UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

MARCIO ANDRÉ ANTONELI

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, FILOGENIA E POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMOFÍLICOS ISOLADOS DE FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

GUARAPUAVA

2018

MARCIO ANDRÉ ANTONELI

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, FILOGENIA E POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMOFÍLICOS ISOLADOS DE FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profª. Dra. Adriana Knob

Co-orientador: Prof. Dr. André Luiz Gaglioti

GUARAPUAVA

2018

MARCIO ANDRÉ ANTONELI

"Identificação molecular, filogenia e potencial celulolítico de fungos filamentosos termofílicos isolados de Floresta Ombrófila Mista"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva", no Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Centro-Oeste, pela comissão formada pelos professores:

Profa. Dra. Adriana Knob

(Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO)

Prof. Dr. Cesar Rafael Fanchini Terrasan

(Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP)

Prof. Dr. Daniel Bini

(Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO)

Guarapuava, 04 de junho de 2018.

Catalogação na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

ANTONELI, Marcio André.

A635i Identificação molecular, filogenia e potencial celulolítico de fungos filamentosos termofílicos isolados de Floresta Ombrófila Mista / Marcio André Antoneli. – Guarapuava, PR : [s.n], 2018.

IX, 76f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva. Área de Concentração em Biologia Evolutiva, 2018.

Orientadora: Profª. Drª. Adriana Knob

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Gaglioti

Banca examinadora: Adriana Knob, Cesar Rafael Fanchini, Daniel Bini.

1. Biologia evolutiva. 2. Termofilia. 3. Biocatalisadores. 4. Celulases. 5. Mata Atlântica. 6. Resíduos Agroindustriais. I. Knob, Adriana. II. Gaglioti, André Luiz. III. UNICENTRO. IV. UEPG. V. Título.

CDD 575

Aos meus pais Luiz e Amábile,

dedico.

"O aprendizado acontece apenas quando faz sentido"

(Antoneli, Sirlei)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus passos.

À Professora Drª. Adriana Knob, por todos seus ensinamentos.

Ao Professor Dr. André Luiz Gaglioti, pelos ensinamentos.

Aos meus pais, irmãos e namorada, pelo amor e incentivo.

Às colegas Thaís Wouk e Mariane Mendes, de laboratório de Microbiologia Aplicada, pelo companheirismo.

À técnica Maíra Martins, do laboratório de Microbiologia Aplicada, pelo auxílio.

À UNICENTRO, pela estrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, pela oportunidade.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto da Silva e a todos do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, pelo auxílio.

Ao Laboratório de Urticineae do Instituto de Botânica.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Fundação Araucária pelo recurso concedido.

Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO **10**
ABSTRACT **11**
INTRODUÇÃO GERAL **12**
OBJETIVO GERAL **13**
OBJETIVOS ESPECÍFICOS **13**
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **14**
1.1 Mata Atlântica e Floresta Ombrófila Mista 14
1.2 Microrganismos do solo e serapilheira 15
1.3 Bioprospecção de microrganismos 17
1.4 Enzimas e a biotecnologia 18
1.5 Fungos termófilos 20
1.6 Celulose e enzimas celulolíticas 21
1.7 Produção de β-glicosidases microbianas 24
1.8 Fermentação em estado sólido e fermentação submersa 24
1.9 Resíduos agroindustriais 25
1.10 Casca de maracujá 26
1.11 O gênero *Thermoascus* e a espécie *T. crustaceus* 28
CAPÍTULO I – Molecular identification and phylogeny of thermophilic fungi isolated from Araucaria Forest - Brazil. **30**
1. INTRODUCTION **31**
2. MATERIAL AND METHODS **33**
2.1 Taxon sampling **33**
2.2 Sampling area and sample collection **33**
2.3 Fungal isolation and maintenance **34**
2.4 DNA extraction, PCR amplification, and sequencing **34**
2.5 Sequence alignment and phylogenetic analyses **35**
3. RESULTS AND DISCUSSION **36**
4. CONCLUSION **41**
5. REFERENCES **41**
CAPÍTULO II – Bioprospecção de fungos filamentosos termófilos isolados de floresta ombrófila mista produtores de β-glicosidases: otimização da produção **46**
1. INTRODUÇÃO **47**
2. MATERIAL E MÉTODOS **48**

2.1. Áreas de estudo 48
2.1.1 Delineamento experimental 49
2.1.2 Coleta e processamento das amostras 49
2.2 Isolamento e manutenção das linhagens fúngicas em laboratório 50
2.3 Bioprospecção de fungos produtores de β-glicosidases 50
2.4 Determinação da atividade β-glicosidásica 51
2.5 Identificação molecular 51
2.6 Delineamento experimental para a produção de β-glicosidases 52
2.7 Caracterização bioquímica das β-glicosidases produzidas 53
2.7.1 Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática 53
2.7.2 Estabilidade enzimática em diferentes valores de temperatura e pH 53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
3.1 Isolamento de linhagens fúngicas do solo e serapilheira 53
3.2 Bioprospecção de fungos termófilos produtores de β-glicosidases 54
3.3 Otimização da produção de β-glicosidases por *T. crustaceus* 56
3.4 Caracterização física e química das β-glicosidases produzidas por *T. crustaceus* 61
3.4.1 Efeito do pH e da temperatura 61
3.4.2. Estabilidade das β-glicosidases produzidas frente à temperatura e ao pH 62
4. CONCLUSÃO 64
5. REFERÊNCIAS 65

RESUMO

As β-glicosidases têm sido amplamente utilizadas em diversos setores industriais: em processos que envolvem o descoramento do *jeans* e maturação de tecidos na indústria têxtil, na produção de vinhos, na indústria farmacêutica, e na sacarificação de biomassa celulósica para produção de biocombustíveis. Abordagens para a bioprospecção de fungos termófilos, como uma forma de obter fontes ricas de novas enzimas com características distintas das usuais mesofílicas estão em evidência e fornecem informações relevantes quanto à diversidade genética e características destes microrganismos. Ainda, o estabelecimento de hipóteses sólidas quanto a origem e evolução destes microrganismos termófilos tem sido motivo de esforços, em pesquisas que buscam interpretar os padrões e as relações evolutivas das espécies. O objetivo desta investigação foi realizar a busca por fungos termófilos produtores de β-glicosidases, do solo e serapilheira de remanescentes de Floresta Ombrófila Mista (FOM), da região Centro-Sul do Paraná. Utilizando a casca de maracujá como substrato, foi averiguada a produção enzimática, em fermentação submersa, com o método do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR). A caracterização bioquímica das β-glicosidases pela melhor linhagem produtora também foi avaliada. Ademais, objetivou-se identificar molecularmente as espécies termofílicas isoladas, a partir do marcador molecular ribossomal *Internal Transcribed Spacer* (ITS), bem como inferir hipóteses filogenéticas empregando a Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, e Inferência Bayesiana. Oito linhagens morfologicamente distintas de fungos termofílicos foram selecionadas a partir dos isolados, sendo identificados como 7 espécies distintas. Dentre estes, uma linhagem de *Thermoascus crustaceus* exibiu maior potencial de produção de β-glicosidases, tendo a otimização de sua produção quando utilizado 2,9% de casca de maracujá, após 8,6 dias de crescimento e pH inicial de 7,8 do meio de cultivo, correspondendo a 20,08 U/mL, o dobro do valor inicialmente observado. Outrossim, as β-glicosidases mostraram-se mais ativas a 70 ºC e em pH 5,0, com baixa estabilidade aos valores de pH entre 6,5 e 7,5, com uma atividade residual de até 63%, exibindo estabilidade térmica a 60 ºC. As espécies *Thielavia terrestris, Thermoascus crustaceus, Aspergillus fumigatus, Rhizomucor miehei, Rhizomucur pusillus* and *Rhizopus microsporus* foram identificadas. Apenas uma linhagem pertencente ao gênero *Thielavia* não teve sua espécie discriminada por meio do uso destes marcadores. A filogenia destas espécies foi estabelecida, sendo de particular importância diante da atual inexistência de estudos voltados a espécies fúngicas termofílicas de solos brasileiros.

PALAVRAS-CHAVE

Biocatalisadores; Celulases; Mata Atlântica; Resíduos agroindustriais; Termofilia.

ABSTRACT

β-glucosidases have been extensively used in a variety of industrial sectors: in *jeans* stonewashing and textile maturation processes, wine production, pharmaceutical industry, saccharification of cellulosic biomass for biofuels production. Screening of thermophilic fungi is the way to obtain rich sources of new and powerful enzymes, better than those related to mesophilic strains, and give us relevant information about genetic diversity and ecology of these microorganisms. Furthermore, efforts to build robust and evolutionary hypotheses have been the main goal on research papers with regard to investigate and give a light on species evolution patterns. The aim of this study was to discover β-glucosidase producing thermophilic fungi from soil and litterfall of fragments from Araucaria Forest, Brazil. Passion fruit peel was utilized as substrate to evaluate enzyme production, in submerged fermentation, with Central Composite Desing (CCD) method. Biochemical characterization of β-glucosidases from the best producer were done. Species identification by molecular ribosomal marker Internal Transcribed Spacers (ITS) were done, as well as the putative phylogenetic hypotheses, utilizing Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, and Bayesian Inference. Eight lineages morphologically distinct were selected. Seven of them were identified as distinct species. Nonetheless, *Thermoascus crustaceus* lineage was chosen as the best β-glucosidase producer, with the optimization process utiling 2.9 % of passion fruit peel, for 8.6 days, in pH 7.8 at 45 ºC, corresponding a total of 20.08 U/mL, twice of the initial value. Furthermore, β-glucosidase activity was high at 70 ºC in pH 5.0, with low stability to pH range between 6.5 to 7.5 with residual activity up to 63%. Thermal stability was at 60 ºC. *Thielavia terrestris, Thermoascus crustaceus, Aspergillus fumigatus*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucur pusillus* and *Rhizopus microsporus* species ware identified. Only one lineage belonging to *Thielavia* genera it was not possible to discrimine at the species level using this marker. Phylogeny of these species were assembled, with particular importance regard of the thermophilic lineages of brazillian soils, until now is inexistent.

KEYWORDS

Agroindustrial wastes; Atlantic Forest; Biocatalysts; Cellulases; Thermophily.

INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é berço de muitas espécies e sofre pelas consequências das ações antrópicas. Apresenta-se dividida em sub-regiões devido às características fitofisionômicas geradas por diferentes climas e, atualmente, encontra-se em um estado de devastação no qual medidas preventivas para a manutenção das espécies presentes são fundamentais.

A FOM é uma sub-região que encontra-se em um estado criticamente ameaçado, por exibir atualmente somente pequenos remanescentes florestais que servem de abrigo para espécies endêmicas. O conhecimento das populações vegetais, animais, fúngicas e de outros microrganismos que compõem esta paisagem singular, facilita a compreensão dos padrões ecológicos e torna possível a tomada de decisões quanto aos possíveis rumos deste bioma, bem como a conservação de sua riqueza biológica.

Os fungos desempenham funções importantes no meio ambiente. Atuam como saprófitas, sendo chamados de decompositores naturais, junto das bactérias. A habilidade em secretar enzimas para o meio externo é uma das características que os tornam importantes agentes ecológicos, participantes dos ciclos biogeoquímicos.

Atualmente, estudos envolvendo estes organismos têm por objetivo a busca por enzimas e sua aplicação em processos industriais para a obtenção de produtos de valor agregado, nos setores de bebidas, alimentos, produtos químicos e tecidos. Nesse cenário, a bioprospecção assume grande importância, por apresentar-se como uma maneira de se extrair valor econômico da natureza sem prejudicá-la e, como consequência, alavancar o desenvolvimento social.

Dentre os fungos, podemos encontrar alguns exemplares que são capazes de tolerar temperaturas ambientais mais elevadas, com características que os distinguem dos demais do Reino, chamados de termofílicos. Estes microrganismos desempenham um papel ambiental significativo, tanto pela sua tolerância térmica, bem como pelas enzimas que produzem. Porém, pouco se sabe acerca destes organismos, e há muito para ser descoberto.

Um fato importante para compreender as relações ecológicas entre os seres vivos é conhecer a sua trajetória evolutiva, sua origem e suas relações de parentesco, ou relações filogenéticas. Entender estes padrões pode ser a chave para novas descobertas quanto à complexidade estrutural da vida e como esta se mantém. Algumas abordagens em relação aos fungos termofílicos são apresentadas incompletas e deixam lacunas que dificultam a compreensão da história natural destes organismos. Portanto, novas abordagens são

necessárias para alcançar uma maior robustez e clareza das hipóteses, além de novas inferências.

Pouco se sabe sobre a ecologia destes organismos na natureza e por esta razão, estudos que envolvam a amostragem direta de substratos no ambiente, como o solo e a serapilheira de remanescentes de FOM, podem revelar mais informações sobre estes fungos, tanto sobre sua diversidade quanto suas relações evolutivas, além de possibilitarem sua exploração biotecnológica.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de fungos filamentosos termofílicos de remanescentes de FOM a partir de amostras de solo e serapilheira, identifica-los molecularmente e determinar o potencial de produção de β-glicosidases, concomitante otimização da produção pela melhor linhagem produtora, bem como verificar as relações filogenéticas dos isolados obtidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar fungos termófilos a partir de amostras de solo e serapilheira de remanescentes de FOM, bioma Mata Atlântica;
2. Identificar molecularmente os isolados obtidos;
3. Verificar as relações filogenéticas dos fungos filamentosos termófilos isolados, a partir da combinação de dados moleculares;
4. Avaliar o potencial de produção de β-glicosidases termoestáveis pelos isolados fúngicos obtidos utilizando casca de maracujá, de abacaxi e de eucalipto;
5. Otimizar a produção de β-glicosidases pela melhor linhagem produtora previamente selecionada, empregando-se o DCCR;
6. Caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas sob condições otimizadas.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Mata Atlântica e Floresta Ombrófila Mista

Após o descobrimento de novas terras pelos portugueses no século XVI, as florestas brasileiras passaram a sofrer uma redução em seu tamanho, motivada tanto pela exploração de suas espécies com potencial econômico, quanto pelo corte de madeira para abertura de clareiras destinadas ao plantio de monoculturas, como a cana-de-açúcar, o café e o cacau (COLOMBO; JOLY, 2010).

