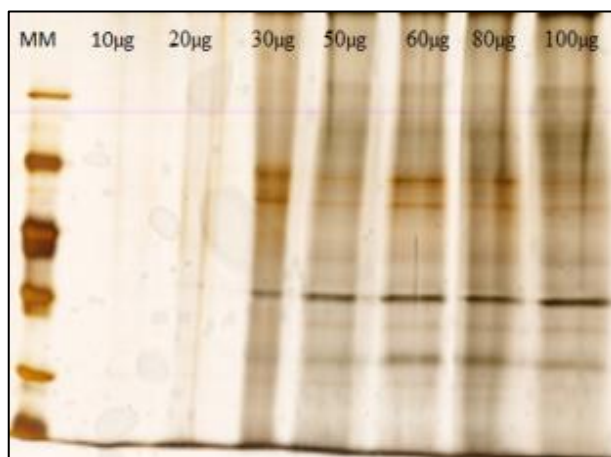
Para purificação das celulases, xilanases e pectinases, foi selecionado o extrato bruto obtido da fermentação de CCA por *A. japonicus*, submetido à ultrafiltração, através de membrana de retenção 30 KDa.

Pelo fato das atividades específicas de pectinase (3,87 UI/ml), xilanase (1,28 UI/ml) e celulase (2,29 UI/ml) terem aumentado em relação ao extrato bruto (0,73 UI/ml – celulase, 0,50 UI/ml – xilanase e 1,21 UI/ml – pectinase) e sido maiores que no ultrafiltrado (0,02 UI/ml – celulase, 0,13 UI/ml – xilanase e 0,36 UI/ml – pectinase), a amostra de concentrado foi escolhida para prosseguir com o processo de purificação. A atividade específica de uma enzima constitui parâmetro importante de avaliação da secreção em comparação à quantidade total de proteínas secretadas. Enzimas com atividade específica elevada apresentam, a princípio, processo de purificação mais facilitado (GOMES, 2014). A ultrafiltração foi acompanhada por perfis das proteínas em gel SDS-PAGE e zimogramafia, apresentados a seguir.

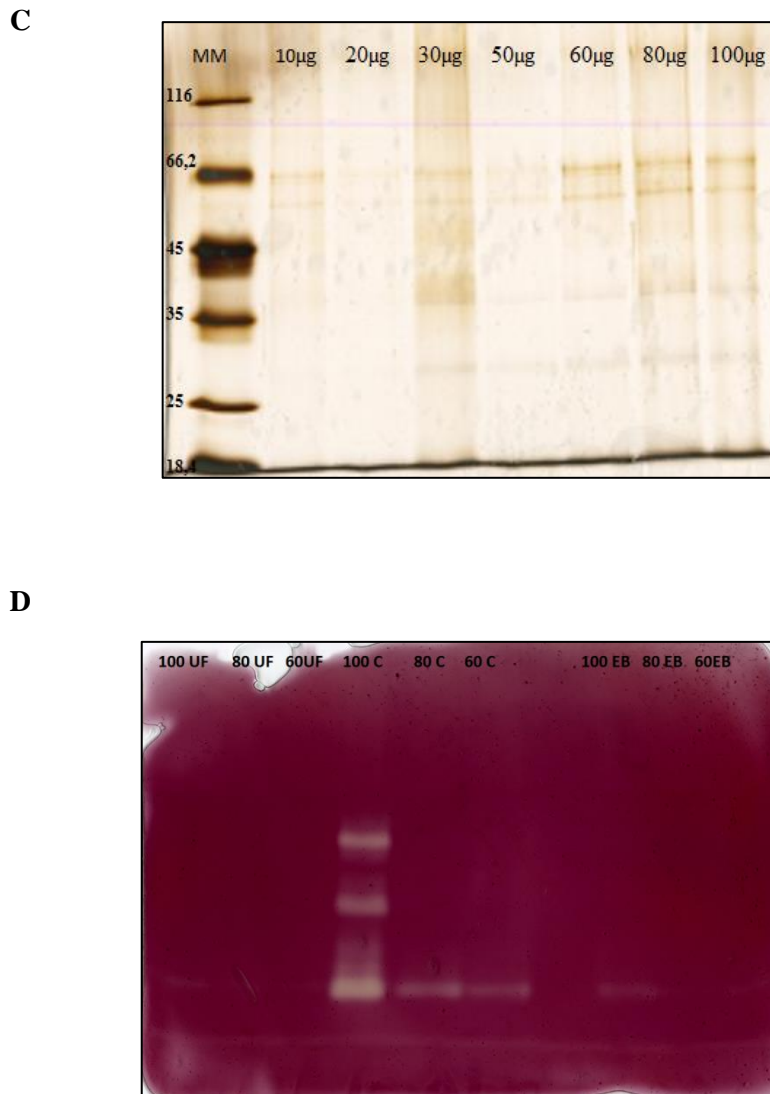
**A**



**B**



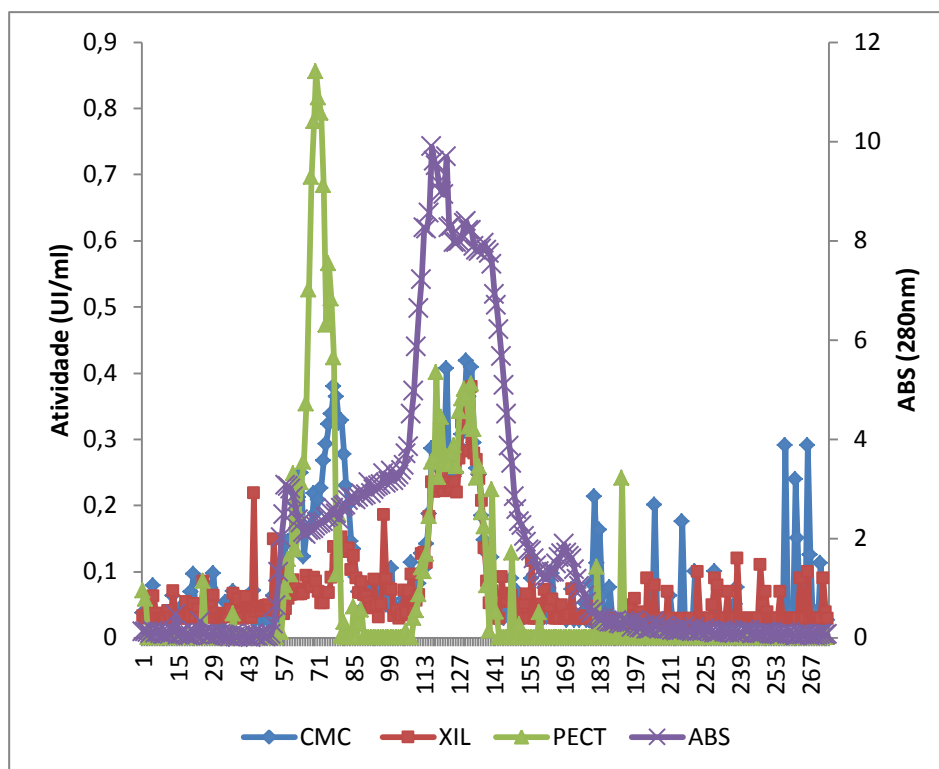




**Figura 24 Perfis proteicos de acompanhamento de ultrafiltração** onde (A) Perfil enzimático Extrato Bruto em diferentes concentrações proteicas ( $\mu\text{g/ml}$ ) (B) Perfil enzimático Concentrado em diferentes concentrações proteicas ( $\mu\text{g/ml}$ ) (C) Perfil enzimático Ultrafiltrado em diferentes concentrações proteicas ( $\mu\text{g/ml}$ ) (D) Zimograma co-polimerizado com CMC 4 % contendo amostras de Extrato Bruto (EB), Concentrado (C) e Ultrafiltrado (UF) em diferentes concentrações proteicas.

A fração concentrada foi então aplicada a uma coluna de cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50 (61,5 x 3 cm). Uma alíquota correspondente a 3% do volume de coluna foi aplicada em temperatura ambiente para eluição e fracionamento dessa alíquota. O perfil

de eluição é apresentado na figura 25. As atividades de pectinase, CMCase e xilanase foram obtidas em dois picos distintos entre as frações 57 – 87, denominadas Pico 1 e entre as frações 103 – 130, denominadas Pico 2. A eluição do Pico 1 ocorreu antes da eluição do pico de proteínas principal, demonstrando maior atividade específica das enzimas presentes neste pico.



**Figura 25 Perfil cromatográfico de Extrato Bruto Concentrado aplicado em coluna de exclusão molecular Sephadex G50**

Para caracterização bioquímica e condições ótimas das enzimas de interesse, amostras de extrato bruto concentrado (CONC), meio sintético de CMC (CMC), meio sintético de xilana (XIL) e picos obtidos na cromatografia de exclusão molecular (PICO 1 e PICO 2) foram avaliadas quanto à temperatura ótima, pH ótimo e termoestabilidade.

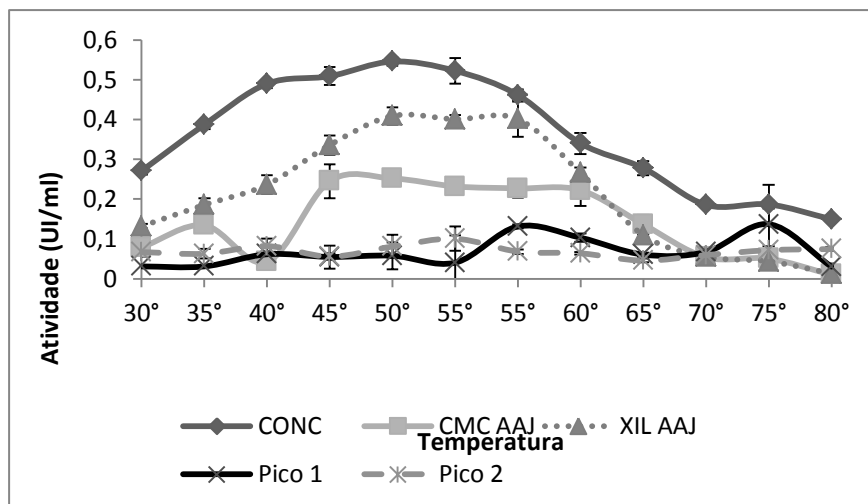
### 3.5 Caracterização das amostras semipurificadas

Os efeitos da temperatura sobre as atividades enzimáticas foram avaliados separadamente, para cada enzima de interesse, e estão ilustrados na figura 26.

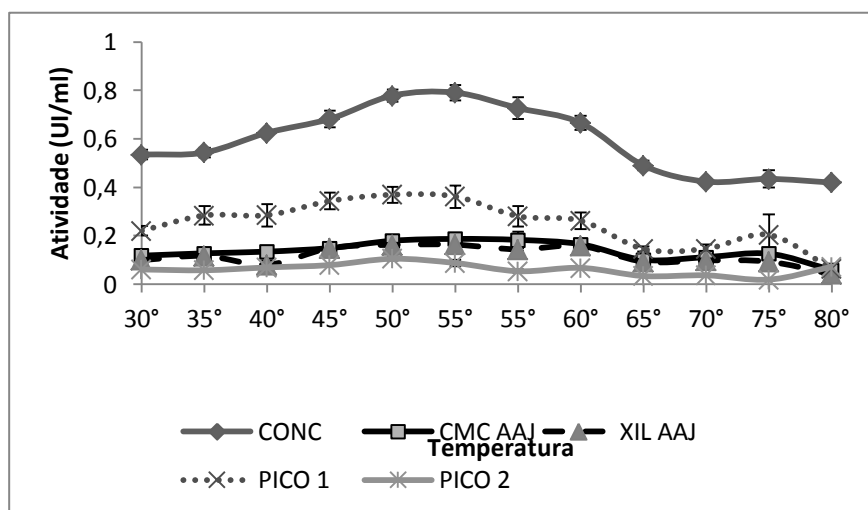
Para xilanase as maiores atividades foram registradas a 50°C, em geral. Foram notados comportamentos específicos de cada amostra. As amostras de cultura submersa CMC e XIL apresentaram atividades constantes entre 45°C e 60°C. O extrato bruto concentrado demonstrou atividade satisfatória, a partir de 40°C, obtendo atividade máxima a 50°C. Os picos 1 e 2 apresentaram atividades semelhantes, com atividades máximas a 55°C e 75°C.

Com relação às celulasas, uma maior estabilidade das atividades em todas as amostras foi apresentada, com atividade máxima do CONC a 50°C.

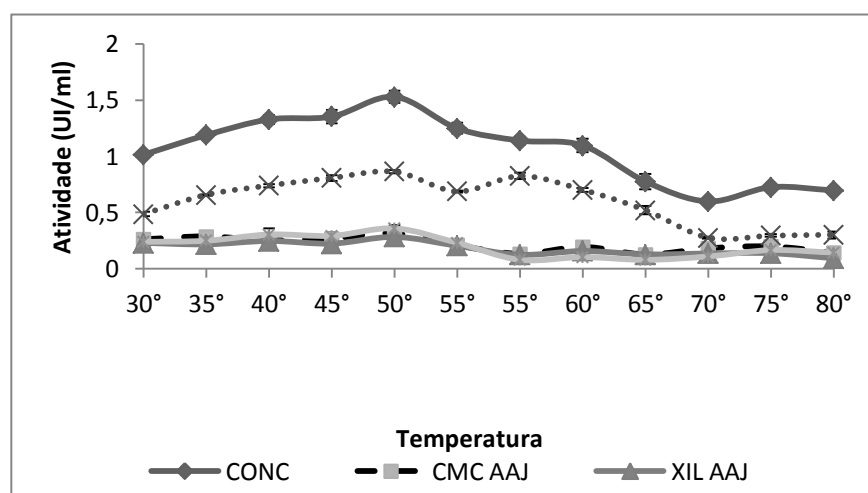
Para pectinases as amostras CONC e PICO 1 apresentaram atividade máxima a 50°C e 55°C (pico 1), enquanto para todas as outras amostras, uma estabilidade térmica foi constatada até 55°C.



A



B



C

**Figura 26** Efeito da temperatura sobre pectinases, celulasas e xilanases de diferentes amostras onde (A) efeito da temperatura sobre xilanases (B) efeito da temperatura sobre celulasas e (C) efeito da temperatura sobre pectinases.

Com relação à temperatura, percebeu-se, portanto, que para todas as enzimas presentes em todas as amostras, a temperatura de 50°C possibilitou as atividades máximas dessas enzimas. Uma estabilidade térmica foi ainda assinalada na faixa de temperatura entre 40°C e 60°C, retendo pelo menos 70% das atividades específicas.

Estudos anteriores comprovam que a faixa de temperatura ótima de atividades enzimáticas do gênero *Aspergillus* corresponde a 50 e 60°C. SILVA (2014) avaliou a produção de endo- $\beta$ -1,4-xilanases em bagaço de cana por *Emericella nidulans* (teleomorfo de *Aspergillus nidulans*) e após purificação XynA apresentou atividade máxima quando incubada a 55°C.

Martins (2012) caracterizando o secretoma de *A. niger* cultivado em bagaço de cana observou que a temperatura ótima para atuação das xilanases foi determinada a 45°C, para pectinases e CMCases a temperatura ideal foi a 50°C. Ximenes, Felix e Ulhoa (1996) caracterizaram uma  $\beta$ -glicosidase do fungo termofílico *A. fumigatus* cultivado em meio líquido, avaliando a temperatura ótima para hidrólise de  $\rho$ -NPG e celobiose a 65°C e 60°C, respectivamente.

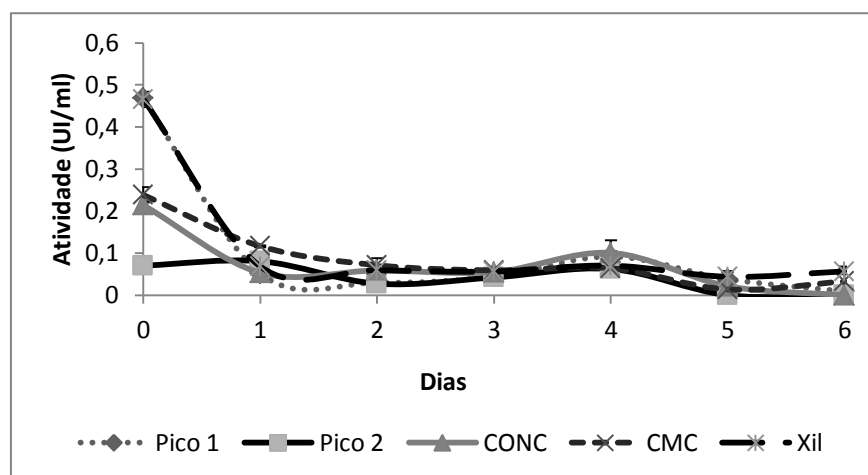
Nesse contexto, pode-se inclusive comparar o comportamento das atividades enzimáticas oriundas de diferentes fermentações, a fermentação submersa (meios sintéticos CMC e XIL) e fermentação em estado sólido (CONC, PICO 1 e PICO 2).

Sabe-se que, em fermentações em estado sólido, os rendimentos de produtos são obtidos em altas concentrações, comparadas às quantidades de substratos usadas e que os produtos dessas fermentações apresentam características distintas daquelas produzidas por fermentações submersas, tais como: maiores atividades, alto grau de estabilidade térmica e menor custo de produção (PANDEY, 1999). Partindo desse pressuposto, alternativas para melhorias nas características dos produtos gerados por FSm têm sido investigadas. A adição de Tween 80 0,1% (v/v) aos meios sintéticos, CMC e XIL, prova a sua eficiência como agente desagregador, na melhoria das atividades xilanolíticas e celulolíticas e aumenta a estabilidade térmica dessas enzimas, através da desagregação das enzimas e exposição de alguns sítios catalíticos, como demonstrado neste estudo. Monclaro (2014) observou aumento da atividade específica de até 12 vezes, sobre sete xilanases purificadas de *A. oryzae*. DO et al (2013) verificaram aumento de 27% da atividade xilanolítica de *A. niger* com adição de 2% de Tween 80, ao meio de cultura. Esses resultados vão de encontro ao suposto por Okino et al (2013), os quais demonstraram que a presença desse surfactante aumenta as taxas de hidrólise de celulasas somente em condições de agitação, não atuando sobre condições estáticas de fermentação. Eles observaram que na ausência de Tween 80, há um rápido decréscimo das concentrações protéicas, a 50°C, enquanto que na presença deste, o declínio ocorre de forma mais suave.

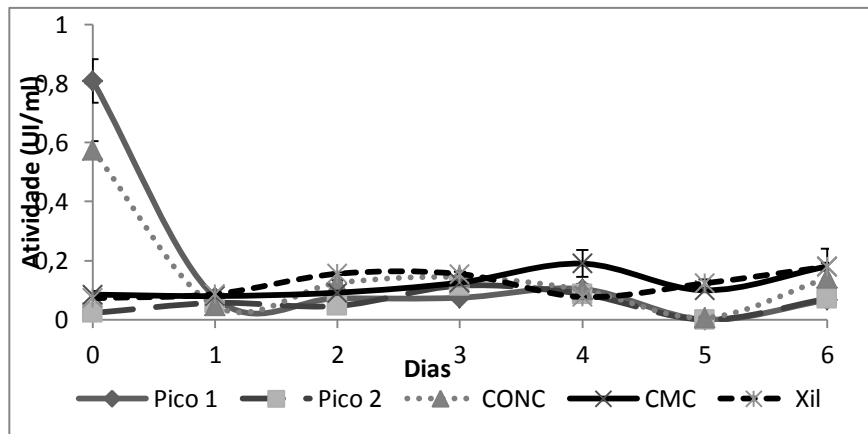
Este fato pode ser observado neste estudo, através da análise de termoestabilidade, no qual as enzimas foram expostas a 50°C, por seis dias.

O comportamento de cada enzima, em especial está ilustrado na figura 27. É importante notar que embora as amostras sejam oriundas de diferentes fermentações, a estabilidade térmica demonstrada por elas obteve perfil semelhante, graças ao surfactante Tween 80 presente nas amostras CMC e XIL advindas de FSm, como das amostras CONC, PICO 1 e PICO 2, advindas da FES.

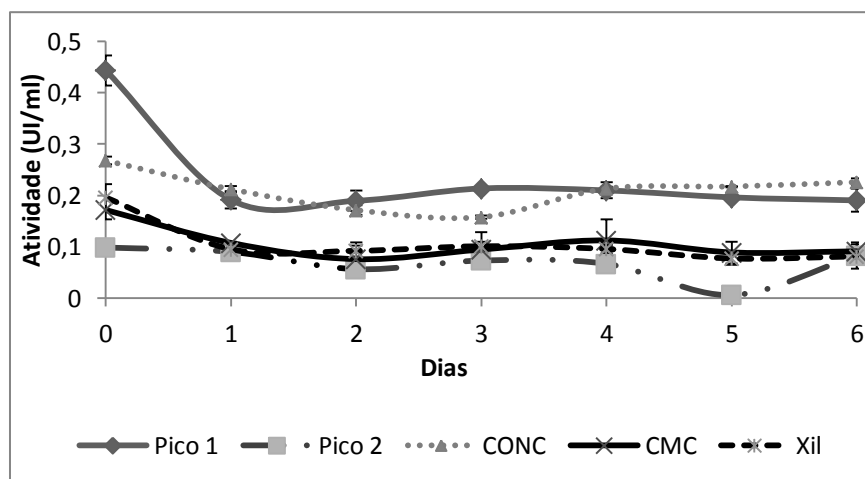
A associação entre enzimas para degradação de um substrato afeta tanto a taxa de rendimento do produto liberado pelo coquetel de enzimas como a soma de produtos liberados pelas enzimas individuais, quando usadas separadamente na mesma quantidade na mistura. Essas associações afetam de modo significativo as características bioquímicas da mistura, como demonstrado por Li et al. (2014). Eles avaliaram a existência de sinergismo entre celulases e xilanases por substratos específicos e conteúdo de xilana para hidrólise de bagaço de cana, resultante de diferentes pré tratamentos; não houve sinergismo entre celulases e pectinases. Resultado semelhante foi encontrado neste estudo, como observado pela figura 27 C.