A Mata Atlântica, um dos principais biomas brasileiros, estendia-se originalmente ao longo de 17 estados (Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina, Sergipe, Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul), abrangendo uma área de aproximadamente 1.400.000 km², sendo 92% de sua área pertencente ao Brasil e o restante distribuída entre o Paraguai e Argentina (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016).

Até o início do século XXI, a Mata Atlântica sofreu uma perda significativa, restando apenas 7% de sua formação original como fragmentos bem conservados acima de 100 hectares (MYERS et al., 2000). Esta redução intensificou-se nos últimos anos, tornando-se alarmante especialmente quando são observadas as perdas apresentadas individualmente por estado (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016). Um fator que corroborou para a severidade desta perda é a grande massa populacional e os grandes centros urbanos localizados neste bioma, bem como a atividade agrícola.

Apesar desta floresta possuir atualmente uma menor área de abrangência, estima-se que sua biodiversidade seja tão alta quanto a da maior floresta tropical, a Floresta Amazônica (COLOMBO; JOLY, 2010). A diversidade e o endemismo de espécies presentes na Mata Atlântica são frutos de condições abióticas que permitiram a utilização de diversos nichos pelos organismos, permitindo o estabelecimento de diferentes formas de vida animal, vegetal e microbiana. Devido ao fato de abrigar espécies que não estavam presentes em outros locais no planeta e suas taxas de perda de biomassa, Myers et al. (2000) consideraram a Mata Atlântica como um dos cinco *Hotspots* de biodiversidade mundiais para a conservação.

O bioma Mata Atlântica é dividido em sub-regiões, as quais podem ser diferenciadas pela sua fitofisionomia e ecossistemas próximos, compreendendo a Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual, campos de altitude e áreas de formações pioneiras, conhecidas como manguezais e restingas (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016).

A FOM ou Floresta de Araucárias possui como característica a presença de uma importante conífera nativa: a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, também conhecida como pinheiro-do-paraná, que garante uma característica fitofisionômica única a esta região. No Brasil, sua área original era de aproximadamente 200.000 km² (MAACK, 1981), com maior abrangência nos estados do Paraná (40%), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%), apresentando-se em menor proporção nos estados de São Paulo (3%), Minas Gerais e Rio de Janeiro (1%) (KLEIN, 1960). Atualmente, esta floresta encontra-se em um estado de conservação bastante crítico, limitada a pequenas áreas distribuídas ao longo dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No Paraná, este tipo de formação sofreu com a exploração madeireira e expansão de monoculturas, principalmente de soja e milho, apresentando atualmente apenas cerca de 0,8% de suas formações originais (FUPEF, 2001).

Nos últimos anos, estudos da composição da fauna e flora têm sido conduzidos, a fim de conhecer o estado de conservação da FOM, bem como determinar planos de ações futuras que possam contribuir com sua preservação (BROCARDO; CÂNDIDO-JÚNIOR, 2012; BUSCHINI; DONATTI, 2012; CAVASINI et al., 2014; MIRANDA; ZAGO, 2015). Entretanto, por maior que seja sua importância ecológica, muito pouco se sabe sobre os microrganismos que habitam esses locais (CRAWFORD, 2005), sendo o número de trabalhos conduzidos na FOM com este grupo de seres vivos bastante reduzido (VASCONCELLOS et al., 2010; OKASI; PÉLICO-NETO, 2012). Nesse sentido, esforços para conhecer a microbiota desta singular paisagem são necessários, a fim de elevar seu potencial de conservação, bem como maximizar estratégias de manejo, especialmente por se acreditar que a maior parte das espécies de fungos não conhecidas esteja distribuída em florestas tropicais (HAWSWORTH, 2001) e subtropicais (SERNA-CHAVEZ; FIERER; BODEGOM, 2013).

1.2 Microrganismos do solo e serapilheira

As florestas tropicais e subtropicais constituem ambientes ricos em biomassa e apresentam uma alta diversidade de organismos pertencentes a todos os domínios da vida. Nestes ambientes, uma elevada quantidade de matéria morta deposita-se constantemente sobre o solo, formando uma camada orgânica denominada serapilheira. Aliada a variáveis ambientais como precipitação, temperatura média anual e condições edáficas inerentes ao próprio solo (como constituição em minerais, permeabilidade, potencial hidrogeniônico, compactação e granulometria das partículas), a serapilheira oferece condições favoráveis ao

desenvolvimento de microrganismos em abundância (SERNA-CHAVEZ; FIERER; BODEGOM, 2013; COSTA; GUSMÃO, 2015). Estes, por sua vez, merecem destaque por suas contribuições na base das cadeias tróficas e auxílio no funcionamento dos ecossistemas, sendo comumente esquecidos por conta da sua natureza microscópica.

Os fungos constituem um grupo altamente diverso das comunidades microbianas do solo. Como patógenos e simbiontes, os fungos de solo influenciam a composição de espécies e a dinâmica das comunidades de plantas (MOORE et al., 2004). Como saprófitas, atuam no ciclo dos nutrientes, disponibilizando carbono e nitrogênio para o solo, desempenhando, desta forma, um importante papel nos ecossistemas (LANGE, 2014).

Alguns fatores relacionados à riqueza e ao sucesso dos fungos na colonização do solo incluem o hábito de vida saprófita, o rápido crescimento micelial, sua capacidade de tolerar diversas substâncias e fatores como a salinidade, metais, fungicidas e temperatura, bem como a produção de esporos e de diversas enzimas (AZEVEDO et al., 2010). Estas últimas, auxiliam em seu metabolismo reduzindo macromoléculas a partículas assimiláveis para o seu desenvolvimento, sendo hábeis em degradar diferentes tipos de matéria orgânica, tanto de alta, quanto baixa complexidade estrutural (THOMPSON et al., 2013). Desta forma, devido às propriedades físicas e químicas de suas enzimas e por sua habilidade em degradar um amplo espectro de compostos, tanto orgânicos, quanto inorgânicos, os fungos têm sido alvos de pesquisas no setor biotecnológico (GOMES et al., 2007).

Sugere-se que existam aproximadamente seis milhões de espécies fúngicas, com estimativa de que 98% dos fungos ainda não foram descritos e que muitas destas espécies habitam nichos exclusivos (TAYLOR et al., 2014). O solo está cada vez mais vulnerável à perda de diversidade, em consequência dos diversos tipos de pressões que vem enfrentando, tais como a poluição, salinização, erosão e compactação, os quais afetam significativamente os organismos presentes nesse meio (ORGIAZZI et al., 2016). Porém, ainda apresenta a maior biodiversidade microbiana quando comparado a qualquer outro ecossistema (LEE; LEE, 2013).

O conhecimento acerca da biodiversidade microbiana do solo e serapilheira ainda é incipiente, devido aos métodos de cultivo empregados, que são incapazes de permitir o desenvolvimento de muitas espécies, atuando como limitantes para o estudo e conhecimento destes organismos. O desenvolvimento de técnicas moleculares, nos últimos anos, possibilitou a identificação de espécies e bioativos, sem a necessidade de cultivo e isolamento (HENDELSMAN et al., 1998: LEE; LEE, 2013; TEDERSOO et al., 2014). Em contrapartida,

os métodos clássicos não devem ser deixados de lado, pois permitem obter informações relacionadas à ecologia das espécies a serem descobertas e suas funções nos ecossistemas.

A ausência de conhecimento sobre a diversidade taxonômica dos microrganismos tem resultado em muitas lacunas relacionadas às questões da biologia evolutiva, como a filogenia e a importância desses microrganismos para os ecossistemas. Assim, faz-se necessária a condução de pesquisas, a fim de avaliar as espécies microbianas existentes em determinados ambientes, de obter informações sobre seus processos metabólicos, bem como sobre as interações ambientais em que estejam envolvidas, e, ainda, pela possibilidade de revelar fontes biotecnológicas por meio de estudos de bioprospecção.

1.3 Bioprospecção de microrganismos

A bioprospecção é uma forma de extrair valor econômico da natureza sem lhe causar danos, capaz de gerar desenvolvimento econômico e social, bem como inovação tecnológica. Pode ser definida como "a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto" (SACCARO-JÚNIOR, 2011).

A descoberta de um possível recurso biotecnológico envolve as etapas de coleta do material biológico, a triagem de materiais com as características de interesse e, finalmente, a seleção da melhor opção que apresente os atributos desejados para desenvolver e produzir um produto comercial ou mesmo para aplicá-lo em processos industriais (BULL et al., 2000).

Nos estudos de bioprospecção, a técnica de isolamento é muito utilizada com a finalidade de verificar quais microrganismos estão presentes em determinado ambiente. A diversidade de microrganismos no solo é provavelmente maior quando comparado com outras comunidades microbianas, enquanto que sua abundância varia de acordo com o tipo de solo e a função específica desempenhada (LEE; LEE, 2013). Vários estudos têm sido conduzidos nesses ecossistemas, avaliando os fungos filamentosos presentes em diversos tipos e composições de solo, como salinos (EVANS et al., 2013), contaminados com metais pesados (AKHTAR et al., 2013), solos de monoculturas (BORGES et al., 2011), sistemas agroflorestais (SILVA et al., 2011), solos de região semi árida (OLIVEIRA et al., 2013), contaminados com herbicidas (COLLA et al., 2008), solos oligotróficos de região fria e árida (GODINHO et al, 2015) e de florestas tropicais (HARGREAVES, 2008; SILVA, 2014).

Particularmente, os solos de floresta constituem uma importante fonte para o isolamento de fungos e, consequentemente, para o descobrimento de novas enzimas que podem ser empregadas industrialmente. Ambientes florestais diferem-se quanto à vegetação e ao clima, bem como a presença de plantas com diversas composições nutricionais, os quais são fundamentais para crescimento desses microrganismos (BANAKAR, THIPPESWAMY, 2014).

Até meados de 1990, a busca por biocatalisadores concentrava-se no isolamento de bactérias e arqueias, especialmente pelo fato de que muitos de seus exemplares exibem a capacidade de sobreviver em condições extremas, suportando altas temperatura (termófilos e hipertermófilos), elevados níveis de salinidade (halófilos) ou sobrevivendo em meios de elevada alcalinidade (alcalinofílicos). Essas adaptações são resultado de uma maquinaria molecular adaptada, cujos produtos eram cobiçados aos olhos de bioprospectores (BULL et al., 2000). No entanto, nos últimos anos, a bioprospecção de fungos vem sendo extensivamente realizada, com o intuito de avaliar o potencial desses organismos na produção de substâncias de grande valor econômico, como metabólitos farmacológicos (TAKAHASHI et al., 2008; CHAYNIKA; SRIVIDYA, 2014; WANG et al., 2015), alguns tipos de corantes (GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008; CELESTINO et al., 2014), bem como enzimas de interesse industrial (VEGA et al., 2012; KULKARNI; GUPTA, 2013).

1.4 Enzimas e a biotecnologia

Depois dos antibióticos, as enzimas constituem o grupo mais importante de produtos biológicos de necessidade humana. Diversos processos industriais, especificamente nas áreas ambiental, de biotecnologia e de alimentos empregam a tecnologia das enzimas em várias de suas etapas.

A introdução de enzimas como catalisadores em processos industriais, a exemplo das microbianas, mostra-se vantajosa, uma vez que as enzimas são específicas e geralmente não apresentam toxicidade, sendo estas características desejáveis tanto pela indústria, quanto para a preservação do meio ambiente (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Enzimas como lipases, xilanases, pectinases e celulases abrangem todos os ramos da indústria. A indústria de alimentos utiliza estas enzimas para a obtenção de alimentos mais saborosos, sucos com menor viscosidade e cor, enriquecimento nutricional de rações animais e obtenção de produtos à base de leite. As indústrias farmacêuticas as utilizam para a obtenção de fármacos

e de produtos cosméticos, enquanto que as indústrias do segmento químico as empregam para a obtenção de ésteres, branqueamento da polpa *kraft* e em detergentes (GHORAI et al., 2009).

O emprego de enzimas microbianas no setor industrial é de grande interesse. Além de possibilitarem a criação de um novo produto, sua utilização pode alterar a composição de produtos que já estão disponíveis no mercado, bem como melhorar sua qualidade. Adicionalmente, a produção de enzimas microbianas é de particular interesse, devido ao curto período de geração dos microrganismos, à grande diversidade de processos metabólicos e de enzimas existentes.

Desta forma, o uso de microrganismos como recurso biotecnológico para a produção de enzimas industrialmente relevantes tem estimulado sua exploração. Nas últimas décadas, o emprego de fungos em bioprocessos tem ganhado importância devido à produção de inúmeras enzimas, com as mais diversas características físico-químicas e excelente potencial para a aplicação industrial (GOSWAMI; PATHAK, 2013).

A capacidade de síntese em larga escala, bem como a facilidade com que estas enzimas são secretadas para o meio externo constituem apenas algumas das características que tornam as espécies fúngicas particularmente interessantes do ponto de vista industrial. Por serem geralmente extracelulares, o processo de recuperação do meio de fermentação de enzimas fúngicas é facilitado. Adicionalmente, as enzimas de origem fúngica, bem como as produzidas por outros microrganismos, não estão sujeitas às intempéries climáticas como as de origem vegetal, sendo produzidas sob condições controladas de cultivo (GERMANO et al., 2003; PANDEY et al., 2005; ORLANDELLI et al., 2012).

Muitos processos industriais são conduzidos sob temperaturas elevadas, como os de produção de biocombustíveis, que envolvem a conversão do material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis (FROCK; KELLY, 2012). Este fato tem encorajado a busca por enzimas que suportem temperaturas mais elevadas, para aplicação direta ou mesmo em substituição daquelas já empregadas em determinados processos, a fim de elevar os rendimentos e reduzir seus custos (OLIVEIRA; GOMES; RODRIGUES, 2015).

Algumas vantagens são observadas quando enzimas termoresistentes são empregadas, as quais permitem a condução de processos sob temperaturas elevadas: (1) maiores taxas de conversão; (2) tempos menores de reação; (3) redução no risco de contaminação por mesófilos; e (4) viscosidade reduzida do substrato. No entanto, um fator limitante para sua utilização é seu elevado custo, bem como a dificuldade em encontrar organismos termófilos com maquinaria genética robusta, capazes de produzir enzimas com as

características desejadas (FROCK; KELLY, 2012; OLIVEIRA; GOMES; RODRIGUES, 2015).

1.5 Fungos termófilos

A temperatura tem um papel importante e frequentemente é decisiva para a distribuição de organismos na terra. A maioria dos fungos são mesófilos, cuja temperatura normal de crescimento é de 5 até 35 °C, com temperatura ótima em torno de 28 ºC. No entanto, alguns fungos são excepcionalmente capazes de crescer e viver sob temperaturas de incubação elevadas (OLIVEIRA; GOMES; RODRIGUES, 2015). Estes últimos possuem adaptações que permitem sua sobrevivência sob essas condições, como uma membrana citoplasmática com ácidos graxos saturados, proteínas com presença de determinados aminoácidos e padrões de enovelamento em suas estruturas que garantem estabilidade e flexibilidade para sua atividade catalítica. Em adição, pode ser mencionada a presença de moléculas, como a DNA girase reversa e histonas, que auxiliam no superenovelamento e conferem ao DNA maior resistência à desnaturação térmica (GOMES et al., 2007).

Estes fungos são chamados de termófilos e podem ser classificados como termofílicos ou termotolerantes, dependendo de suas temperaturas cardinais de crescimento (OLIVEIRA; GOMES; RODRIGUES, 2015). Uma definição foi proposta para este grupo de fungos, onde os termofílicos compreendem aqueles com uma temperatura de crescimento máxima de 50 °C ou superior e mínima de 20 °C ou superior, enquanto que são considerados fungos termotolerantes aqueles que suportam uma temperatura máxima de crescimento de 50 °C e que exibem a temperatura mínima de crescimento abaixo de 20 °C (COONEY; EMERSON, 1964).

Os fungos termófilos são os principais componentes da microbiota que se desenvolve em pilhas de produtos agrícolas e silvícolas, grãos armazenados, madeira, material de nidificação de animais, sistemas de compostagem, além de outros acúmulos de matéria orgânica (LEE et al., 2014). É interessante que fungos termofílicos e termotolerantes são onipresentes e abundantes em solos onde o sol pode aquecê-los, atingindo-se temperaturas que são adequadas para sua germinação e crescimento (RAJASEKARAN; MAHESHWARI, 1993; MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000).

Nos ecossistemas florestais, os fungos termófilos são fundamentais no processo de decomposição da matéria orgânica (HEATON et al., 2012). Participam deste processo em conjunto com os microrganismos mesófilos, os quais, por meio de sua intensa atividade metabólica, promovem um rápido aumento de temperatura, favorecendo a ascensão dos

termofílicos e termoresistentes. Nesta etapa, estes últimos desempenham um importante papel na quebra de substâncias complexas, como polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina) e lignina (SZÉKELY et al., 2009). Particularmente, a utilização de fungos termofílicos e termotolerantes para a produção de enzimas como as celulolíticas é bastante promissora, tanto pelas características intrínsecas que estes biocatalisadores apresentam, quanto pela diversidade de processos industriais nos quais estas enzimas podem ser empregadas (OLIVEIRA; GOMES; RODRIGUES, 2015).

1.6 Celulose e enzimas celulolíticas

A biomassa vegetal é a fonte orgânica mais abundante e renovável do planeta, com potencial para o desenvolvimento de produtos de interesse comercial. Entretanto, a presença de uma parede celular nas células vegetais confere resistência aos processos degradativos, tornando o conhecimento de sua estrutura e composição essencial para sua utilização como fonte de energia renovável (FARINAS, 2011).

A parede celular vegetal é constituída por polissacarídeos e complexos fenólicos. Os polissacarídeos que compõem a parede celular são a celulose, a hemicelulose e a pectina que, juntamente com a lignina, conferem uma alta complexidade e rigidez a essa estrutura (SOUZA, 2013). Essa rigidez, por sua vez, está relacionada com a disposição de suas fibras, proteínas e polissacarídeos, a qual varia de acordo com a proporção de seus componentes, com a espécie de planta, tipo de tecido, estágio de desenvolvimento e tipo de parede considerada (LIEPMAN et al., 2010).

Dependendo de sua localização e composição, a parede celular das plantas pode ser chamada de primária ou secundária. A primária é formada principalmente por celulose (30%), hemicelulose (30%) e pectina (30%), enquanto que a parede celular secundária é constituída por celulose (50-80%) e hemicelulose (5-30%) em associação com a lignina (15-35%) (FARINAS, 2011).

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal, sendo constituída por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas β-1→4. De acordo com a proximidade de suas cadeias polissacarídicas, apresenta regiões amorfas e regiões cristalinas, formadas por fibras mais espaçadas ou mais compactadas, respectivamente (PECIULYTE et al., 2015). As regiões cristalinas, insolúveis em água, ocorrem como uma estrutura formada por fibras densamente arranjadas. Para sua degradação, celulases termoestáveis ativas em altas temperaturas são necessárias.

As celulases constituem um grupo de enzimas capazes de promover a hidrólise da celulose na natureza. A completa degradação desse polissacarídeo é realizada pela ação conjunta de três classes de celulases, as endoglucanases, as exoglucanases, e as β-glicosidases (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012), as quais, por meio de uma ação sinérgica, reduzem as cadeias de celulose a monômeros de glicose (TANI; KAWAGUCHI; KOBAYASHI, 2014).

As endoglucanases clivam randomicamente as ligações glicosídicas β-1→4 das cadeias internas da matriz celulósica, liberando oligossacarídeos de diferentes tamanhos. As exoglucanases clivam a celulose nos terminais acessíveis, redutores e não redutores, liberando glicose e celobiose e, por fim, as β-glicosidases hidrolisam oligossacarídeos solúveis e celobiose originados pela ação das duas primeiras enzimas, liberando glicose (MORAÏS et al., 2012; KUMAR; MURTHY, 2013). Estas últimas enzimas, por sua vez, definem a continuidade do processo ou sua estabilização. A Figura 1 representa a ação simultânea dessas enzimas neste processo. À medida que os produtos da hidrólise são liberados, as taxas de conversão e a ação enzimática diminuem.

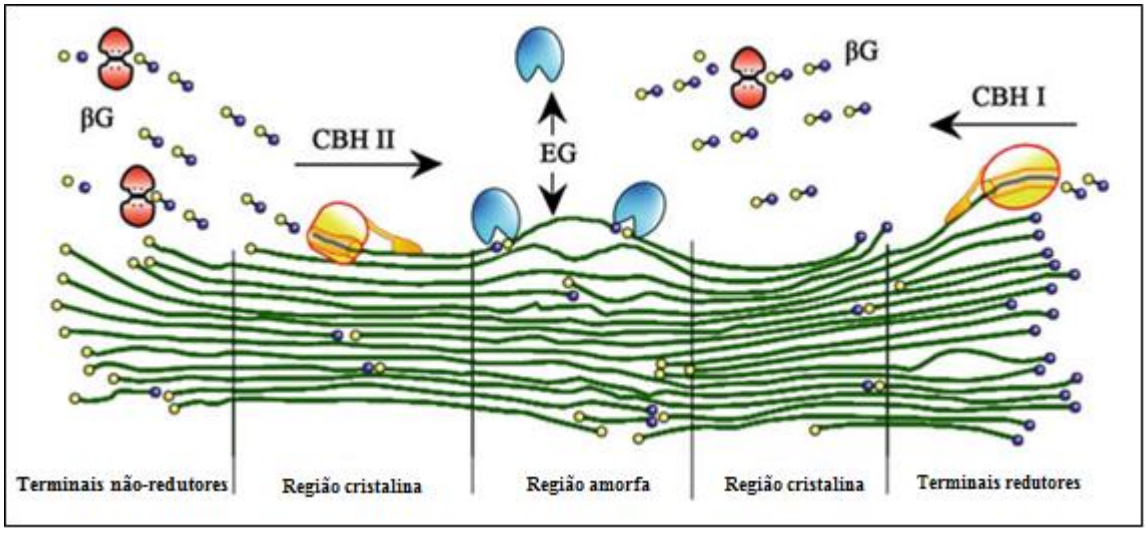


Figura 1: Hidrólise enzimática realizada pelas três classes de celulases. Endoglucanase (EG), Exoglucanase do terminal redutor e não redutor (CBHI) e (CBHII), respectivamente, e β-glicosidases (βG). Adaptado de Wang et al. (2012)

Na Biotecnologia, as celulases ganham destaque por serem aplicadas em importantes processos industriais, como na hidrólise de materiais lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis, no descoramento e amaciamento de tecidos na indústria têxtil, como aditivos em detergentes, na clarificação de sucos e extração de compostos flavorizantes na indústria de bebidas, na indústria farmacêutica para fins dermatológicos, na pecuária como enriquecedora de ração animal para melhorar o metabolismo dos animais, e também no pré-tratamento de resíduos industriais que contêm celulose (HAKI; RAKSHIT, 2003; KUHAD;

GUPTA; SINGH, 2011; WANG et al., 2012; BHATTACHARYA; BHATTACHARYA; PLETSCHKE, 2015).

As β-glicosidases, enzimas cruciais para a completa hidrólise da celulose, são muito importantes para os organismos que as produzem, como os fungos e as bactérias, grandes recicladores do carbono da natureza. Sua produção, junto a de outras enzimas celulolíticas, implica em uma maquinaria genética robusta que capacita o organismo que a carrega a sobreviver e aproveitar fontes ricas em celulose como fontes de energia e carbono. Em adição, estas enzimas são importantes para outros processos biológicos nos quais estão envolvidas, como sinalização celular, oncogênese, interação patógeno-hospedeiro, degradação da estrutura de polissacarídeos e armazenamento, bem como para processos de relevância industrial (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002).

Em mamíferos, β-glicosidases catalisam a hidrólise de glicosil ceramidas (TOMME; WARREN; GILKES, 1995). Nas plantas, estas enzimas estão envolvidas na síntese de beta-glucano durante o desenvolvimento da parede celular, auxiliam no amadurecimento dos frutos, no metabolismo de pigmentos e em mecanismos de defesa (BRZOBOHATY et al., 1993; EASEN, 1993). Ainda, auxiliam na biossíntese de glicoconjugados como aminoglicosídeos, alquilglicosídeos, e em fragmentos de oligossacarídeos eliciadores de fitoalexinas, importantes para a defesa das plantas frente ao ataque de microrganismos (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002).

Além da sua importância ecológica, as β-glicosidases são empregadas como ferramentas para a geração de produtos de valor agregado. Devido à importância das β-glicosidases na biotecnologia industrial, novas abordagens estão surgindo para o aproveitamento máximo dessa categoria de enzimas (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013). Atualmente, estas enzimas são utilizadas na indústria têxtil para o descoramento do *jeans*¸ na maturação das fibras de tecidos que apresentam nódulos, deixando-os macios. São ainda empregadas na indústria vinícola, liberando substâncias aromatizantes em vinhos (SANTOS et al., 2016). Também, as β-glicosidases termoestáveis têm recebido um destaque especial pela indústria farmacêutica (HAKI; RAKSHIT, 2003). Ainda assim, seu potencial de aplicação como eficientes biocatalisadores concentra-se na sacarificação de biomassa celulósica, nos processos de produção de biocombustíveis (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013).

1.7 Produção de β-glicosidases microbianas

Apesar de as β-glicosidases serem encontradas em organismos de todos os reinos da vida, sua produção tem sido reportada especialmente por bactérias, fungos filamentosos e por algumas leveduras (MARTINS et al., 2011). As fontes de natureza fúngica são as mais exploradas devido às suas melhores perspectivas em aplicações comerciais (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013). Entre os fungos reconhecidos como produtores de β-glicosidases, os que apresentam maiores rendimentos em sua produção são os dos gêneros mesofílicos *Aspergillus* e *Trichoderma* (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; CHANDRA et al., 2013; PIROTA et al., 2015). Dentre os termofílicos, um destaque especial pode ser conferido ao fungo *Thermoascus aurantiacus* (JAIN et al., 2014).

Ainda, a produção de β-glicosidases tem sido relatada por outros organismos, como os fungos termofílicos *Talaromyces emersonii*, *Thermomyces lanuginosus*, e *Rizhomucor miehei* (YOSHIOKA; HAYASHIDA, 1981; LIN; PILLAY; SINGH, 1999; MURRAY et al., 2004), a bactéria *Alcaligenes faecalis* (HAN; SRINIVASAN, 1969), o fungo mesófílico *Sporotrichum pulverulentum* (DESHPANDE; ERIKSSON; PETTERSSON, 1978), as leveduras *Saccharomyces fragilis* e *S. dobzhanskii* (FLEMING; DUERKSEN, 1967), a angiosperma *Silybum marianum* Gaernt. (MISHRA; SANGWAN; SANGWAN, 2014), o fungo anaeróbico encontrado no rúmen de animais, *Neocallimastix frontalis* (WILSON; MCCRAE; WOOD, 1994), o protozoário *Phytophthora infestans* (BODENMANN; HEINIGER; HOHL, 1985).

Diversos fatores afetam a produção de β-glicosidases por microrganismos, tais como a composição do meio de cultivo, fonte de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e aeração, tempo de cultivo, tamanho do inóculo, bem como o tipo de fermentação utilizado (AHMED et al, 2017).

1.8 Fermentação em estado sólido e fermentação submersa

Para a Biotecnologia, a fermentação é considerada como a transformação de um substrato complexo em compostos simples, estando os microrganismos envolvidos nesse processo. Esta pode ser realizada em meio aquoso ou submerso e em meio sólido. (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). A fermentação submersa (FS) é caracterizada como um processo que contém uma alta quantidade de água e os nutrientes encontram-se dissolvidos. Esse tipo de fermentação apresenta algumas vantagens, tais como a possibilidade de controlar o pH e temperatura, e também a facilidade de recuperação e purificação de

enzimas extracelulares em razão de serem secretadas diretamente no meio (ORLANDELLI et al., 2012).

Já a fermentação em estado sólido (FES) refere-se ao cultivo microbiano na presença de uma menor quantidade de água, caracterizando um meio sólido. A matriz sólida pode ser constituída por resíduos agroindustriais que servem de suporte e fornecem nutrientes para o desenvolvimento dos microrganismos (SINGHANIA et al., 2009). Alguns benefícios podem ser observados, em comparação à FS: (1) elevada produtividade volumétrica; (2) produto concentrado; (3) redução dos efluentes a serem tratados; e (4) utilização de equipamentos mais simples (RENGE; KHEDKAR; NANDURKAR, 2012).