A



B

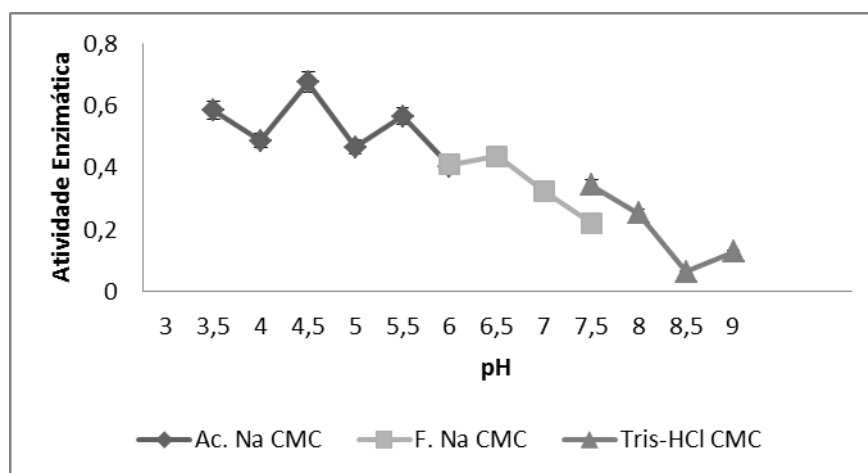


C

**Figura 27 Perfis enzimáticos correspondentes à termoestabilidade a 50°C por seis dias, onde (A) perfis de xilanases (B) perfis de celulases e (C) perfis de pectinases.**

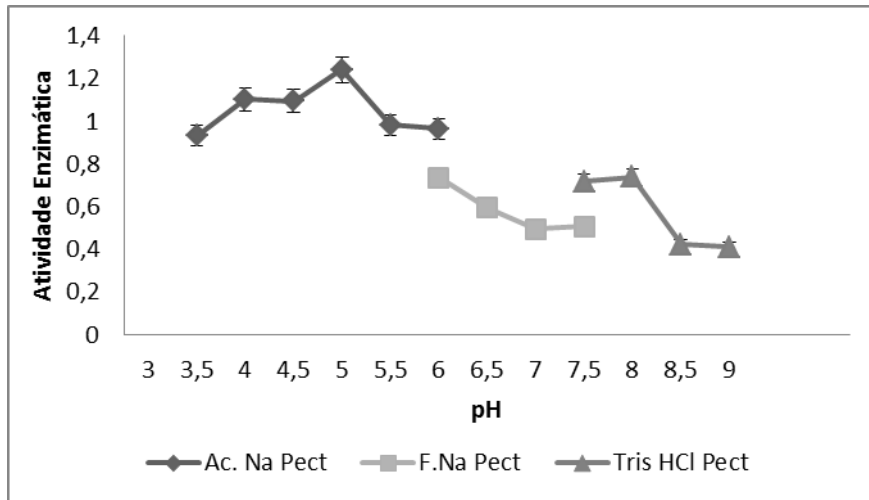
Em relação ao pH, as enzimas apresentaram amplas atuações com maiores atividades quando em faixa ácida – neutra. As CMCases, tal como as xilanases, manifestaram atuação preferencial em pHs ácidos e estabilidade em pHs neutros, variando de 3,5 a 6,0 para CMCases e 4,5 a 6,0 para xilanases. As pectinases não apresentaram padrões de atividade ótima em uma faixa específica de pH. As mudanças na distribuição das cargas na superfície da enzima, provavelmente afetam sua conformação tridimensional, alterando sua atividade enzimática (MARTINS, 2012). Os efeitos dos pHs sobre a atividade enzimática estão ilustrados na figura 28.

As enzimas fúngicas são geralmente estáveis na faixa de pH de 3,0 a 10, apresentando maior atividade no intervalo de pH de 4,0 a 7,0 (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). Xilanases não purificadas de *A. terreus* cultivado em bagaço de cana foi mais ativa em pH 5,0, para piolho de algodão, em pH 4,5 e 6,0, enquanto que para casca de soja, pH 6,5 (MOREIRA, 2013). Uma endo- $\beta$  1,4-xilanase purificada de *A. niger* apresentou pH ótimo a 7,0 (DO et al., 2013). Uma lacase extracelular produzida por *Corioloopsis byrsina* cultivada em farelo de trigo e bagaço de cevada, apresentou pH ótimo a 4,5 e 20% de sua atividade, em pH 7,0 (GONÇALVES, 2010). Uma mananase semipurificada de *Penicillium fellutanum* apresentou pH ótimo de 3,5, contra um pH ótimo de 5 – 6, da mesma enzima, em sua fração concentrada (GOMES, 2014).

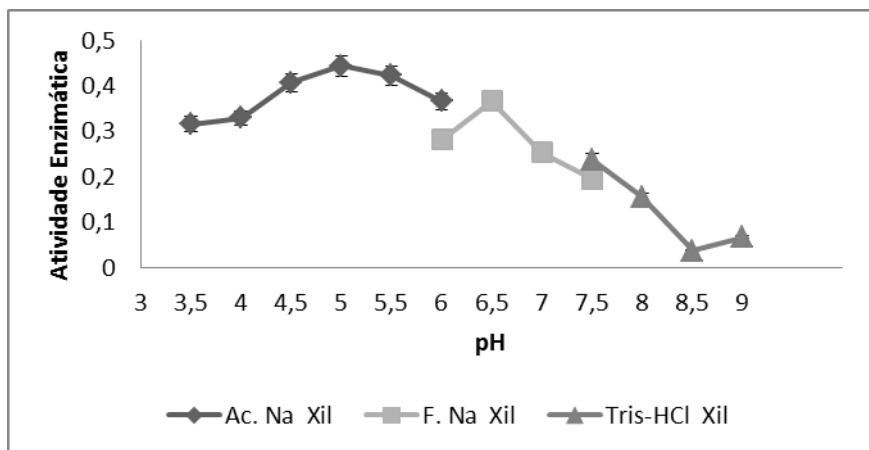


A



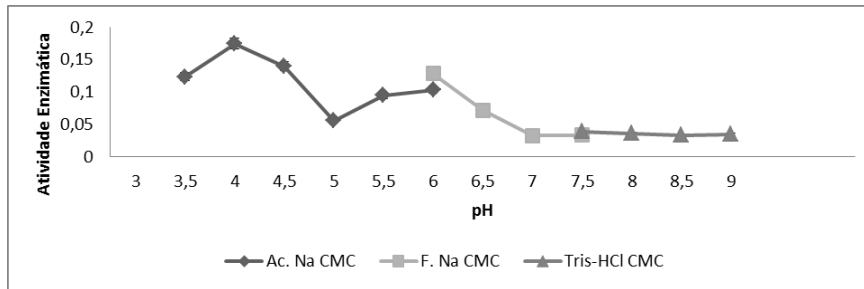


B

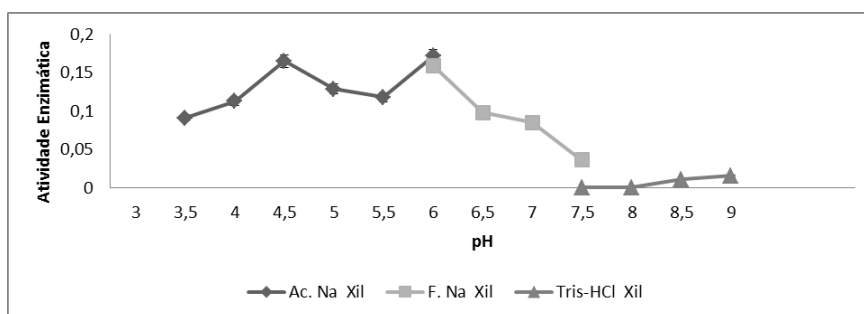


C

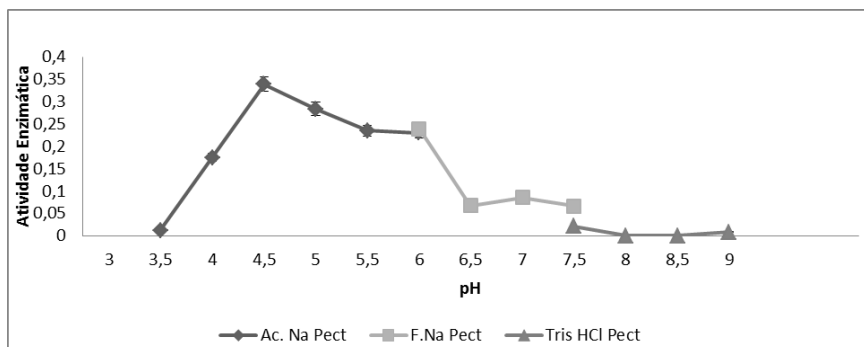
**Figura 28** Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (A) efeito do pH sobre CMCCase de CONC (B) efeito do pH sobre xilanase de CONC (C) efeito do pH sobre pectinase de CONC



D

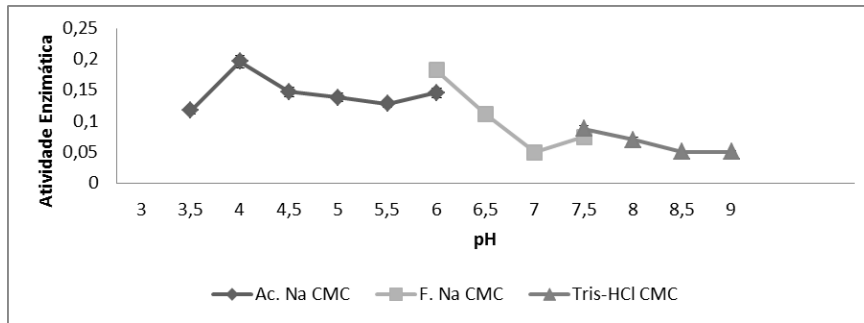


E

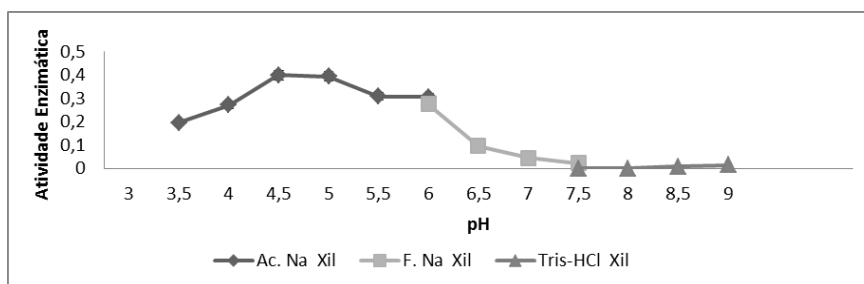


F

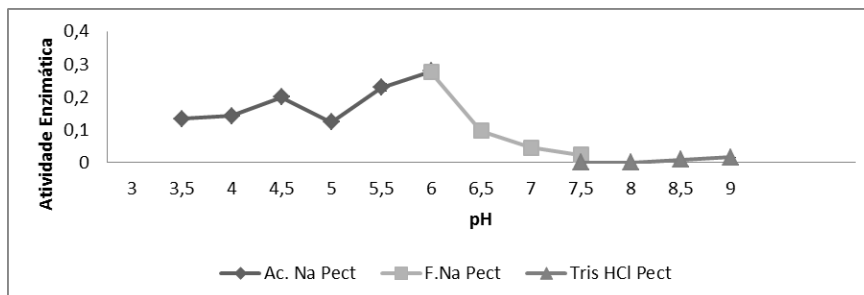
**Figura 29** Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (D) efeito do pH sobre CMCase de CMC (E) efeito do pH sobre xilanase de CMC (F) efeito do pH sobre pectinase de CMC