Diferentemente da FS, a FES apresenta baixo risco de contaminação bacteriana e geralmente requer pouca energia (CASTRO; SATO, 2015), com a exceção da necessidade de dissipar o calor gerado. Entretanto, a FES apresenta desvantagens, como a necessidade de pré-tratamento de suportes, necessidade de maior quantidade de inóculo, bem como a dificuldade em controlar parâmetros físicos e químicos, como temperatura, umidade e pH (ORLANDELLI et al., 2012). Além disso, a umidade reduzida presente no substrato pode ser insuficiente e resultar no ressecamento das hifas expostas ao ar (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Contrariamente, em condições submersas, as hifas se mantêm hidratadas.

A maior diferença é que FS pode caracteriza-se como um procedimento homogêneo, a depender do substrato utilizado, onde os componentes estão completamente dissolvidos, tornando a solução uma mistura de microrganismos e nutrientes, enquanto que na FES, os elementos não estão distribuídos nas mesmas proporções em toda a matriz. Os dois tipos de fermentações apresentam características importantes que devem ser avaliadas na escolha do processo que será utilizado para a produção enzimática microbiana. Em escala industrial, a produção de enzimas é realizada majoritariamente por FS (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

Em ambos os processos fermentativos, resíduos agroindustriais têm sido empregados no processo de produção de enzimas celulolíticas, propiciando uma redução de seus custos, minimizando a contaminação do ambiente, além de conferir um maior valor agregado a esses materiais.

1.9 Resíduos agroindustriais

O Brasil é um país de destaque por possuir condições climáticas que tornam possível o cultivo de inúmeras culturas alimentícias, o que possibilita geração de renda e lucro. Como

consequência, uma grande quantidade de resíduos é gerada. Além das indústrias alimentícias, outros setores da indústria e comércio produzem uma vasta quantidade de subprodutos, tais como as indústrias de papel e celulose, serrarias e usinas de álcool, caracterizando assim, várias fontes de deposição de materiais que não serão utilizados para os fins objetivados àquele setor (RAMOS; FONTANA, 2004). Por essa ótica, o país apresenta potencial para aplicação destes resíduos em processos biotecnológicos em virtude das diversas composições químicas que estes apresentam, relacionados às características ambientais de onde são produzidos.

A matéria orgânica é formada por proteínas, açúcares, ácidos orgânicos, óleos essenciais e sais e seu destino inadequado pode gerar problemas ambientais e sociais. (NASCIMENTO-FILHO; FRANCO, 2015). Por essa constante e crescente preocupação, a utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos vem tomando espaço ao longo dos anos, com o desenvolvimento de tecnologias que favoreçam o meio ambiente, pela geração de produtos de valor agregado, tais como enzimas, etanol, ácidos orgânicos, óleos essenciais e metabolitos secundários (SÁNCHEZ, 2009; KNOB et al., 2014).

A fim de reduzir a deposição destes resíduos na natureza, a produção de enzimas aparece como uma importante alternativa. Nos últimos anos, resíduos como farelos, cascas, palhas e bagaços de frutas vêm sendo empregados como substratos para o crescimento de microrganismos e na produção destes biocatalisadores (WOICIECHOWSKI et al., 2013, DHILLON e KAUR, 2016).

Como exemplo, β-glicosidases foram produzidas empregando-se como substratos a casca de acabaxi, casca de maracujá, farelo de trigo, casca de arroz, farelo de soja, palha e sabugo e farelo de milho e bagaço de cana-de-açúcar (LEITE et al., 2008; MADHU; BEENA; CHANDRASEKARAN, 2009; BEITEL e KNOB, 2013; ALMEIDA et al., 2015; de CASSIA PEREIRA et al, 2015; ALMEIDA et al., 2016; SANTOS et al., 2016), enquanto que endoglucanases foram produzidas usando o farelo de arroz, casca de arroz, casca e farelo de trigo, sabugo de milho, casca de junco, bagaço de cana e casca de laranja (JECU, 2000; PANAGIOTOU et al., 2003; BADHAN et al., 2007; GAO et al., 2008; KARMAKAR; RAY, 2010; ROCKY-SALIMI; HAMIDI-ESFAHAMI, 2010).

1.10 Casca de maracujá

O maracujazeiro é uma angiosperma importante na fruticultura mundial por produzir o maracujá, fruto bastante apreciado pelo seu sabor e aroma. Pertencente à família

Passifloraceae Juss. ex Roussel, do gênero *Passiflora* L., o maracujazeiro é um vegetal de climas tropicais e subtropicais, cultivado principalmente na América do Sul, em países como Equador, Colômbia, Peru e o Brasil, destacando-se este último como seu maior produtor. (PIRES et al., 2011).

O consumo do maracujá pode ser na forma *in natura* ou polpa concentrada, utilizada para obtenção de sucos e doces, podendo ser comercializado internamente no país ou exportado para outros países (NASCIMENTO; CALADO; CARVALHO, 2012). A sua industrialização gera por ano cerca de 54 mil toneladas de resíduos, como cascas e sementes (LÓPEZ-VARGAS et al., 2013). Alternativas para amenizar o seu descarte e contaminação na natureza podem ser utilizadas para o seu aproveitamento, visto que, em relação a composição deste fruto, apenas 23% corresponde ao suco, enquanto que a semente e a casca correspondem a 26% e 50% de seu peso bruto, respectivamente (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004).

Este resíduo pode ser aproveitado como suplemento em alimentos e na formulação de novos produtos pela indústria alimentícia como observado nos últimos anos (COELHO; AZÊVEDO; UMSZA-GUEZ, 2016). A composição centesimal da farinha seca a 60 ºC está apresentada na Tabela 1. Na biotecnologia, estudos têm reportado seu emprego na produção de enzimas microbianas, como as pectinases produzidas por *Aspergillus oryzae* (JARAMILLO et al., 2016) e as β-glicosidases produzidas por *Penicillium verruculosum* (ALMEIDA et al., 2015). A produção de enzimas a partir da casca de maracujá aparece como uma nova alternativa para a utilização deste resíduo, visto que o seu maior aproveitamento tem sido restrito à elaboração de novos produtos alimentícios, na indústria de fármacos e de produtos agrícolas (COELHO; AZÊVEDO; UMSZA-GUEZ, 2016).

Tabela 1. Composição centesimal da farinha da casca de maracujá. Adaptado de Ferreira; Pena (2010).

Determinações	**g/100g de resíduo**
Umidade	5,9
Proteína	6,0
Resíduo Mineral Fixo	2,9
Gordura	2,1
Fibra Alimentar Total	62,0
Carboidratos	21,1

1.11 O gênero *Thermoascus* e a espécie *T. crustaceus*

O grupo termofílico dos ascomicetos compreende um total de vinte e três espécies pertencentes a nove gêneros, incluindo o gênero *Thermoascus* (SALAR ANEJA, 2007). Este último pertence à família Thermoascaceae, ordem Eurotiales. A maioria das espécies são cosmopolitas e atuam como saprófitos na degradação da matéria orgânica nos ambientes naturais, bem como em matérias-primas de maior complexidade estrutural, como resultado de uma maquinaria genética robusta e adaptada. Para a produção de enzimas como celulases, em especial β-glicosidases, que são produzidas em baixas quantidades por outros organismos, *Thermoascus* apresenta-se como uma fonte viável para o emprego em alguns ramos industriais, como exemplo as de ração animal, de combustível e etanol, cervejarias e destilarias (OSTERGAARD; OLSEN, 2010). Nesse sentido, *Thermoascus aurantiacus* vem sendo utilizado para produção de celulases em diferentes fontes de carbono, bem como para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (JAIN et al., 2014).

A espécie *Thermoascus crustaceus* foi inicialmente isolada de detritos de gramíneas costais, sendo descrita como *Dactylomyces crustaceus* (APINIS; CHESTERS, 1964). Posteriormente, este fungo foi transferido para o gênero *Thermoascus* por Stolk, em 1965. Com o passar dos anos, sua presença foi reportada nos mais diversos locais, como em áreas de mineração de carvão, bagaços vegetais em decomposição, produtos pasteurizados, no solo e serapilheira, em lugares com incidência de queimadas ocasionais, bem como em compostagens. Até o momento, sua ocorrência foi descrita em alguns países da África, Europa, Ásia, América do Norte e América do Sul (APINIS; CHESTERS, 1964; STOLK, 1965; MOUCHACCA, 1997; WAREING, 1997; SCARAMUZZA; BERNI, 2014, ALVAREZ; CASTILLO; ITURRIETA, 2017), o que demonstra uma natureza ubíqua. Seus esporos, além de serem facilmente carregados pelo vento, sendo dispersos por longas distâncias, possuem a característica de resistência a climas adversos por conta de sua constituição química, sendo também denominados de propágulos de resistência. Em pacientes imunocomprometidos, este fungo pode acometer a região peritoneal após a inalação de seus esporos. Como consequência apresentam diagnósticos de risco quanto a complicações na membrana que recobre o abdômen e órgãos abdominais (OZ et al., 2010; ALVAREZ; CASTILLO; ITURRIETA, 2017).

Essa espécie é pouco mencionada na literatura como produtora de enzimas, sendo descrita apenas a produção de amilases, xilanases e lipases (OGUNDERO, 1979; OGUNDERO, 1980) e de baixos níveis de celulases (KAWAMORI; TAKAYAMA;

TAKASAWA, 1987), quando comparados à espécie do mesmo gênero *T. aurantiacus*, amplamente conhecida e utilizada como produtora de celulases.

CAPÍTULO I – Molecular identification and phylogeny of thermophilic fungi isolated from Araucaria Forest - Brazil.

1. INTRODUCTION

Everyday human race needs to satisfy the curiosity about everything around and give a comprehensive sense to the mysteries of knowledge. The natural history of all living forms on Earth is an example, and remains, in some views, ununderstood or unknown. Approaches used as a form to understand evolution, as morphological and physiological patterns, left many gaps and unresolved knowledge issues (YANG, 2011). Fossil record would be most appropriate, but remains incomplete and fragmented. By this way, new and revolutionary methods needed to be developed. With the molecular analysis, in the recent few years, classical approaches had a strong support. Together they are a robust and congruent form to interpret evolution patterns (HIBBETT et al., 2007; YANG, 2011).

Fungi are eukaryotic microorganisms that play ecological roles as decomposers, mutualists, and pathogens of animals and plants. They are fundamental to drive carbon cycling in forest soil, mediate mineral nutrition of plants and releave carbon limitations of other soil organisms (BLACKWELL, 2011). Thermophilic fungi are a particular group of fungi. They show interesting features to grow at high temperatures, as structural and physiological modifications, unusual to the others eukaryotic forms (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000).

To date, phylogenetic relationship in some fungi clades remains poorly documented because of lack of information, molecular mainly, in several species as well as the large amount of organisms to be discovered (HAWSWORTH, 2001). In recent study, Tedersoo and collaborators (2014) contemplated efforts about soil fungal diversity around the World (see Figure 1). In it, there is a curious gap in South America, and the Brazillian region appears without an empirical diversity. However, nearly equatorial and tropical areas are the nest of high species diversity. Climatic and edaphic conditions provide this amount of apparent lineages (SERNA-CHAVEZ; FIERER; BODEGOM, 2013).

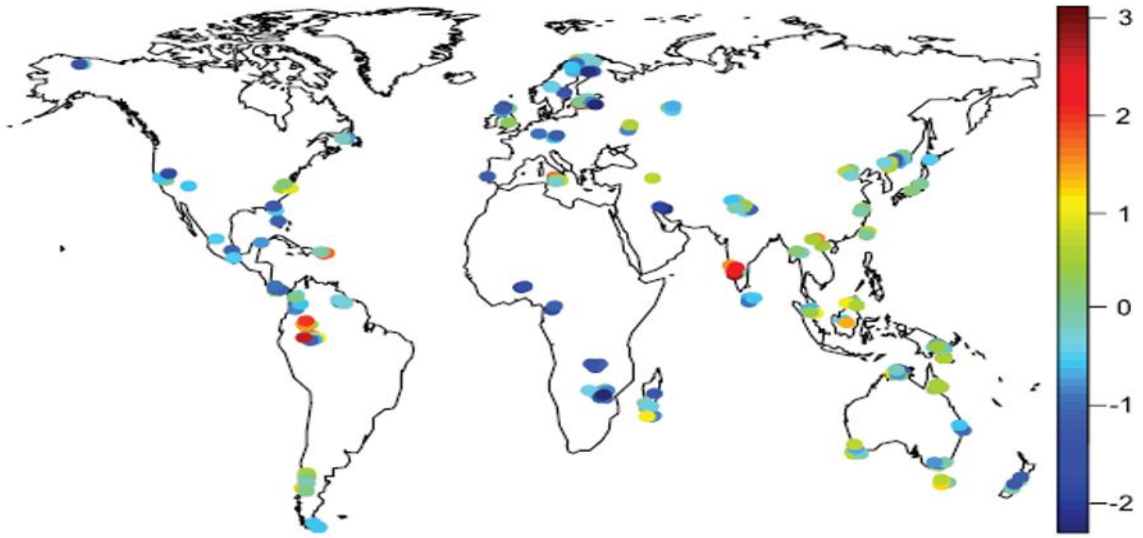


Figure 1. Sampled global areas. Circles indicate study sites. Warm colors indicate rich taxonomic sites, whereas cold colors indicate poor taxonomic sites. Adapted from Tedersoo et al. (2014).

In recent years, throught the use of DNA based markers some problems relationed to misidentifications about the correct fungal lineages names and the phylogenetic relationship have been softened (HIBBETT; TAYLOR, 2013). In this regard, the internal transcribed spacer (ITS) from the nuclear ribosomal region is a robust tool to resolving such problems because they have high power of resolution to the species level by it highly intraspecific conservation (CHEN et al., 2004; SHARMA et al., 2008; HOUBRAKEN; SAMSON, 2011) and is considered universal DNA barcode for fungi (SCHOCH et al., 2012). Ribosomal DNA (rDNA) is one of the most conserved regions in the genome yet interspersed with variable regions that can be useful in deciphering phylogenetic divergence (SHARMA et al., 2008).