G

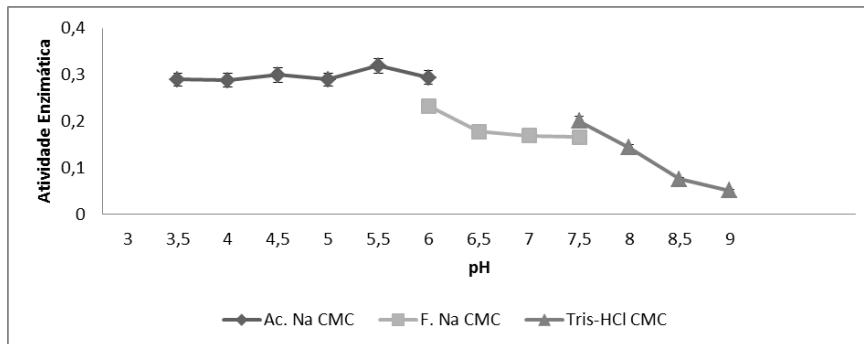


H

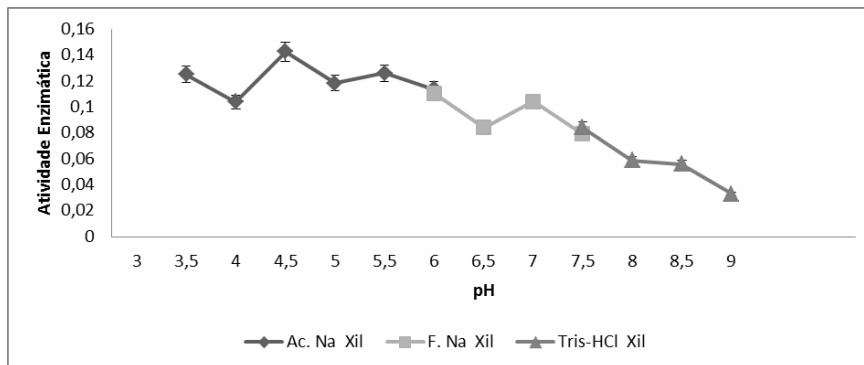


I

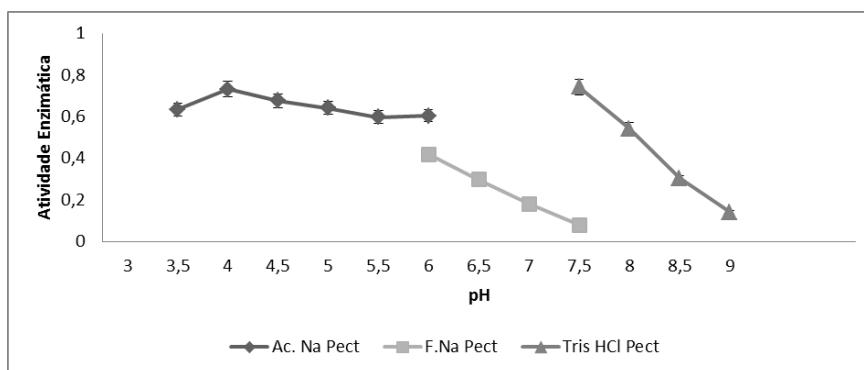
**Figura 30** Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (G) efeito do pH sobre CMCase de XIL (H) efeito do pH sobre xilanase de XIL (I) efeito do pH sobre pectinase de XIL



J

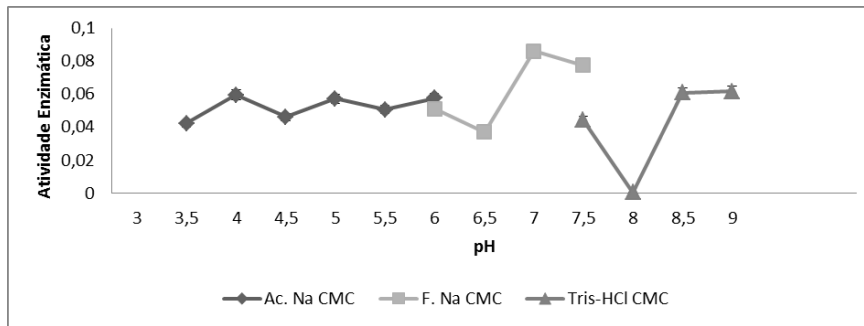


K

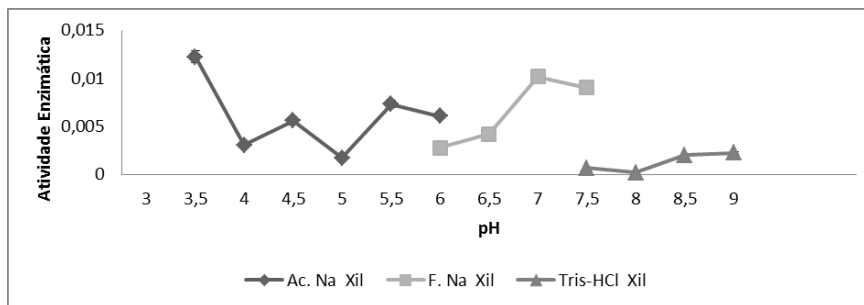


L

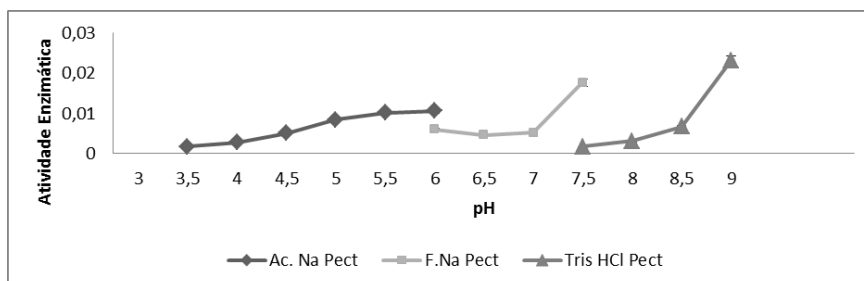
**Figura 31** Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (J) efeito do pH sobre CMCase de PICO 1 (K) efeito do pH sobre xilanase de PICO 1 (L) efeito do pH sobre pectinase de PICO 1



M



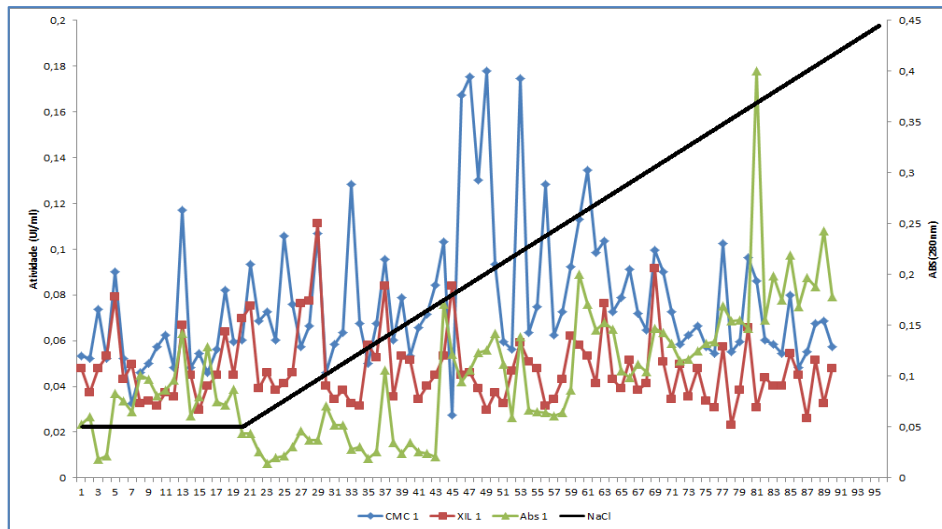
N



O

**Figura 32** Efeito do pH ótimo sobre diferentes enzimas de diferentes amostras onde (M) efeito do pH sobre CMCase de PICO 2 (N) efeito do pH sobre xilanase de PICO 2 (O) efeito do pH sobre pectinase de PICO 2

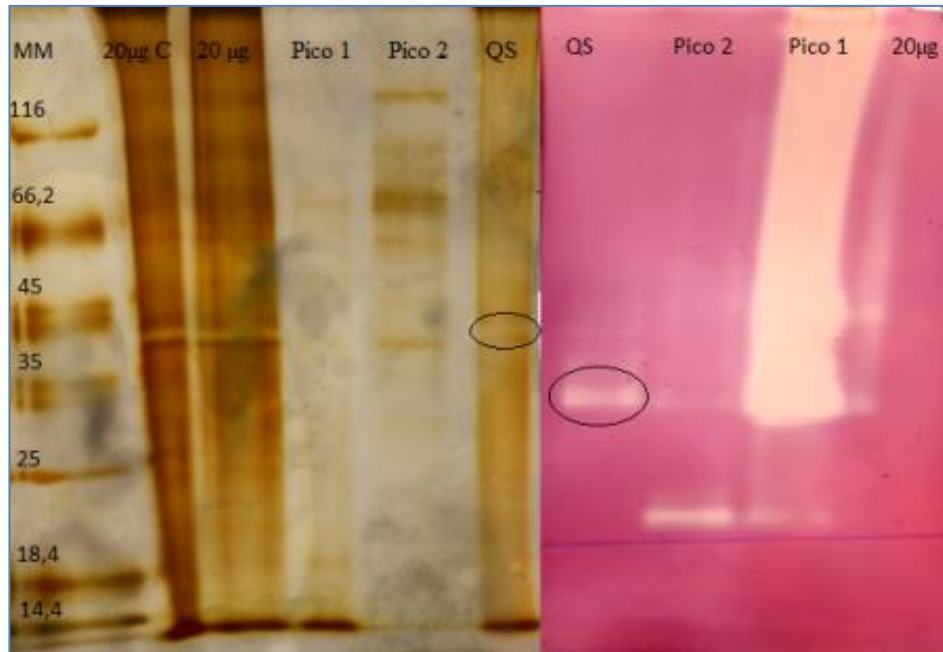
Após a cromatografia de exclusão molecular, a amostra corresponde ao PICO 1 foi precipitada por sulfato de amônio, 70%, ressuspensa em tampão citrato de sódio 50mM e, então, submetida à cromatografia de troca iônica em coluna *Q Sepharose*. O perfil cromatográfico da eluição está ilustrado na figura 29.