Classical taxonomy based on colony morphology, hyphal structure and spore arrangement places the thermophilic fungi in one of the following classes, i.e. zygomycete, ascomycete and hyphomycete (MOUCHACCA, 1997). However, morphological differences within strains grown on different media types and cultural conditions are usually observed. Moreover, the practice of interchangeably using names of asexual (anamorph) and sexual (teleomorph) stages of same fungus also results in confusion in identifying these fungi (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; HIBBETT; TAYLOR, 2013). A taxonomic account of thermophilic fungi (MOUCHACCA, 1997) and a critical review on their physiology (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000) has highlighted these points. Therefore, it is timely relevant that the strains must be classified at molecular level (HIBBETT; TAYLOR, 2013).

Due to the absence of molecular data, the phylogeny of thermophilic fungi Neotropical lineages is unknown. This issue engenders investigations and the understanding about the inception and diversification of them. Empirical work that presents a robust phylogeny to this group were done by Pan et al. (2010) and Morgenstern et al. (2012). However, among 115 specimens analysed, none of them were sampled from Brazillian bioms. This lack of data affects significant aspects with respect to hypothesized phylogenies, coevolution relastionships, and correct interpretation of biogeographic patterns (MUELLER; SCHIMT, 2007). Understand about the fungal diversity allow us to predict new approaches with regard to management and biodiversity conservation, considering these habitats with high devastation rates.

With this is mind, we focused to evaluate the diversity of thermophilic fungal species from Atlantic Forest biome and provide a putative phylogenetic relationship tree to the encountered strains.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Taxon sampling

We included 40 accessions (22 taxa) in this study. The all group comprised only thermophilic fungi that have been placed in the most recent and old circumscriptions (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; PAN et al., 2010; MORGENSTERN et al., 2012). The ingroup comprised nine accessions of *Thermoascus* (3 taxa), six of *Aspergillus* (4), two of *Thermomyces* (2), six of *Thielavia* (4), ten of *Rhizomucor* (3), and six of *Rhizopus* (5). Outgroup taxa belong to genera *Batrachochytrium* and was choosen based on Morgenstern et al. (2012), to root the tree and give temporal sense to our analyses.

2.2 Sampling area and sample collection

A total of 30 soil and 30 leafs litter samples were collected from three Araucaria forest, Paraná, Brazil. Fazenda Canarinho (site 1), Parque Natural Municipal das Araucárias (site 2), and Parque Municipal São Francisco da Esperança (site 3). These sites exhibited heterogeneity with regard to the species in native climax, predominance of *Araucaria*, tree species, shrubs and herbs. Soil samples and organic layer were taken in each site from depths of 0-20 cm using a soil liner sampler and from the surface, respectively, and transferred to sterilized plastic bags, mixed thoroughly, stored at 4 ºC, and processed within a few days.

2.3 Fungal isolation and maintenance

Sabouraud culture media was used to obtain fungi from soil and organic layer samples. For purpose to inhibit bacterial growth, 100 mg of chloramphenicol per liter was add to the media. The isolation method was based on a series of dilutions (CLARK, 1965). Soil sample (1 g) was blended with sterile distilled water (SDW, 10 ml) followed by three serial dilutions with sterilized water. Organic layer sample (10 g) was crushed with 100 ml (SDW) in a food processor followed by serial dilution, as described. After plating, the plates were incubated at 45º C and monitored at regular time interval for monitoring the appearance of any fungal growth. These were checked for purity, and impure isolates were purified by successive plating. After ensuring purity, the fungal strains were subcultured on Vogel agar slants and allowed to grow for 7 days at 45 °C and subsequently stored at 4 °C by Castellani method.

2.4 DNA extraction, PCR amplification, and sequencing

The strains were grown at 45 ºC in Czapek media contained in Erlenmeyer flasks and shaken at 200 rpm to form pellets. The mycelium was collected and washed with distilled water, frozen with liquid nitrogen and ground to a fine powder with a mortar and pestle. Genomic DNA was extracted from 15–20 mg of fungal pellets using a CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method (DOYLE; DOYLE 1987).

DNA amplification was performed in a thermocycler (Mastercycler®, Eppendorf, USA). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the ITS5-ITS4 DNA region was achieved in one fragment using ITS5 forward (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primers from White et al. (1990). PCR amplification of the ITS5-ITS4 comprised about 20 ng genomic DNA, 1 x Biolase™ Buffer with 1.5 mM $MgCl_2$ (Bioline, London, UK), 10 µM of each primer, 0.2 mM each dNTPs, and 1.25 unit of Biolase™ DNA polymerase (Bioline). The reaction was adjusted with ddH_2O final volume of 20 µL. The amplification profiles included an initial denaturing at 94º C for 5 min, 30 cycles of 30 s at 95 ºC (denaturation), 60 s at 50 ºC (annealing), and 60 s at 72 ºC extension, with a final extension at 72 °C for 7 min.

PCR products were cleaned with the QIAquick PCR purification spin columns (Qiagen). Cleaned PCR products were quantified using the NanoDrop 2000 spectrophotometer with the software NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Sequencing was performed in 10 µl reactions using BigDye Terminator sequencing reagents and protocols (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), and data were collected on an ABI-*Prism* 3500 automated sequencer (Applied Biosystems) by ACTGene Molecular Analyses at Federal University of Rio Grande do Sul. The ITS5-ITS4 was sequenced in both directions using the primers above. All sequences were deposited in GenBank.

2.5 Sequence alignment and phylogenetic analyses

Complementary DNA sequences were assembled for each accession using Geneious® 8.1.9 (KEARSE et al., 2012; BIOMATTERS, 2013). Multiple-sequence alignment was performed using Clustal W (CHENNA et al., 2003) followed by manual optimization. Manual alignment and optimization were performed in Se-Al v2.0a11 (RAMBAUT, 2002).

Phylogenetic analysis of ITS5-ITS4 was performed using maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), and Bayesian inference (BI). Based on the Akaike information criterion (AKAIKE, 1974; POSADA; BUCKLEY, 2004), data set was evaluated for the appropriate model of molecular evolution using ModelTest v. 3.7 (POSADA; CRANDALL, 1998).

Clade support for both MP and ML phylogenies were assessed with a bootstrap analyses using 10,000 replicates with 100 random addition sequence replicates, and tree bisection and reconnection (TBR) branch swapping as implemented in PAUP* 4.01b10 (SWOFFORD, 2002). Bootstrap analyses (10000 pseudoreplicates) were conducted with the same parameters to examine the relative level of support for clades on the cladograms (FELSENSTEIN, 1985).

The BI tree was constructed using MrBayes v.3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Four Markov Chain Monte Carlo simulations were run simultaneously and sampled every 100 generations for a total of 50 000 000 generations until the average deviation of split frequencies was well below 0.01. The first 25000 (25%) of the sample trees from each run were discarded (as the burn-in) as determined by Tracer v.1.6.0 (RAMBAUT et al., 2013). A Bayesian posterior probability (PP) tree was constructed from the remaining trees. The analyses were performed in the Urticineae Laboratory of the Instituto de Botânica, Brazil.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Among the fungi, only a few species have a unique mechanism of growing at elevated temperatures between 45 and 55 °C. According to Cooney and Emerson (1964), such fungi are arbitrarily distinguished in two groups, based on their temperatures of growth. The thermophilic fungi exhibit a minimum temperature of growth at or above 20 °C and a maximum growth temperature at or above 50 °C, while thermotolerant fungi have a temperature range of growth from below 20 to ~50 °C. Alternatively, Maheshwari et al. (2000) proposed a simpler classification, in which thermophilic fungi comprise those species with optimum growth temperature of 45 °C or above. Since the fact that only one temperature was applied in the isolation of thermophilic fungi (45 °C), the distinction between thermophilic and thermotolerant was not taken into account in the present investigation.

From 60 collected samples of soil and leaf litter of Araucaria Forest, approximately 250 heat-tolerant fungal strains were isolated from Araucaria Forest remanescents. Among all the isolates obtained, a total of eight morphological distinct strains were recognized.

Based on ITS nucleotide sequence analyses, the isolated strains were classified into seven species, including *Thielavia terrestris* (GenBank accession number, MG694572), *Thielavia* sp. (MG694573), *Thermoascus crustaceus* (MG694569 and MG694570), *Aspergillus fumigatus* (MG694571), *Rhizomucor miehei* (MG694574), *Rhizomucur pusillus* (MG694575), and *Rhizopus microsporus* (MG694576). These results corroborate with Morgenstern et al. (2012) that reported that few thermophilic fungi species have been described being around 40 of the 120,000 currently accepted species (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017). Thus, a great diversity of thermophilic fungi species was recorded in Araucaria Forest fragments.

Much is known about the occurrence of these microorganisms in habitats where decomposition of plant material takes place, including piles of plant material, power plant cooling systems, pond sediments composting systems, nesting material of birds and various types of soils (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; LEE et al., 2014). These warm and humid environments provide the basic conditions for their development (SALAR; ANEJA, 2007).

Soil is an excellent ecological niche for colonization of thermophilic fungi. It is interesting that these microorganisms are ubiquitous in soils where the sun can heat them up, reaching temperatures that are suitable for their germination and growth (RAJASEKARAN; MAHESHWARI, 1993; AHIRWAR et al., 2017). However, only a few studies have reported

the isolation of thermophilic fungi from tropical and temperate soils (REDMAN et al. 1999; CÓRDOVA et al., 2003; SALAR; ANEJA 2007; PAN et al. 2010; POWELL et al., 2012).

In forest ecosystems, thermophilic fungi are fundamental in the organic matter decomposition succeeding a mesophilic microbiota, which, through their intense metabolic activity, promote a rapid increase in temperature that favors thermophilic species (HEATON et al., 2012). Here the latters play an important role in the breakdown of complex substances, such as polysaccharides and lignin (SZÉKELY et al., 2009).

Although considerable research has been devoted to thermophilic fungi, studies related to soil thermophilic fungi are still incipient, thus not revealing their existing diversity. With regard to Brazilian soils, some reports have focused on individual isolates having potential applications (MORETTI et al., 2012), which did not bring significant contributions to the measurement of the existing diversity, as well as to the understanding of their functions in these niches.

In other countries, species not yet described have often been found (FROCK; KELLY, 2012). According to Oliveira et al. (2015), the number of thermophilic and thermotolerant fungi described tends to increase as new habitats are evaluated. However, more attempts are needed to understand the distribution, phylogeny, coevolution relationships, biogeographic patterns and ecology of thermophilic fungi in the present environmental scenario of global deforestation.

The lack of samples of thermophilic fungus from the Neotropical region is a limiting factor for the understanding of the estimation of distribution ranges, phylogeny and systematic of the group, because of its exceptional levels of species endemism and species richness. Although studies in a broader range of sites are required, these results open new avenues in relation to the diversity of fungal thermophilic fungus of original Atlantic forest cover.

The ITS marker identified almost all isolated fungal strains because it has the most clearly defined barcode gap between inter and intraspecific variation (SCHOCH et al., 2012). However, one fungal isolate of the genus *Thielavia* did not present species level definition with amplification of ITS region.

Thielavia is a common genus of environmental ascomycetes belonging to the family Chaetomiaceae in the order Sordariales. Their taxonomy and phylogeny have been the subject of some confusion, because optimal markers for species distinction have not been established yet. The ITS region is highly conserved in Sordariales. As a result, it is not very useful to

establish phylogenetical relationships at species level (STCHIGEL et al., 2002). Thus, the amplification of other molecular markers must be performed, since it can provide discrimination of this fungal strain at the species level. On the other hand, since most unknown species are found in the Neotropical realm, the least explored major region in the world, this fungal strain should be investigated more accurately, because could represent a new specie.

All isolates were included in two well-supported clades that were formed in Bayesian consensus tree (Figure 2). The first comprises *Rhizopus* spp. and *Rhizomucor* spp., which are classified under the phylum Mucoromycota, subphylum Mucoromycotina and order Mucorales (SPATAFORA et al., 2016). This fungal order, in its turn, fall into two major clades. *R. miehei* is supported as the sister taxon of *R. thauricus* (97% BP). The other clade is constituted by *R. pusillus* strains (95% BP).

Within the Mucoromycotina, the largest order Mucorales includes predominantly saprotrophic inhabitants of soil and organic decaying matter. In addition, some species are parasits on insects, plants and fungi, while others are opportunistic pathogens of animals, including man (RICHARDSON, 2009).

For a long time, zygomycete fungi were classified as a single phylum using only morphological features. However, recent phylogenetic studies based on one or a few genes proved that the group is polyphyletic. As a consequence, the phylum "Zygomycota" was abandoned and, until recently, these fungi have been regarded as a complex of several non-related subphyla, informally referred to herein as zygomycetes (HIBBET et al., 2007).

Recently, Spatafora et al. (2016) proposed a new taxonomic structure for the zygomycetes in kingdom-level, showing that the group comprise two major clades that form a paraphyletic grade. Thus, a new formal phylogenetic classification was suggested, so that the phyla Mucoromycota and Zoopagomycota were circumscribed. The last constitutes a phylogenetically ancient and early divergent group of zygomycetes and comprises Entomophtoromycotina, Kickxellomycotina and Zoopagomycotina. On the flip side, Mucoromycota is the more derived clade of zygomycetes and comprises Glomeromycotina, Mortierellomycotina, and Mucoromycotina.