**Figura 33 Perfil cromatográfico de Pico 1 em coluna Q Sepharose.**

A partir da análise da figura 29, é possível identificar um pico de atividade de CMCase co-eluído dentro do gradiente de NaCl. Esse fato permite-nos concluir que a enzima ligou-se à coluna aniônica de forma que foi necessária a atuação de forças iônicas, sobre a superfície da enzima, sugerindo que esta proteína apresente carga positiva quando em pH 7, ou seja, apresenta ponto isoelétrico maior que 7.

Para constatação da semipurificação da CMCase foram confeccionados géis SDS-PAGE e Zimograma das frações CONC, PICO 1, PICO 2 e Q Sepharose. Conforme ilustração na figura 30.



**Figura 34** Perfil eletroforético em gel de acrilamida 12% das frações cromatográficas oriundas de *Sephadex G 50* e *Q Sepharose*.

Através de análise do gel de poliacrilamida e Zimograma, pode-se determinar a massa molecular de uma endo-1,4- $\beta$ -glicanase ativa semipurificada, com aproximadamente 38 KDa.

O processo de purificação demanda tempo e persistência, devido às propriedades físico-químicas das enzimas. Vários fatores o influenciam, como o tampão de eluição da amostra bem como seu pH.

## 11 Considerações finais

- Os fungos *Clonostachys rosea* e *Aspergillus japonicus* possuem potencial biotecnológico para produção de holocelulases.
- A casca de arábica e a casca de café robusta são bons substratos indutores de enzimas lignolíticas.
- *Clonostachys rosea* e *Aspergillus japonicus* foram capazes de detoxificar os compostos antinutricionais e antifisiológicos das cascas de café, arábica e robusta.
- *A. japonicus* produz maiores quantidades de enzimas lignolíticas, quando cultivado em casca de café arábica.
- A temperatura ótima de pectinases, celulasas e xilanases de *A. japonicus* é de 50°C.
- O pH ótimo está em faixa ácida-neutra, 3,5 a 6,0.
- As enzimas oriundas de fermentação sólida são termoestáveis, devido a sua associação, e as enzimas advindas de fermentação submersa são estáveis, devido à ação do surfactante Tween 80.
- Uma endo-1,4- $\beta$ -glicanase ativa foi semipurificada com aproximadamente 38 KDa.

## 12 Perspectivas futuras

- Caracterização bioquímica e fisicoquímica da endo-1,4- $\beta$ -glicanase semipurificadas de *A. japonicus*.
- Caracterizar extrato bruto de *C. rosea*.
- Purificar outras holocelulases de *A. japonicus*.
- Aplicar casca de café fermentada à produção animal, na forma de rações.



**REFERÊNCIAS**

- ACUMEDIA, C. Drbc agar (7591). **NEOGEN Corporation**, Lansing, p. 6–7, Nov. 2014.
- AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, Winnipeg, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.005
- ANDRADE, K. **Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir da casca e borra de café (*Coffea arabica L.*)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- AOAC. **AOAC: Official Methods of Analysis**. Arlington, Virginia USA, 1990. (Volume 1)
- AUER, C. G. et al. Fungos em acículas da serapilheira de Floresta. **Floresta**, Curitiba, v. 36, n.3, p. 433–438, 2006.
- BÅÅTH, E. A critical examination of the soil washing technique with special reference to the effect of the size of the soil particles. **Journal of Botany**, Canadian, v. 66, n. 8, p. 1566–1569, 1988.
- BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*Coffea arabica L.*) como provável fonte de substâncias bioativas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, Colney, v.18, p. 355–383, 2000.
- BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento de fungos celulóticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Piracicaba:Universidade de São Paulo ESALQ, 2011.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Athens , v. 254, n. 1, p. 248–25, 1976.
- BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and microbial technology**, Curitiba, v. 27. n. 1-2, p.127–133, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862912>. Acesso em: 15 mar. 2015.
- BROOKES, P. C. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, Harpenden, v. 4, 1340–1351, 2010. doi:10.1038/ismej.2010.58
- CARMO, J. R. do. **Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando resíduos do processamento do café (*Coffea arabica L.*)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013.

CARVALHAL, F.; RODRIGUES, S. S.; BERCEZ, F. A. **Mata Atlântica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2015.

CARVALHO, V. G. C. Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2012.

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

CHAKRADHAR, D.; JAVEED, S.; SATTUR, A. P. Studies on the production of nigerloxin using agro-industrial residues by solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Misore, v.36, p.1179–1187, 2009. doi:10.1007/s10295-009-0599-7

CHALUPOVÁ, J. et al. Identintification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, Olomouc, v. 32, p. 230–241, 2014. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.002

CHAVES, F. et al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annals of Microbiology**, Lavras, v. 65, n. 1., fev., 2015. doi:10.1007/s13213-015-1050-0

CHELKOWSKI, J. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity*. New York: Elsevier, 1989. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=\\_1KeBQAAQBAJ&dq=fusarium&lr=&hl=pt-BR&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.br/books?id=_1KeBQAAQBAJ&dq=fusarium&lr=&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s)>. Acesso em: 23 maio 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira: Café. Brasília, 2013.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry: A review. **Journal of Food Engineering**, Vigo, v.76, n. 3, p. 291–302, 2006. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022

DAVIES, L. O. et al. Light Structures Phototroph, Bacterial and Fungal Communities at the Soil Surface. **PLoS ONE**, Coventry, v. 8, n. 7, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0069048

DELABONA, P. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

DIONISIO, F. G. et al. Aplicação de complexo enzimático lignocelulósico para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009. Maringá. **Anais...** Maringá, 2009..

DO, T. T. et al. Molecular characterization of a glycosyl hydrolase family 10 xylanase from *Aspergillus niger*. **Protein Expression and Purification**, Hanoi, v.92, n. 2, p. 196–202, 2013. doi:10.1016/j.pep.2013.09.011

DOMSCH, K. H.; GAMS, W. **Compendium of Soil Fungi**. 2.ed. London: Academic Press, 1980)

DUARTE, E. A. A. et al. Bioprospection of bacteria and yeasts from Atlantic Rainforest soil capable of growing in crude-glycerol residues. **Genetics and Molecular Research**, Ilhéus,, v.12, n. 4, p. 4422–4433, 2013.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, San Pedro, v. 46, n.2, p. 488–495, 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.028

GAUTAM, S. P. Cellulase production by pseudomonas sp . isolated f,om municipal solid waste compost. **International Journal of Academic Research**, Jabalpur, v.2, n.6, p.330–333, 2010.

GHOSE, T. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, New Delhi , v.59, p.257–268, 1987.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. Forage fiber analyses. **Agricultural Research Service**, Ithaca, v. 379, 1970.

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

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 2010.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, Chennai, v. 38, p.987–996, 2003.

HALAL, S. L. M. **Composição , processamento e qualidade do café**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2008.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da Floresta Amazônica e Otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana**. Rio de Janeiro:Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

JAYACHANDRA, T.; VENUGOPAL, C.; ANU APPAIAH, K. A. Utilization of phytotoxic agro waste— Coffee cherry husk through pretreatment by the ascomycetes fungi *Mycotypha* for biomethanation. **Energy for Sustainable Development**, Karnataka, v.15, n.1, p.104–108, 2011. doi:10.1016/j.esd.2011.01.001

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes : A review. **Process Biochemistry**, Shimla, v. 40, p. 2931–2944, 2005. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026

KASANA, R. C. et al. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram ' s Iodine. **Current Microbiology**, Palampur v. 57, n.5, p. 503–507, 2008. doi:10.1007/s00284-008-9276-8

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector : a review. **Bioresource technology**, Chandigarh , v. 77, p. 215–227, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Brasília, v.1, n. 1, p. 147–155, 2005.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, Cambridge, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Solid state cultivation – an efficient method to use toxic agro-industrial residues. **Journal Basic Microbiology**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 187–197, 2000.

LI, J. et al. Synergism of cellulase , xylanase , and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Guanzhou, v.155, p. 258–265, 2014. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.113

LIMA, M. V. et al. Preparo do café despolpado , cereja descascado e natural na região sudoeste da Bahia. **Revista Ceres**, Campo dos Goytacazes v.55, n. 2, p. 124–130, 2008.

LISBOA, C. C. **Vulnerabilidade da matéria orgânica do solo ao aumento de temperatura**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2008.

LO SCIUTO, D. Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase. Brasília: Universidade de Brasília, 2015.

MARTINS, P. A. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico**. Brasília: Universidade de Brasília, 2012.

MEDEIROS, G. A. et al. Enzimas e líquidos iônicos: uma combinação promissora para um biodiesel limpo. **Revista Virtual de Química**, Brasília, v. 5, n.1, p. 74–94, 2013. doi:10.5935/1984-6835.20130008

MERCK MILLIPORE. **Agar extracto de malte**. 105398 | Agar extracto de malte, 2014. Disponível em <[http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Agar-extracto-de-malte,MDA\\_CHEM-105398#documentation](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Agar-extracto-de-malte,MDA_CHEM-105398#documentation)>. Acesso em 26 jun. 2015.

- MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. **Research in Biotechnology**, Mubi, v. 2, n. 6, p. 21–26, 2011.
- MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 3, n. 3, p.426–428, 1959.
- MIRANDA, M. C. M. Produção de enzimas celulolíticas de fungo *Aspergillus ustus* isolados da Amazônia. In: Congresso de Iniciação Científica da UFAM, 17., 2012, Manaus. **Anais...** Manaus, 2012.
- MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em Brasília / DF.** Brasília: Universidade de Brasília, 2014.
- MOREIRA, L. R. de S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização , degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos.** Brasília: Universidade de Brasília, 2013.
- MUSSATTO, S. I. **Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes:** In Industrial Waste. Portugal: InTech's Journals, 2012.
- NIELSEN, U. N. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity – function. **European Journal of Soil Science**, Fort Collins, v. 62, p. 105–116, fev. 2011. doi:10.1111/j.1365-2389.2010.01314.x
- O'BRIEN, H. E. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples †. **Applied and Environmental Microbiology**, Durham, v.71, n. 9, p. 5544–5550, 2005. doi:10.1128/AEM.71.9.5544
- ODEGA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.
- OKINO, S. et al. Effects of Tween 80 on cellulase stability under agitated conditions. **Bioresource Technology**, Ibaraki, v. 142, p. 535–539, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.078
- OLIVEIRA, M. M. E. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Institut Pasteur**, Rio de Janeiro, v. 166, p. 102–110, 2015. doi:10.1016/j.resmic.2014.12.008
- ORMOND, J. G.; PAULA, S. R. L.; FAVEET FILHO, P. Café: (re)conquista dos mercados. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v.10, p. 3–56, set. 1999.
- OROZCO, A. L. et al. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py-GC/MS analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Madrid, v.81, n. 2, p. 247–252, 2008. doi:10.1016/j.jaap.2007.12.002

- PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- PANDA, A. et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. **Journal of Microbiological Methods**, New Delhi, 109, 93–105, 2015. doi:10.1016/j.mimet.2014.12.014
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Trivandrum, v. 13(July 2002), p. 81–84, 2003.
- PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Curitiba, v. 77, n. 1, 149–162, 1999.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Trivandrum, v. 6, n. 2, p. 153–162, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959086>. Acesso em 15 jul. 2015.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, Curitiba, v. 35, p. 1153–1169, 2000.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Thessaloniki, v. 22, p. 189–259, 2004. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.09.005
- PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. de. Diversity of Microfungi in Tropical Soils. In MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Eds.). **Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems**. Wallingford: CABI Publishing, 2008.
- PULLEMAN, M. et al. Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services — an overview of European approaches. **Environmental Sustainability**, Wageningen, v. 4, n. 10, p. 529–538, out. 2012. doi:10.1016/j.cosust.2012.10.009
- ROBERTI, R. et al. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Science**, Bologna, v.175, p. 339–347, 2008. doi:10.1016/j.plantsci.2008.05.003
- ROBI, D. et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, São Paulo, v. 13, n. 94, p. 1-12, 2013.
- RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORSNISELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, Rio Claro, v. 27, n. 2, p. 205–211, 2004.

SAENGER, M. Combustion of coffee husks. **Renewable Energy**, Hamburg, v. 23, n. 1, p. 103–121, 2001. doi:10.1016/S0960-1481(00)00106-3

SAHA, B. . (2003). Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiology Biotechnology**, Peoria, v.30, p. 279–291, 2003.

SALES, M. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Recife, 45(11), 1290–1296, 2010.

SALMONES, D., MATA, G.; WALISZEWSKI, K. N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource technology**, Xalapa v. 96, n. 5, p. 537–44, 2005. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.019

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Tlaxcala, v.27, n. 2, p.185–194, 2009. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Recife, v. 108, p. 375–385, 2010. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x

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

SANTOS, S. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SEHNEM, N. T. et al. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Applied Microbial and Cell Physiology**, Caxias do sul, v. 76, p. 163–167, 2006. doi:10.1007/s00253-005-0251-z

SHRESTHA, P. et al. Systematic Search for Cultivable Fungi That Best Deconstruct Cell Walls of *Miscanthus* and Sugarcane in the Field. **Applied and Environmental Microbiology**, Berkeley, v.77, n. 75, p. 5490–5504, 2011. doi:10.1128/AEM.02996-10

SILVA, C. O. G. *Emericella nidulans* e bagaço de cana-de-açúcar: ferramentas para produção de endo- $\beta$ -1. Brasília:Universidade de Brasília, 2014.

SILVA, J. P. da. **Caracterização da Casca de Café (*coffea arábica*, L) in natura, e de seus Produtos Obtidos pelo Processo de Pirólise em Reator Mecanicamente Agitado** **Caracterização da Casca de Café (*coffea arábica*, L) in natura, e de seus Produtos Obtidos pelo Proc.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

SILVA, F. C. et al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annual Microbiology**, Lavras, v. 65, n. 2, fev. 2015. doi:10.1007/s13213-015-1050-0

SIQUEIRA, F. G. **Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases Félix Gonçalves de Siqueira**. Brasília: Universidade de Brasília, 2010.

SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Abingdon, v. 46, p. 829-835, 1963.

SOUSA, T. M. M. **Regulação transcricional de genes de hidrolases em fungos filamentosos: sistemas PacC / CreA em *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sistema Xyr1 em *Trichoderma reesei***. Brasília: Universidade de Brasília, 2012.

SOUZA, A. L. de et al. Composição Químico - Bromatológica da Casca de Café Tratada com Amônia Anidra e Sulfeto de Sódio. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 983-991, 2001.

SPROCATI, A. R. et al. Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils. **Environmental Science Pollution Research**, Rome, v. 21, p. 6824-6835, 2014. doi:10.1007/s11356-013-1907-3

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Abingdon v. 17; n. 1, p. 39-67, 1997.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied and Environmental Microbiology**, Ontario, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, Tartu v. 346, n. 6213, p. 1078-1090, 2014. doi:10.1126/science.aaa1185

TORSVIK, V.; ØVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Bergen, v. 5, p. 240-245, maio 2002.

TRESENDER, K. K.; HOLDEN, S. R. Fungal Carbon Sequestration. **Science**, Irvine, v. 339, p.1528 - 1529, 2013.

VISAGIE, C. M. et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, p. 63-139, 2014. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.002



- WAGG, C. et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **PNAS**, Zürich , v. 111, n. 14, p. 5266–5270, 2014. doi:10.1073/pnas.1320054111
- WALL, D. H. et al. **Soil Ecology and Ecosystem Services**. United Kingdom: Oxford United Press, 2013.
- WARDLE, D. A.; LINDAHL, B. Disentangling global soil fungal diversity. **Science**, Umeå, v. 346, n. 6213, p.1052–1053, 2014.
- WARREN, R. A. J. Microbial hidrolysis of polysaccharides. **Annual Reviews Microbiology**, Vancouver, v. 50, p. 183–212, 1996.
- WRAY, W. Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, Houston, v.118, p. 197–203, 1981.
- XIMENES, E. A.; FELIX, C. R.; ULHOA, C. J. Production of Cellulases by *Aspergillus fumigatus* and Characterization of One b -Glucosidase. **Current Microbiology**, Brasília, v. 32, p. 119–123, 1996.
- YADAV, S. et al. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, Gorakhpur , v. 44, p. 1–10, 2009. doi:10.1016/j.procbio.2008.09.012
- ZHANG, Y. P.; HIMMEL, M. E. MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement : Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Blacksburg, v.24, p. 452–481, 2006. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.03.003
- ZHOU, Y. et al. Soil fungal diversity in three nature reserves of Jiuzhaigou. **Annual Microbiology**, Chengd, v. 64, p. 1275–1290, 2014. doi:10.1007/s13213-013-0772-0

## ANEXO I

Representação dos isolados em seus fragmentos

Isolados	Fragmento	Temperatura	Meio de Cultura
I1	4	36°	*D
I2	4	36°	*D
I3	1	36°	*D
I5	3	36°	*D
I6	3	36°	*D
I7	3	36°	*D
I8	3	36°	*D
I9	3	36°	'M
I10	5	36°	*D
I11	5	36°	*D
I12	4	36°	'M
I13	2	36°	*D
I14	2	28°	'M
I15	2	28°	'M
I16	2	28°	'M
I17	5	28°	'M
I18	5	28°	'M
I19	4	28°	'M
I21	5	28°	'M
I22	4	28°	*D
I23	3	28°	*D
I24	1	28°	*D
I25	2	20°	'M
I26	1	20°	*D
I27	5	20°	'M
I28	4	20°	'M
I29	4	20°	'M
I30	2	20°	*D
I31	5	20°	'M
I32	5	20°	'M
I33	5	20°	'M
I34	2	20°	'M
I35	1	36°	*D
I36	1	36°	*D
I37	1	36°	'M
I38	3	36°	'M
I39	3	36°	*D
I40	2	36°	'M
I41	2	36°	'M
I42	5	28°	'M
I43	3	28°	'M

Continuação da tabela de representação dos isolados em seus fragmentos

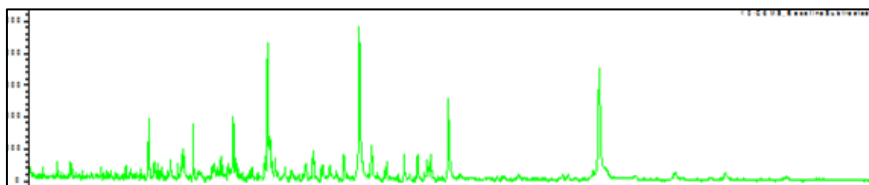
Isolados	Fragmento	Temperatura	Meio de Cultura
I44	4	20°	*D
I45	3	36°	‘M
I46	2	20°	*D
I47	1	28°	*D
I48	5	28°	*D
I49	5	20°	‘M
I50	5	28°	‘M
I51	1	36°	‘M
I52	3	36°	‘M
I53	5	36°	‘M
I54	2	20°	‘M
I55	2	28°	*D