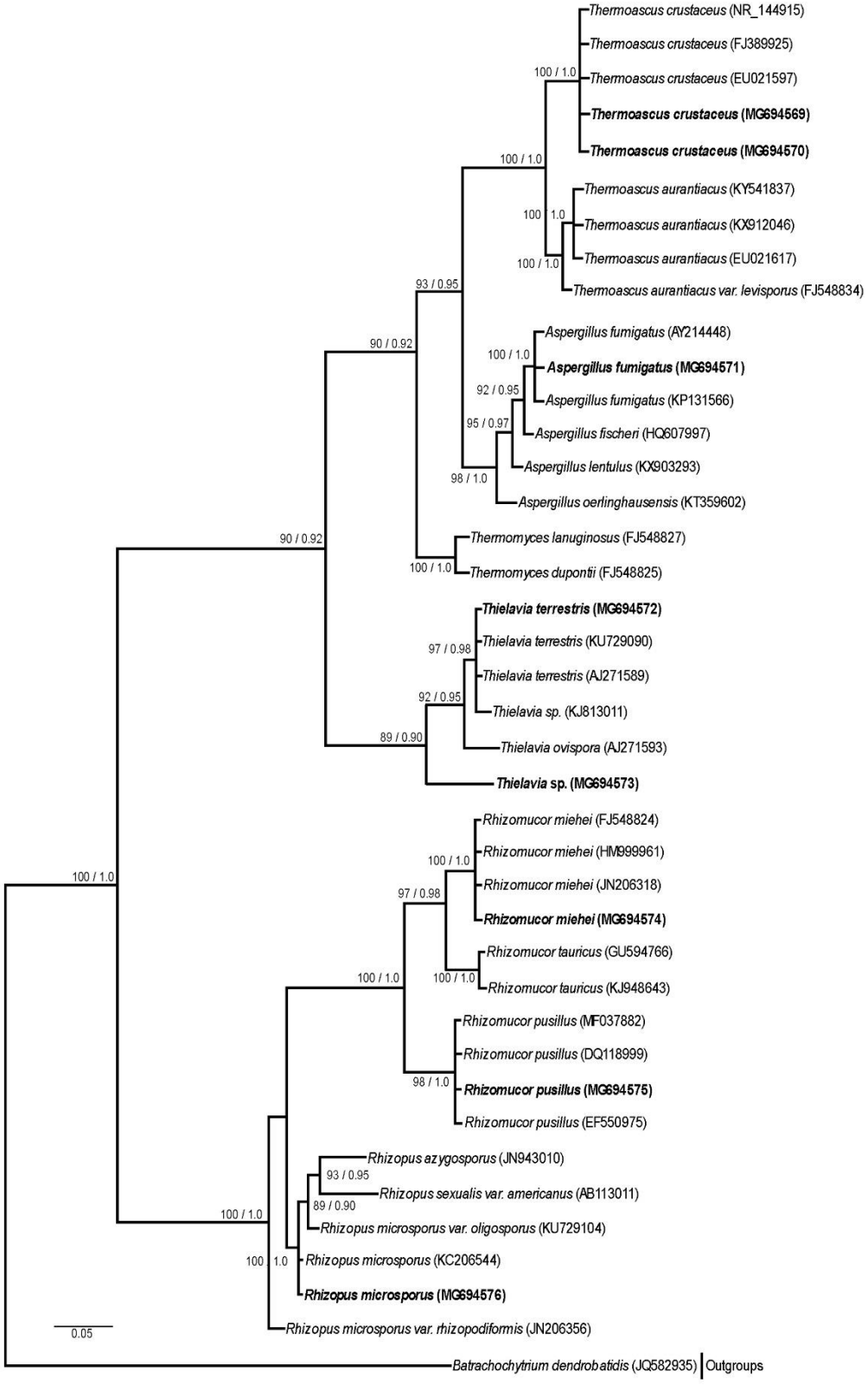


Figure 2. Bayesian consensus tree for thermophilic fungi based on molecular data (ITS). The number along the branches indicate support (maximum likelihood bootstrap [BP] / Bayesian posterior probability [PP])

In this regard, Hoffmann et al. (2013) also proposed a new taxonomic structure for the families within the order Mucorales, which better reflects the phylogenetic relationships within the group. Among the main differences between their current classification and preceding concepts, the genera *Rhizopus* originally attributed to Mucoraceae family was moved to the mucoralean family Rhizopodaceae K. Schum, while genera *Rhizomucor* was maintained in Mucoraceae family.

The ability of thermophilic fungi to develop at high temperature was displayed by a few "zygomycetes" including *Rhizomucor nainitalensis*, *Rhizopus rhizopodiformis*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* and *Rhizopus microsporus* (ZHOU et al., 2014). As mentioned above, the last three species were isolated in the present investigation.

The second formed clade comprises species from Ascomycota phylum, Sordariales and Eurotiales Order. All of them have been known as thermophilic moulds found mainly in lignocellulosic degrading biomass with a widespread distribution around the world (HIBBETT et al., 2007; BERKA et al., 2011; MORGENSTERN et al., 2012; VAN DEN BRINK et al., 2015; WIJAYAWARDENE et al., 2018).

In the Ascomycota, thermophilic fungi are limited to the Sordariales, Eurotiales and Onygenales (MORGENSTERN et al., 2012). However, none thermophilic Onygelanes strains was observed in the present study.

For the Sordariales, we have included the sequences from *Thielavia* sp. and *T. terrestris* (Sordariomycetes Class, Chaetomiaceae family). In this order, Chetomiaceae is the unique family with thermophilic lineages (BERKA et al., 2011). The non-identified species of *Thielavia*, *T. terrestris* and *T. ovispora* constitute a major clade supported by 89% BP. *T. terrestris* is supported as the sister taxon of *T. ovispora* (92% BP).

In Eurotiales order, a clade containing Trichocomaceae (*Thermomyces* spp.), Aspergillaceae (*Aspergillus* spp.) and Thermoascaceae (*Thermoascus* spp.) (WIJAYAWARDENE et al., 2018) is supported by 93%. The clade containing *Aspergillus* spp. is the sister of the clade covering *Thermoascus* spp. (93% BP). In addition, *T. crustaceus* is strongly supported as the sister taxon of *T. aurantiacus* (100% BP).

According to Morgenstern et al. (2012), seven species of Eurotiales are recognized as thermophiles: *Thermoascus aurantiacus*, *T. crustaceus*, *Talaromyces thermophilus*, *Talaromyces leycettanus*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonii* and *Thermomyces lanuginosus*. *Aspergillus sp.* is not a truly thermophile, some species are

thermotolerante, as regarded by Cooney and Emerson (1964). These results raise questions about thermophilic genesis in fungi.

It has been suggested that thermophilia in the Kingdom Fungi emerged as an adaptation to seasonal changes and high diurnal temperatures, rather than as adaptation of new high-temperature niches occupancy (POWELL et al., 2012). For some authors, thermophilic fungi arose from mesophilic ancestors associated with bird nests, as noticed in Australia (Megapodiidae) (COONEY; EMERSON 1964; RAJASEKARAN; MAHESHWARI, 1993). Through the use of decaying organic material, these birds thermoregulate their nests, which reach approximately 45 °C and exhibit fungi as their main decomposers (SEYMOR; BRADFORD, 1992).

To our knowledge, only one study reports a *THTA* encoding gene responsible for thermal sensitivity on *A. fumigatus* moulds and it is possible that did evolved to function as an important gene for high temperature growth (CHANG et al., 2004). Furthermore, whether *THTA* similar encoding gene is conserved in Zygomycetes species as well as they are phylogenetically distant from ascomycetous fungi, it would be interesting to find out whether this similar enconding gene exist in thermophilic fungi such as species of the genera *Thermomyces* or *Thermoascus*.

4. CONCLUSION

Seven thermophilic fungal species were found in this study, and corroborate with the apparent diversity in the Neotropical realm, as well as were included in a well-supported taxonomic group, to enhance our knowledge, using a combination of phylogenetic approachs to give a robust analysis.

There are many questions unresolved about fungal phylogeny, especially those thermophilic. To date, very few molecular data related to fungal thermophilic are available in the public sequences databases, and attempts of reconstructing phylogenies at a global scale obviously suffer from the lack of Brazilian reference data. In the presente study, we fillined this gap, by yielding a first phylogenetic analysis of Brazilian fungal thermophilic species.

5. REFERENCES

AHIRWAR, S. et al. Isolation and screening of thermophilic and thermotolerant fungi for production of hemicellulase from heated environments. **Mycology**, v. 8, p. 125-134, 2017.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, p. 716-723, 1974.

BERKA, R. M. et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922-927, 2011.

BIOMATTER. Geneious ® 8.0.2. **Biomatters Development Team**, 2014.

BLACKWELL, M. The fungi: 1,2,3… 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CHANG, C. Y. et al. *THTA*, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 888-896, 2004.

CHEN, C. A. et al. Secondary structure an phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in scleratinian corals. **Zoological Studies**, v. 43, n. 4, p. 759-771, 2004.

CHENNA, R. et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3497-3500, 2003.

CLARK, F. E.; Agar-plate method for total microbial count. In: BLACK, C.A.;EVANS, D.; WHITE, J. L.; ENSMINGER, L. E.; CLARK, F. E.; DINAUER R. C. (Eds.). **Methods of soil analysis**. Part 2. Chemical and microbiological properties. New York: Madson Inc., p. 1460-1466, 1965.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi: an account of their biology, activities and classification.** W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1964.

CÓRDOVA, J. et al. Identification of mecixan thermophilic and thermotolerant fungal isolates. **Micologia Aplicada International**, v. 15, n. 2, p. 37-44, 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FROCK, A. D.; KELLY, R. M. Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis. **Chemical Engeneering**, v. 1, p. 363-372, 2012.

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

HAWSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycology Research,** v. 105, n. 12, p. 1422–1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017. HEATON, L. et al. Analysis of fungal networks. **Fungal Biological Reviews**, v. 26, p. 12-29, 2012.

HIBBETT, D. S. et al. A high level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research**, v. 3, n. 1, p. 509-547, 2007.

HIBBETT, D. S.; TAYLOR, J. W. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? **Nature Reviews**, v. 11, p. 129-133, 2013.

HOFFMANN, K. et al. The family structure of the *Mucorales*: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia**, v. 30, p. 57-76, 2013.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1-51, 2011.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 12, p. 1647-1649, 2012.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MORGENSTERN, I. et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**, v. 2, n. 6, p. 489-502, 2012.

MORETTI, M. M. S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1062-1071, 2012.

MOUCHACCA, J. Thermophilic fungi: Biodiversity and taxonomic status. **Cryptogamie Mycologie**, v. 18, 19-69, 1997.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? what can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 1-5, 2007.

PAN, W. et al. Diversity of thermophilic fungi in Tengchong Rehai National Park revealed by ITS nucleotide sequence analyses. **The Journal of Microbiology**,v. 48, n. 2, p. 146-152, 2010.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** v. 14, p. 817-818, 1998.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. 2004. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. **Systematic Biology**, v. 53, p. 793-808, 2004.

POWELL, A. J. et al. Thermophilic fungi in an ariland ecosystem. **Mycologia**, v. 104, n. 12, p. 813-825, 2012.

RAMBAUT, A. Se-Al. Sequence alignment editor, version 2.0a11, 2002.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, W.; DRUMMOND, A. J. Tracer version 1.6.0, 2013.

RAJASEKARAN, A. K.; MAHESHWARI, R. Thermophilic fungi: an assessment of their potential for growth in soil. **Journal Bioscience**, v. 18, p. 345-354, 1993.

REDMAN, R. S. et al. Fungi from geothermal soils in Yellowstone National Park. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5193-5197, 1999.

RICHARDSON, M. The ecology of the zygomycetes and its impact on environmental exposure. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 5, p. 2-9, 2009.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SALAR, R. K.; ANEJA, K.R. Thermophilic fungi. Taxonomy and biogeography. **Journal of Agricultural Technology**, v. 3, p. 77-107, 2007.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 9, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SERNA-CHAVEZ, H. M.; FIERER, N.; BODEGON, P. M. Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. **Global Ecology and Biogeography**, v. 22, p. 1162-1172, 2013.

SEYMOR, R. S.; BRADFORD, D. F. Temperature regulation in the incubation mounds of the Australian brush-turkey. **The Condor**, v. 94, p. 134-150, 1992.

SHARMA, M. et al. Molecular characterization of multiple xylanase producing thermophilic/thermotolerant fungi isolated from composting materials. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 526-535, 2008.

SPATAFORA, J. W. et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. **Mycologia**, v. 108, n. 5, p. 1028-1046, 2016.

STCHIGEL, A. M. et al. New species of *Thielavia*, with molecular study of representative species of the genus. **Micological Research**, v. 106, n. 8, p. 975-983, 2002.

SWOFFORD, D. L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: **Sinauer**, 2002.

SZÉKELY, A. J. et al. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. **Microbial Ecology**, v. 57, p. 522-533, 2009.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, p. 1078-1088, 2014.

VAN DEN BRINK, J. Thermophilic growth and enzymatic thermostability are polyphyletic traits within *Chaetomiaceae*. **Fungal Biology**, v. 119, n. 12, p. 1255-1266, 2015.

WIJAYAWARDENE, N. N. et al. Outline of *Ascomycota*: 2017. **Fungal Diversity**, v. 88, n. 1, p. 167-263, 2018.

YANG, Z. L. Molecular techniques revolutionize knowledge of basidiomycete evolution. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 47-58, 2011.

ZHOU, P.; ZHANG, G.; CHEN, S.; JIANG, Z.; TANG, Y.; HENRISSAT, B.; YAN, Q.; YANG, S.; CHEN, C-F.; ZHANG, B.; DU, Z. Genome sequence and transcriptome analysis of the thermophilic zygomycete fungus *Rhizomucur miehei*. **BMC Genomics**, 15: 294, 2014.

CAPÍTULO II – Bioprospecção de fungos filamentosos termófilos isolados de floresta ombrófila mista produtores de β-glicosidases: otimização da produção

1. INTRODUÇÃO

A termofilia está amplamente presente em bactérias e arquéias. Para formas eucarióticas, essa característica está limitada a uma fração de organismos pertencentes ao Reino Fungi (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000). Definida como a capacidade de tolerância térmica de sobrevivência, a termofilia possibilita aos organismos que a exibem sobreviver em ambientes de temperaturas elevadas (OLIVEIRA; GOMES; RODRIGUES, 2015).

Os fungos termófilos apresentam uma importância ecológica significativa, onde são fundamentais no processo de decomposição da biomassa lignocelulósica, principalmente em ecossistemas florestais (HEATON et al., 2012). Participam deste processo em conjunto com microrganismos mesofílicos, que por meio da sua intensa atividade catalítica promovem um rápido aumento da temperatura, favorecendo a ascensão dos termofílicos e termotolerantes que serão importantes na catálise de substâncias complexas, como polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina) e lignina (SZÉKELY et al., 2009; LEE et al., 2014).