(\*D) Meio DRBC (‘M) Meio Malte 2%

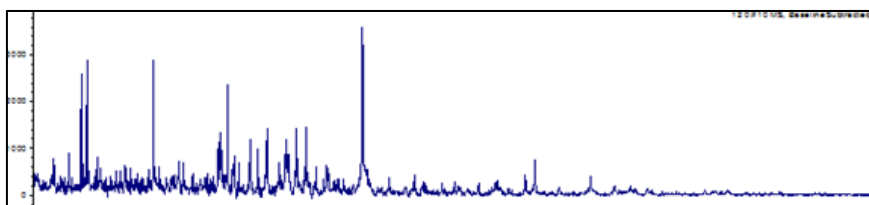
## ANEXO II

Espectros gerados para identificação proteômica por MALDI-TOF

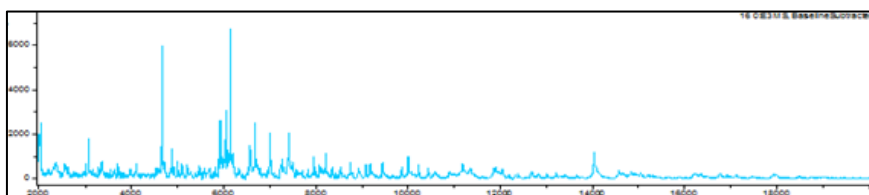
Isolado: I1



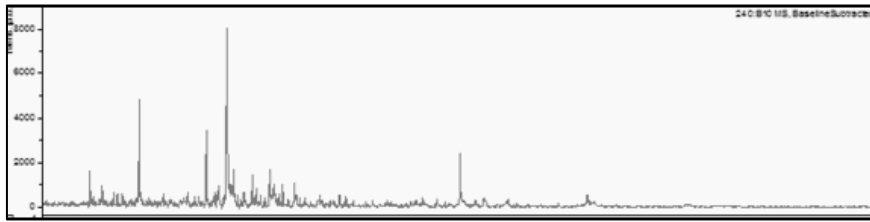
Isolado: I12



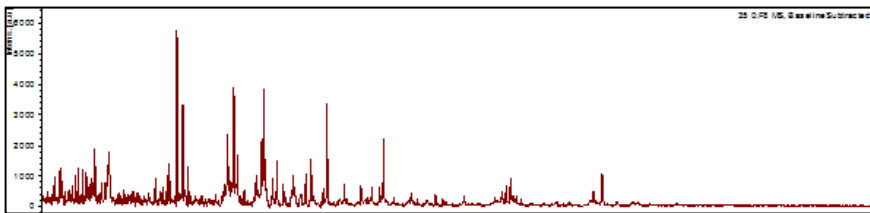
Isolado: I16



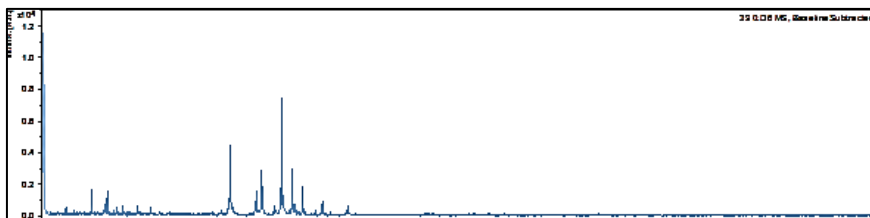
Isolado: I24



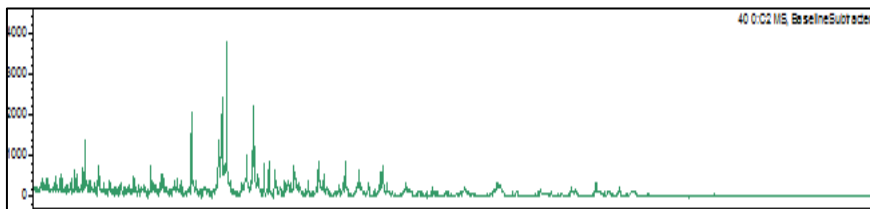
Isolado I35



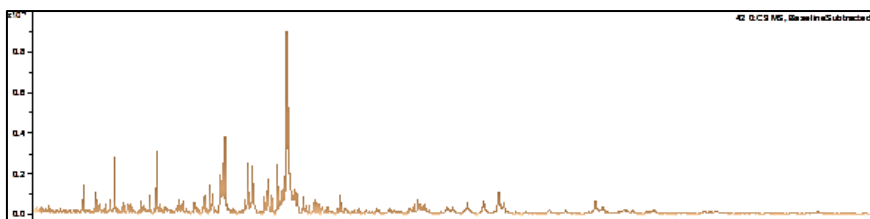
Isolado: I39



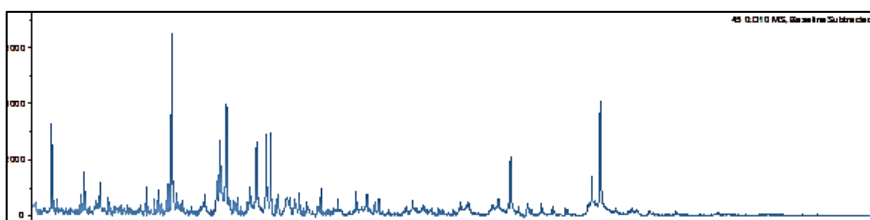
Isolado: I40



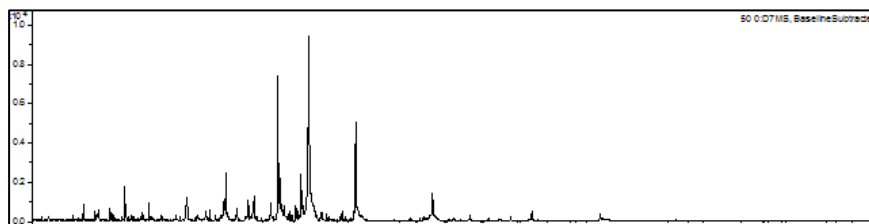
Isolado: I42



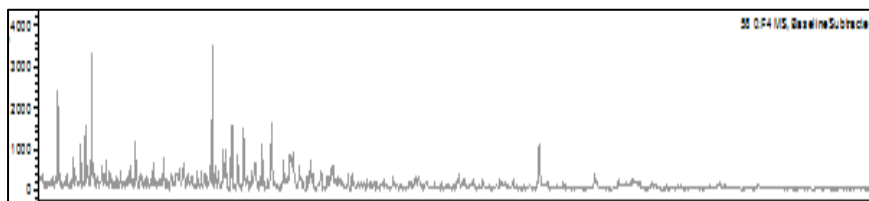
Isolado: I45



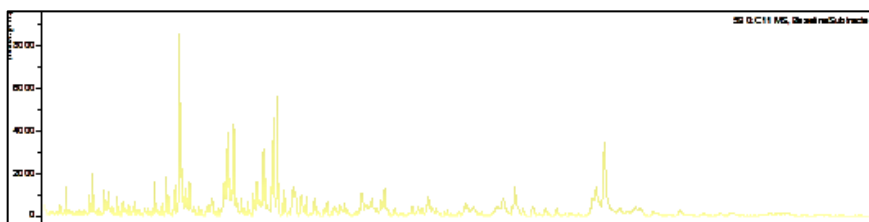
Isolado: I50



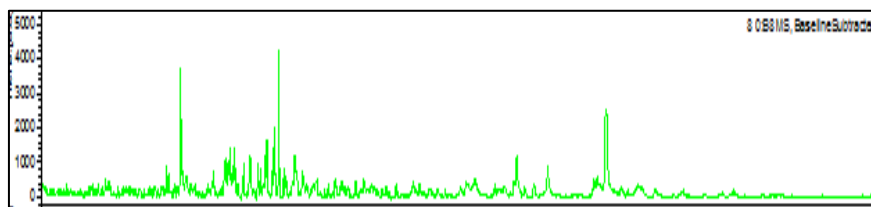
Isolado: I58



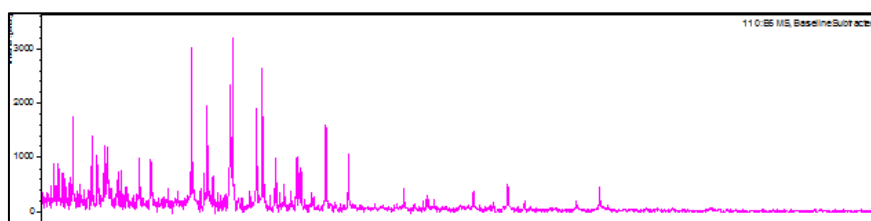
Isolado: I59



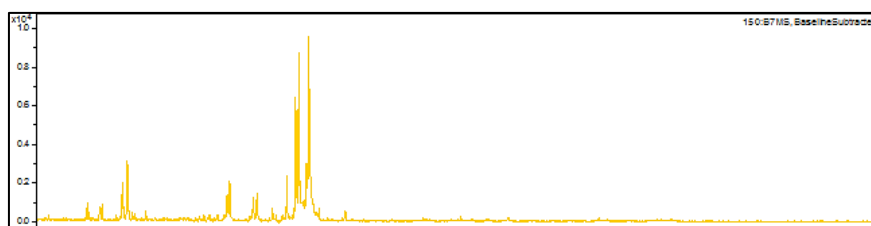
Isolado: I8



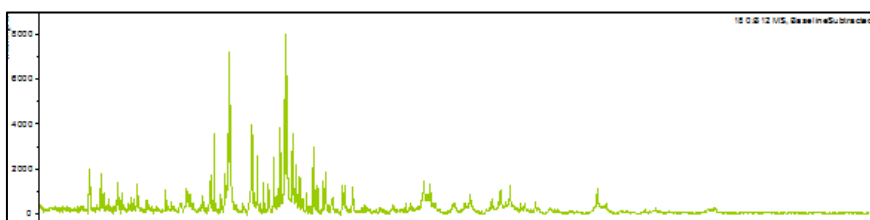
Isolado: I11



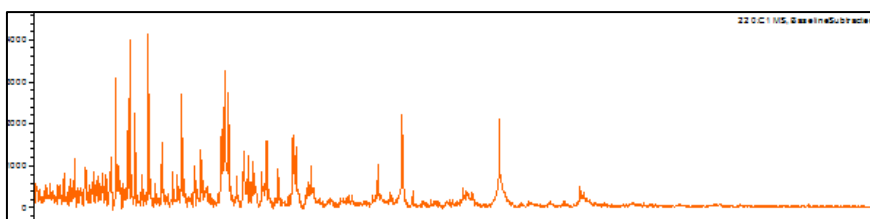
Isolado: I15



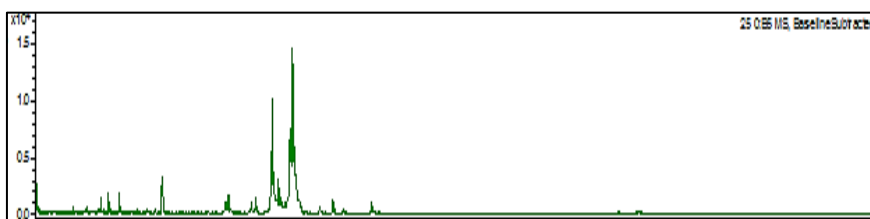
Isolado: I18



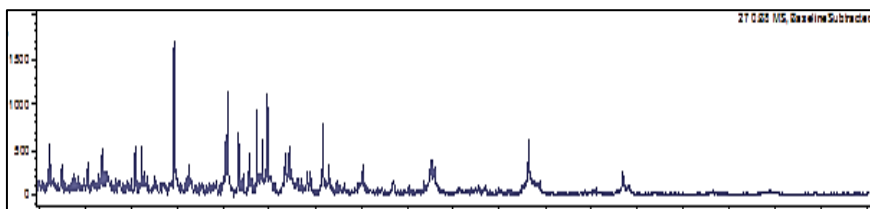
Isolado: I22



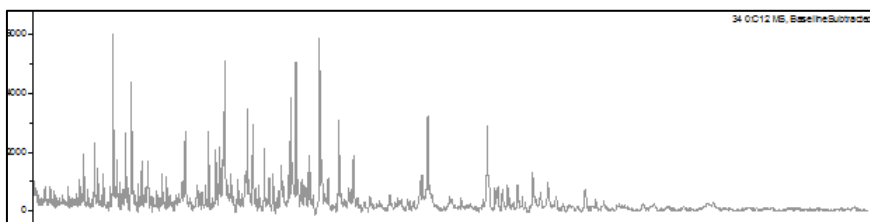
Isolado: I25



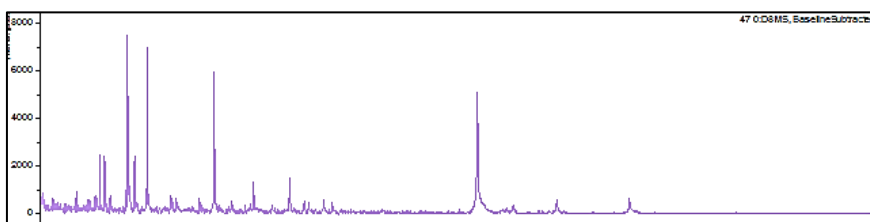
Isolado: I27



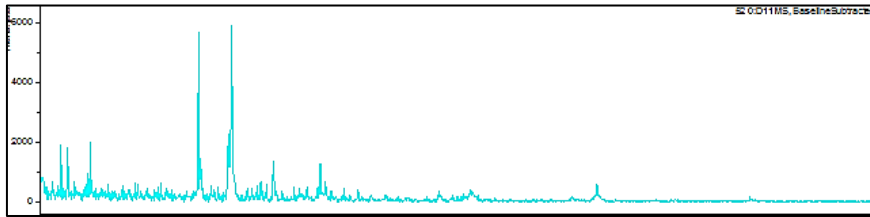
Isolado: I34



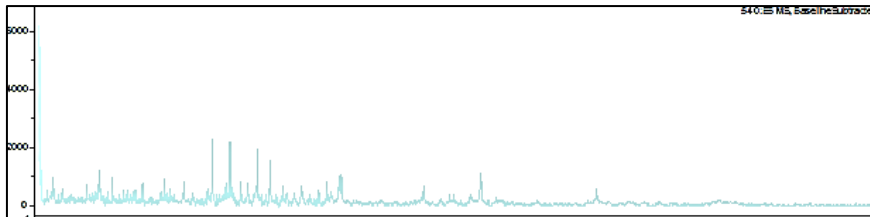
Isolado: I47



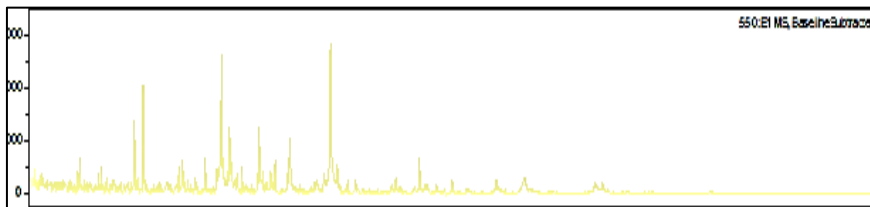
solado: I52



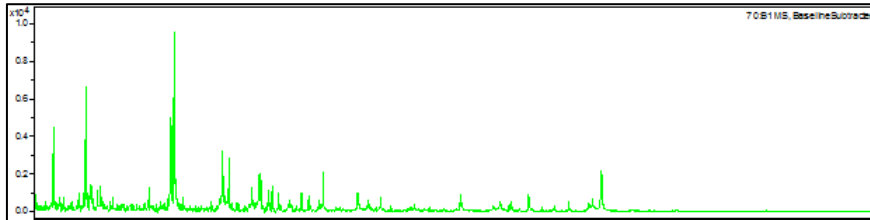
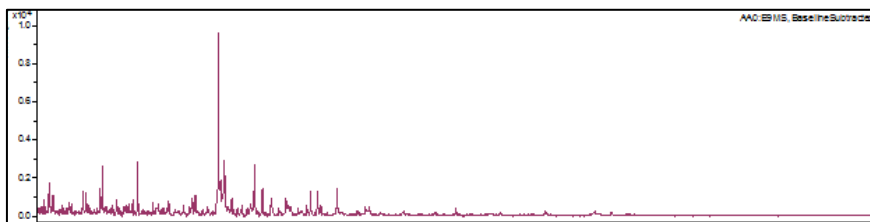
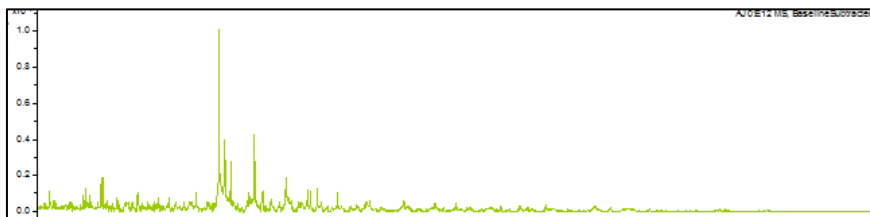
Isolado: I54

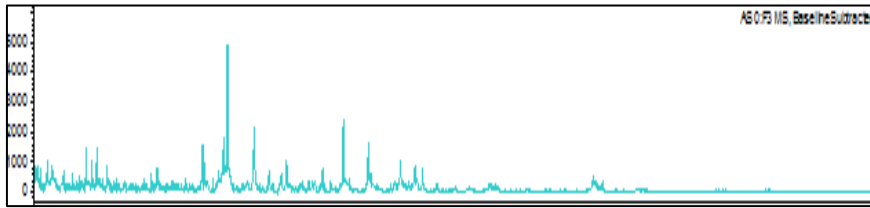


Isolado: I55

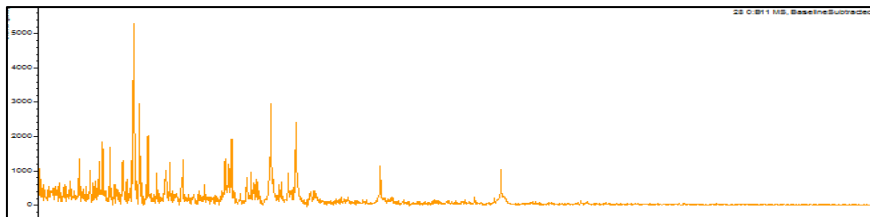


Isolado: I7

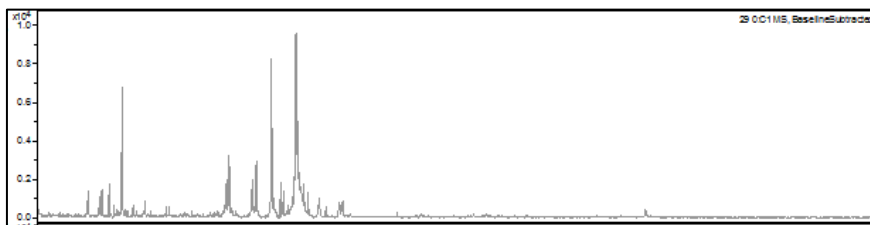
*Aspergillus aculeatus**Aspergillus japonicus*

*Aspergillus sulfureus*

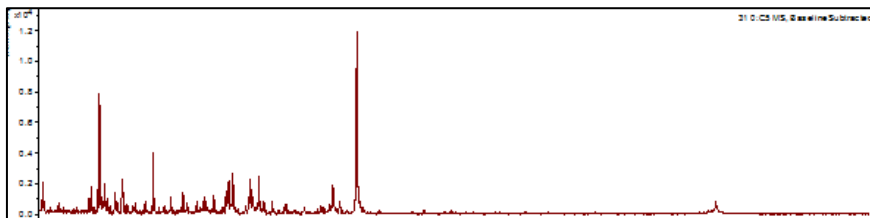
Isolado: I28



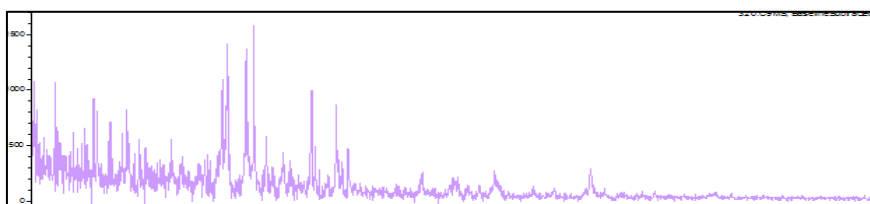
Isolado: I29



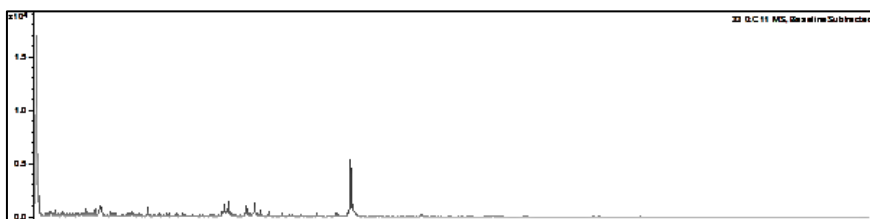
Isolado: I31



Isolado: I32

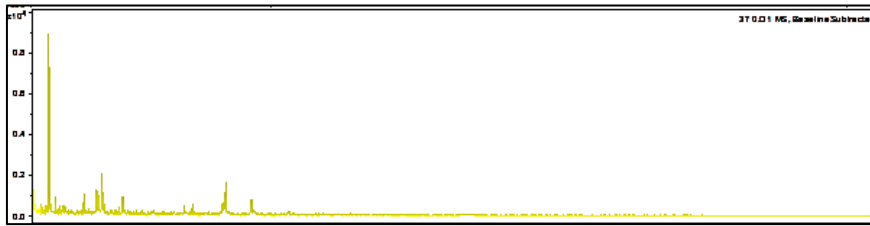


Isolado: I33

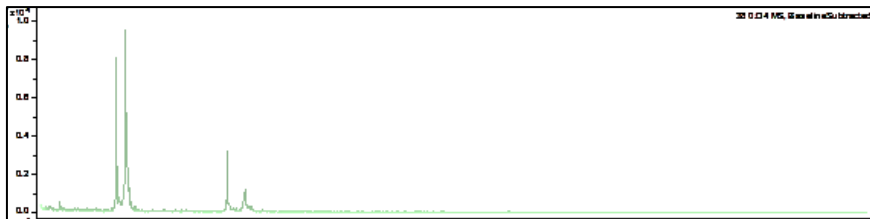




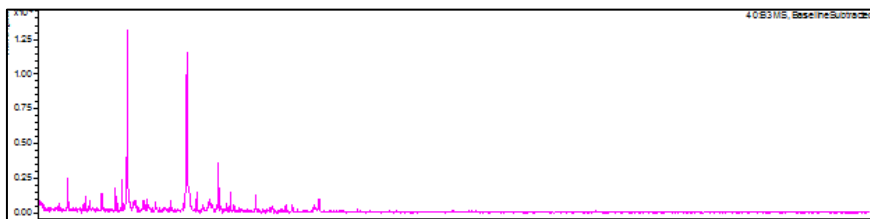
Isolado: I37



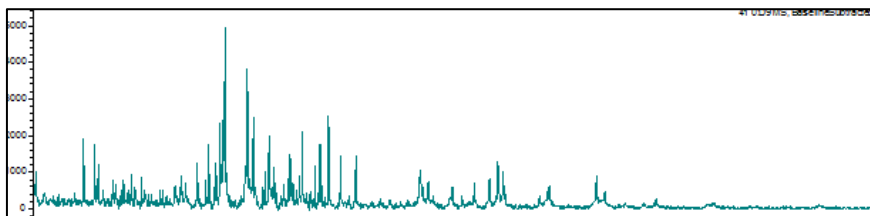
Isolado: I38



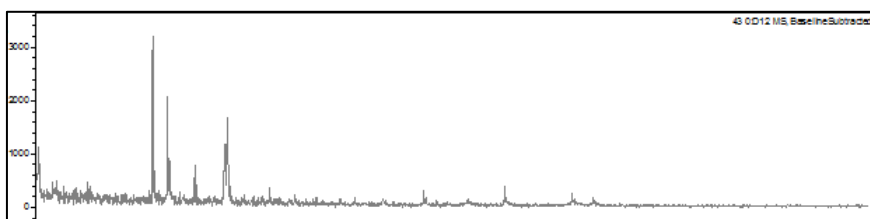
Isolado: I4



Isolado: I41



Isolado: I43



Isolado: I49