A importância de fungos termófilos também reside em nível industrial, visto que o emprego de suas enzimas termofílicas permite que os bioprocessos sejam conduzidos sob temperaturas mais elevadas, tais como o branqueamento na indústria de polpa e papel, a remediação de efluentes e de águas residuais e a produção de biocombustível de segunda e terceira gerações (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003; GIANFREDA; RAO, 2004; SIGOILLOT et al., 2005; TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007; FROCK; KELLY, 2012). A condução dos procedimentos em temperatura mais elevada fornece diversas vantagens, como maiores taxas de fermentação, menores tempos de reação, redução do risco de contaminação por mesofílicos, e redução na viscosidade do meio (FROCK; KELLY, 2012; OLIVEIRA; GOMES; RODRIGUES, 2015). Nesse sentido, a bioprospecção de fungos termófilos produtores de enzimas de interesse industrial pode contribuir para aumentar a variedade das enzimas produzidas, bem como reduzir seus custos (BANERJEE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010), visto que algumas espécies exibem capacidades catalíticas maiores, quando comparadas às espécies mesofílicas de referência (BERKA et al., 2011).

Atualmente, um dos principais desafios para viabilizar a aplicação de enzimas microbianas na indústria está atrelado ao seu alto custo de produção. Nesse sentido, a utilização de fontes renováveis nos processos de produção de enzimas surge como uma interessante alternativa, tanto para reduzir seus custos, quanto para remediar o problema ambiental causado pelo descarte inapropriado desses materiais no ambiente. Os resíduos

agroindustriais são formados por matéria orgânica e contêm proteínas, açúcares, ácidos orgânicos, óleo essenciais e sais (NASCIMENTO-FILHO; FRANCO, 2015) sendo uma ótima alternativa para utilização em bioprocessos, como tecnologias que favoreçam o meio ambiente e a sociedade pela geração de produtos de valor agregado (KNOB et al., 2014), tais como enzimas, etanol, ácidos orgânicos, óleos essenciais e metabolitos secundários (SÁNCHEZ, 2009).

Neste contexto, a casca de maracujá surge como uma matéria-prima atraente para ser empregada nos processos de produção enzimática (ALMEIDA et al., 2015; COELHO; AZÊVEDO; UMSZA-GUEZ, 2016; JARAMILLO et al., 2016), visto que aproximadamente 54 mil toneladas de resíduos são geradas por ano a partir da industrialização do suco de maracujá (LÓPEZ-VARGAS et al., 2013).

Diante do exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo isolar fungos filamentosos termófilos a partir de amostras de solo e de serapilheira de remanescentes de FOM, bem como avaliar seu potencial de produção de β-glicosidases empregando-se a casca de abacaxi, maracujá e de eucalipto como substratos. Objetivou-se, ainda, estabelecer os parâmetros ótimos de produção pela linhagem selecionada como melhor produtora, bem como caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Áreas de estudo

Neste estudo, três áreas representativas de FOM foram escolhidas para a realização das amostragens de solo e serapilheira, localizadas nas regiões Centro-Sul e Centro-Oeste do Estado do Paraná (Figura 1). A primeira área se refere à Fazenda Canarinho, localizada no município de Prudentópolis-PR (25º16’9.50”S 50º55’ 57.88”O); a segunda se encontra no Parque Natural Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR (25º21’5.90”S 51º28’3.83”O), enquanto que a terceira área está localizada no Parque Municipal São Francisco da Esperança, Guarapuava (25º3’51.43”S 51º17’43.87”O). Todas as áreas são remanescentes preservados de florestas nativas em condição clímax, com predomínio de Araucária, sendo também constituídas por diversas espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas.

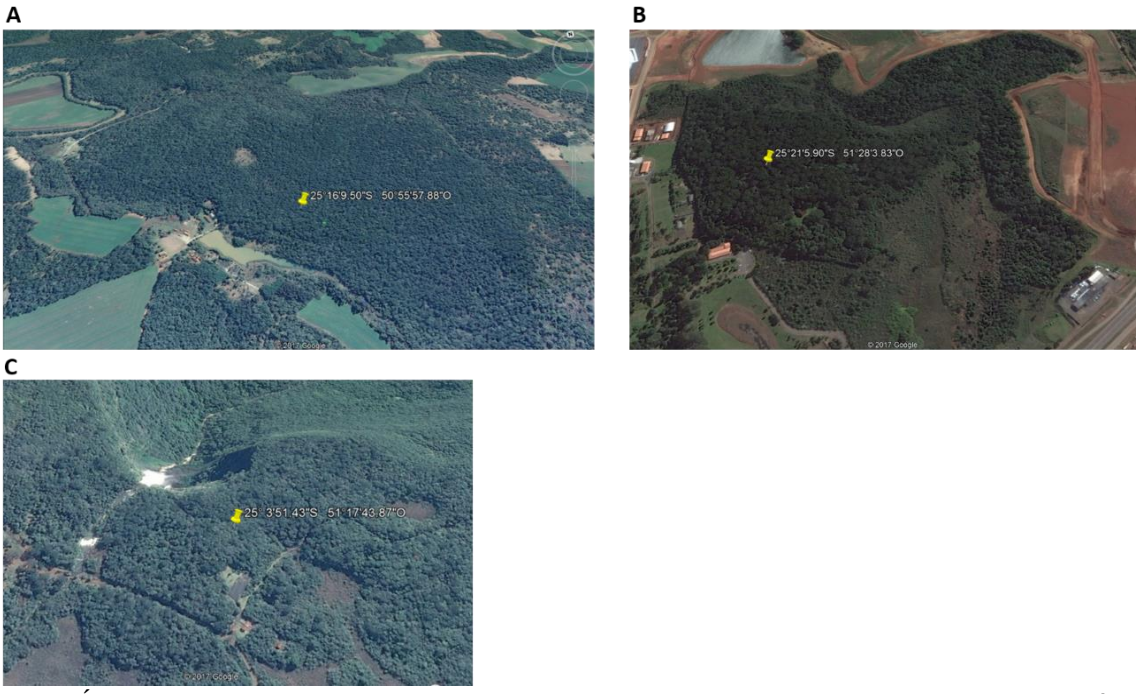


Figura 1 – Áreas de amostragem do presente estudo. Fragmentos de FOM da Fazenda Canarinho, Prudentópolis-PR (A), Parque Natural Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR (B), e Parque Municipal São Francisco da Esperança, Guarapuava-PR (C). Fonte: Google Earth.

2.1.1 Delineamento experimental

Em cada uma das áreas amostradas, uma parcela de 0,3 hectares foi demarcada, e desta parcela, um total de 10 árvores de *A. angustifolia* foram escolhidas ao acaso. As amostras de solo e serapilheira foram coletadas entre 1 e 2 m de distância do tronco de cada árvore.

2.1.2 Coleta e processamento das amostras

As coletas foram realizadas nos meses de julho, agosto e setembro de 2016, nas áreas A, B e C, respectivamente, por conta da maior deposição de matéria orgânica no solo, como esperado para o período (Figura 1). Em cada área, 30 amostras de solo e 30 amostras de serapilheira foram coletadas. Primeiramente, a distância de 1 a 2 m do tronco de cada árvore foi delimitada, sendo nesse raio amostrados três pontos de coleta, aleatórios. As amostras de solo e de serapilheira provenientes dos três pontos coletados em torno de cada árvore foram homogeneizadas, formando amostras compostas, totalizando 10 repetições em cada área. Em cada ponto amostrado, a serapilheira depositada sobre o solo foi coletada manualmente, enquanto que o solo foi coletado em uma profundidade de 0-20 cm, com o auxílio de um trado. As amostras foram depositadas em sacos plásticos e conservadas para o transporte até o Laboratório de Microbiologia Aplicada da UNICENTRO, em uma caixa de poliestireno expandido a 4 ºC, e posteriormente foram mantidas sob refrigeração.

2.2 Isolamento e manutenção das linhagens fúngicas em laboratório

Para o isolamento das linhagens fúngicas, a técnica de isolamento por diluições sucessivas foi empregada (CLARK, 1965). Inicialmente, 1 g de solo foi suspenso em 10 mL de água destilada estéril (diluição 10^{-1}). Desta diluição, 1 mL foi adicionado em 9 mL de água destilada esterilizada, obtendo-se uma diluição 10^{-2}. Este procedimento foi repetido para obter-se a diluição de 10^{-3}. Posteriormente, 0,1 mL de cada diluição foi semeado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e cloranfenicol (100 mg L^{-1}), com o auxílio de uma alça de Drigalski. Para o isolamento de fungos da serapilheira, 10 g de serapilheira foram triturados em 90 mL de água destilada esterilizada com o auxílio de um processador, sendo, a partir desta amostra, realizadas as diluições seriadas, conforme descrição acima.

As placas foram incubadas a 45 ºC e o crescimento fúngico foi acompanhado diariamente, sendo as colônias fúngicas sucessivamente transferidas para novas placas com ágar Sabouraud, a fim de se obter culturas puras. Os isolados foram preservados em meio sólido de Vogel, suplementado com glicose como fonte de carbono, na concentração de 1,5% (m/v). Repiques foram realizados periodicamente, sendo incubados a 45 ºC, por sete dias. Após esse período as linhagens foram armazenadas a 4 ºC, conforme o método proposto por Castellani (1967), ou utilizadas como fonte de esporos.

2.3 Bioprospecção de fungos produtores de β-glicosidases

Após as linhagens fúngicas serem cultivadas em meio sólido de Vogel, a 45 °C, por sete dias, os conídios foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo posteriormente filtrados em lã de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas, tendo suas concentrações ajustadas para 1,0 x 10^7 conídios mL^{-1} com o auxílio da Câmara de Neubauer. Um mililitro dessa suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido de Vogel, suplementado com 1% (m/v) de casca de abacaxi, casca de eucalipto ou casca de maracujá como fontes de carbono. As cascas foram lavadas com água destilada, secas em estufa a 60 °C, sendo posteriormente trituradas (35 mesch).

Após o crescimento em meio líquido por sete dias, em pH inicial de 6,5 e temperatura de 45 °C, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner para separação do micélio e do filtrado, sendo os filtrados obtidos de cada linhagem isolada utilizados como fonte de β-glicosidases extracelulares. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.4 Determinação da atividade β-glicosidásica

A determinação da atividade β-glicosidásica foi realizada com protocolo previamente definido (OLIVEIRA; GOMES; RODRIGUES, 2015). Para tal, de 0,3 mL de *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (PNPG) 5 mM em tampão McIlvaine pH 5,0 e 0,2 ml do filtrado enzimático apropriadamente diluído em tampão McIlvaine pH 5,0 foram incubados em banho-Maria, a 70 °C. Após 5 min de reação, esta foi paralisada pela adição de 2,0 ml de solução de Na_2CO_3 2 M. Posteriormente, a leitura em espectrofotômetro foi realizada a 410 nm, utilizando-se brancos apropriados. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de *p*-nitrofenol por mL, por minuto de reação, nas condições de ensaio. As determinações enzimáticas foram realizadas em triplicata.

2.5 Identificação molecular

A linhagem que exibiu a produção de maiores níveis de β-glicosidases foi posteriormente utilizada nas etapas de otimização da produção enzimática e identificada em nível de gênero e espécie por meio de métodos moleculares, utilizando a região nuclear ribossomal *Internal Transcribed Spacers* (ITS) (WHITE et al., 1990).

2.5.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído dos fungos usando o micélio cultivado sob fermentação submersa (GÓES-NETO; LOGUERCIO-LEITE; GUERREIRO, 2005). O micélio foi coletado por centrifugação (5000 rpm, por 10 minutos) e o pellet obtido foi utilizado para a extração do DNA empregando-se o método *Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) (DOYLE; DOYLE, 1987). Esta metodologia consiste nos passos de rompimento de paredes celulares, digestão de proteínas, precipitação do DNA, lavagem e secagem do DNA, eluição do DNA e degradação do RNA. A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,9%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz UV. A quantificação do DNA foi conduzida por meio da comparação com um padrão com quantidade de DNA conhecida do Fago λ.

5.1.2 Amplificação e sequenciamento do DNA

A amplificação foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o protocolo padrão da enzima Ex Taq DNA polimerase. A região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi amplificada, utilizando-se os *primers* ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990). Essa região foi

utilizada por ser a mais informativa para os fungos filamentosos termófilos (PAN et al., 2010, MORGENSTERN et al., 2012). A fim de confirmar a amplificação, parte da reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,8%. Após a PCR, a reação foi dividida em duas alíquotas. A primeira foi utilizada para visualização dos fragmentos em gel de agarose 1,8% e a segunda alíquota foi encaminhada para o sequenciamento, o qual foi realizado pela empresa ACTgene. As sequências dos produtos amplificados foram comparadas com outras sequências depositadas no Genebank GenBank NCBI database, usando a ferramenta BLAST (www.blast.ddbj.nig.ac.jp/).

2.6 Delineamento experimental para a produção de β-glicosidases

A Tabela 1 apresenta uma descrição das variáveis e seus respectivos níveis utilizados na etapa de otimização da produção de β-glicosidases pela linhagem previamente selecionada, a partir do emprego do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR). Os experimentos foram realizados por 2^3 fatorial: concentração do substrato [S], tempo de incubação (T) e pH do meio de cultivo foram as variáveis independentes consideradas. Cinco níveis foram utilizados para cada fator. Um total de 18 combinações de tratamentos, com quatro amostras no ponto central e seis nos pontos axiais foram elaboradas. Posteriormente, as respostas da atividade β-glicosidásica foram analisadas pelo Método de Superfície de Resposta (MSR).

Tabela 1: Condições experimentais para a otimização da produção de β-glicosidases, empregando-se o DCCR.

	Valores reais (codificados)		
Corrida	**Concentração da fonte (%)**	**Tempo de cultivo (dias)**	**pH de cultivo**
1	1.1 (-1)	4.4 (-1)	4.2 (-1)
2	2.9 (1)	4.4 (-1)	4.2 (-1)
3	1.1 (-1)	8.6 (1)	4.2 (-1)
4	2.9 (1)	8.6 (1)	4.2 (-1)
5	1.1 (-1)	4.4 (-1)	7.8 (1)
6	2.9 (1)	4.4 (-1)	7.8 (1)
7	1.1 (-1)	8.6 (1)	7.8 (1)
8	2.9 (1)	8.6 (1)	7.8 (1)
9	0.5 (-1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)
10	3.5 (1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)
11	2.0 (0)	3.0 (-1.68)	6.0 (0)
12	2.0 (0)	10.0 (1.68)	6.0 (0)
13	2.0 (0)	6.5 (0)	3.0 (-1.68)
14	2.0 (0)	6.5 (0)	9.0 (1.68)
15	2.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)
16	2.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)
17	2.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)
18	2.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)

2.7 Caracterização bioquímica das β-glicosidases produzidas

2.7.1 Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática

A fim de avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade β-glicosidásica, o filtrado enzimático foi incubado em presença do substrato em diferentes temperaturas, na faixa de 55 °C a 85 °C, em intervalos de 5 °C. A determinação do pH ótimo para a atividade da β-glicosidase foi verificada na melhor temperatura de atuação previamente estabelecida, utilizando-se tampão McIlvaine em distintos valores de pH, tanto no preparo do substrato quanto para completar o volume reacional. A faixa de pH avaliada foi entre o pH 3,0 e 8,0, com variação de 0,5 unidades.

2.7.2 Estabilidade enzimática em diferentes valores de temperatura e pH

A estabilidade térmica das β-glicosidases produzidas foi avaliada em valores de temperaturas de 60, 65, 70, 75 e 80 °C. Para tal, o filtrado foi incubado na ausência de substrato, por uma hora. A atividade residual foi determinada em pH e temperatura ótimos previamente estabelecidos.

A fim de verificar os valores de pH nos quais as β-glicosidases foram mais estáveis, o filtrado foi incubado a 4 °C em tampão McIlvaine, na proporção de 1:2 (v/v). A faixa de pH avaliada compreendeu os valores de 3,0 a 8,0, com intervalos de 0,5 unidades. A atividade residual foi determinada após 24 horas de incubação, sob condições ótimas previamente estabelecidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de linhagens fúngicas do solo e serapilheira

Oito isolados morfologicamente distintos de fungos termofílicos foram obtidos a partir das amostras de solo e serapilheira dos três remanescentes de FOM, os quais foram identificados como pertencentes a sete espécies diferentes. Na área A, foram obtidos um isolado de solo e um de serapilheira, na área B três isolados de solo, e na área C três isolados de solo (Tabela 2). A divergência no número de espécies isoladas entre o solo e serapilheira pode ser explicada pela composição distinta entre esses extratos (MCGUIRE et al., 2011).

Os resultados aqui obtidos corroboram com Morgenstern e colaboradores (2012), os quais afirmam que apenas em torno de 40 espécies de fungos termofílicos têm sido descritas, quando comparadas ao grande número de espécies fúngicas aceitas atualmente, o qual atinge aproximadamente 120.000 (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017).

No entanto, os métodos de cultura por si só não são suficientes para mensurar a comunidade microbiana, em função de sua complexidade e da padronização das condições de cultivo (TANG et al., 2004). Geralmente, existe uma grande dificuldade em adequar as condições laboratoriais em relação ao ambiente natural dos microrganismos e suas necessidades nutricionais, o que acaba limitando seu crescimento (LEE; LEE, 2013). Durante o primeiro e segundo dias de cultivo, observou-se apenas o surgimento de alguns isolados, os quais se espalhavam rapidamente pela superfície da placa, que podem ser denominados de estrategistas R, sopondo-se que estes inibiam o crescimento de outras linhagens que apresentavam crescimento mais lento, que podem ser chamados de estrategistas K. Em muitas placas, o crescimento fúngico não foi evidenciado, que pode ser justificado pela ausência de esporos, bem como sua rarefação pelas diluições empregadas.

Neste caso, a associação de métodos dependendes e independentes de cultivo talvez pudesse ampliar o número de espécies termofílicas isoladas a partir de remanescentes de FOM. No entanto, diante do baixo número de espécies fúngicas termófilas atualmente descritas, os resultados obtidos na presente investigação são bastante representativos.

Em trabalhos similares, Pan et al. (2010) isolaram 12 espécies de fungos termófilos de três sítios geotérmicos no Parque Nacional Tengchong Rehai, China. Lee et al. (2014) isolaram três espécies de fungos termófilos de uma fábrica de compostagem em Dangjin, Korea. Moretti et al. (2012) isolaram 5 espécies de fungos termófilos do solo de cinco cidades da região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. Córdova et al. (2003) isolaram três espécies de fungos termófilos do solo da região tropical do Estado de Guerrero, México.

3.2 Bioprospecção de fungos termófilos produtores de β-glicosidases

O potencial de produção de β-glicosidase dos isolados termófilos obtidos foi estabelecido, cultivando-os em presença de substratos ricos em celulose, como cascas de abacaxi, de maracujá, e de eucalipto. Os dados resumidos estão apresentados na Tabela 2.

Por meio da análise da Tabela 2, constata-se que a linhagem PQ7T não demonstrou potencial de produção da enzima de interesse, enquanto que para as demais linhagens investigadas, foi evidenciado. Nos ecossistemas florestais, os fungos termófilos são fundamentais no processo de decomposição da matéria orgânica (HEATON et al., 2012). Participam deste processo em conjunto com os microrganismos mesófilos, os quais, por meio de sua intensa atividade metabólica, promovem um rápido aumento de temperatura,

favorecendo a ascensão dos termofílicos ou termoresistentes. Uma vez que grande parte da fonte de carbono solúvel (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) inicialmente disponível tenha sido depletada pelos mesófilos, o substrato disponível para o crescimento de fungos termofílicos incluiria, principalmente, os polissacarídeos constituintes da biomassa, dos quais a celulose é o principal componente (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000).

Tabela 2. Produção de β-glicosidases por fungos termófilos isolados de FOM, em meio líquido suplementado com casca de maracujá, casca de abacaxi e casca de eucalipto, cultivados por 7 dias, em pH 5,0 a 45 ºC.

		Atividade β-glicosidásica (U/mL)		
Fungo	**Área**	**Casca de maraujá**	**Casca de abacaxi**	**Casca de eucalipto**
FDA9S	A	0,11 ± 0,000	1,43 ± 0,025	0,19 ± 0,01
FDA6T	A	4,55 ± 0,066	4,86 ± 0,094	0,33 ± 0,005
6J	B	5,68 ± 0,22	4,61 ± 0,16	0,19 ± 0,02
62J	B	10,53 ± 0,25	9,18 ± 0,15	0,34 ± 0,015
PQ7T	B	0,05 ± 0,007	0,07 ± 0,005	N.D
ST8T	C	1,27 ± 0,037	4,11 ± 0,39	0,25 ± 0,023
ST2T	C	0,64 ± 0,011	0,08 ± 0,004	0,09 ± 0,005
ST10T	C	0,03 ± 0,005	0,37 ± 0,01	N.D

*N.D: atividade β-glicosidásica não detectada

Desta forma, espera-se que os fungos termófilos sejam capazes de degragar este polissacarídeo. Entretanto, curiosamente, alguns fungos termofílicos são incapazes de utilizar a celulose, como algumas linhagens de *Thermomyces lanuginosus* (DAMASO; ANDRADE; PEREIRA JR., 2002; MENDOZA; CALIWARA; UNCIANO, 2006). No caso, espécies não celulolíticas podem crescer comensalmente, utilizando açúcares liberados por outros organismos (SINGH; PILLAY; ORIOR, 2000). Muitas vezes, espécies não celulolíticas podem prontamente hidrolisar o xilano, o qual está disposto externamente à celulose na parede celular vegetal, sendo uma fonte de carbono mais acessível (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000).

Ainda, os dados apresentados na Tabela 2 revelam que os maiores níveis de β-glicosidase foram produzidos pela linhagem 62J, quando crescida em casca de maracujá (10,53 U/mL) e casca de abacaxi (9,18 U/mL). Além disso, empregando-se estes mesmos substratos, níveis mais altos de β-glicosidases foram produzidos pelas linhagens 6J e FDA6T. De maneira geral, a casca de eucalipto fracamente induziu a produção de β-glicosidases pelos fungos termófilos avaliados, provavelmente pela sua composição.

A linhagem 62J foi posteriormente identificada por métodos moleculares como *T. crustaceus*. Ao contrário do observado por Ogundero (1979), a linhagem de *T. crustaceus* avaliada no presente estudo apresentou-se como produtora de altos níveis de celulases. De acordo com Darwin (1859), organismos de diferentes ambientes que tiveram oportunidades de experienciar diferentes condições inerentes ao nicho ocupado, podem apresentar inovações e divergências quanto às suas características.

Os níveis de produção de β-glicosidase por *T.* crustaceus obtidos em casca de maracujá e abacaxi revelam a facilidade desta espécie fúngica em degradar estes substratos. Segundo Subramaniyam e Vimala (2012), fontes energéticas com diferentes composições alteram o resultado da fermentação, onde as taxas desiguais de degradação dos nutrientes ocorrem em decorrência de suas composições, bem como pelas enzimas produzidas. Adicionalmente, fatores distintos estão envolvidos na capacidade de produção enzimática das espécies (GLASS et al., 2013), e além da resposta a estímulos ambientais, pela expressão de genes, a síntese enzimática está sujeita a mecanismos regulatórios, intrínsecos da espécie, passíveis de indução e repressão (COLEN; JUNQUEIRA; MORAIS-SANTOS, 2006). Por fim, ambientes de mata fornecem substratos de diferentes composições, contendo porcentagens variáveis de componentes lignocelulósicos (DIX; WEBSTER, 1995). Essa diversidade estrutural oferece às espécies fúngicas novos nichos para ocupar e desenvolver, bem como a oportunidade de ampliar seu arsenal enzimático, a partir da produção de novos grupos catalíticos.

3.3 Otimização da produção de β-glicosidases por *T. crustaceus*

Ao analisar individualmente o efeito de fatores sobre a produção de β-glicosidases por *T. crustaceus*, constatou-se que o tempo e o pH de cultivo, assim como a concentração do substrato exercem efeito significativo na obtenção destas enzimas. Por esta razão, estas variáveis foram consideradas no DCCR, o qual foi conduzido com o objetivo de estabelecer as condições ótimas para a produção de β-glicosidases, empregando-se a casca de maracujá como substrato.

Os valores reais e codificados e os resultados obtidos no planejamento experimental estão representados na Tabela 3, onde os tratamentos 1 a 18 fazem parte do delineamento experimental e a corrida 19 refere-se à validação do modelo.

A partir do modelo experimental destacado na Tabela 3, os valores codificados permitiram a simulação de dados da produção de β-glicosidases por *T. crustaceus*, por meio do emprego da MSR, como mostrado na Figura 2.

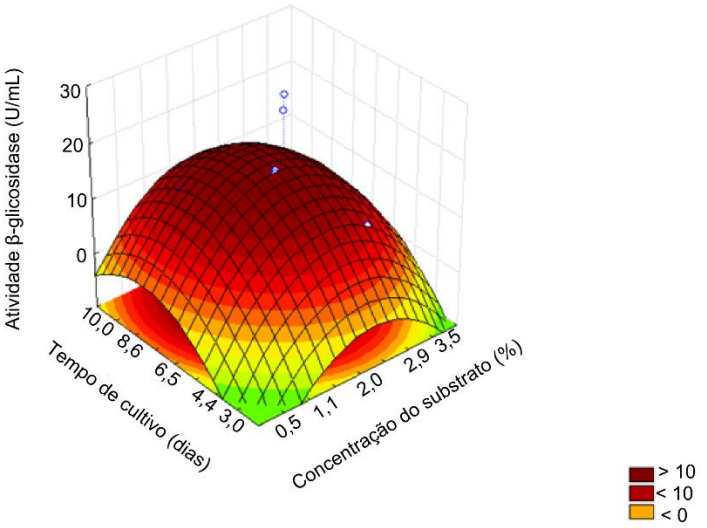
Verifica-se que uma maior concentração de substrato aliada a maiores tempos de cultivo (Figura 2A), e a valores mais altos de pH (Figura 2B), bem como valores de pH mais altos associados a tempos de cultivo maiores (Figura 2C), resultaram em níveis mais elevados de β-glicosidases. Esses resultados são refletidos nas condições estabelecidas como ótimas para a produção de β-glicosidases por *T. crustaceus*, as quais corresponderam a 2,9 % de casca de maracujá, pH 7,8 e tempo de cultivo de 8,6 dias, alcançando-se níveis de produção equivalente a 20,08 U/mL (corrida 8, Tabela 3).

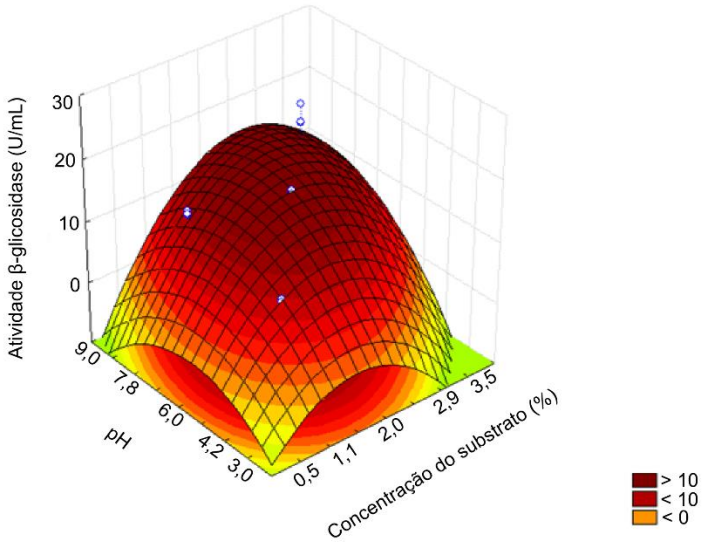
Tabela 3. Condições experimentais e otimização do processo da produção de β-glicosidases por *T. crustaceus* utilizando casca de maracuja, com variações na concentração de substrato, tempo de cultivo e pH do meio de reação. A validação do modelo é confirmada pela corrida 19*.

	Valores reais (codificados)			
Corrida	**Concentração da fonte (%)**	**Tempo de cultivo (dias)**	**pH de cultivo**	**Atividade β-glicosidásica (U/mL)**
1	1.1 (-1)	4.4 (-1)	4.2 (-1)	2,34 ± 0,12
2	2.9 (1)	4.4 (-1)	4.2 (-1)	2,64 ± 0,11
3	1.1 (-1)	8.6 (1)	4.2 (-1)	8,30 ± 0,54
4	2.9 (1)	8.6 (1)	4.2 (-1)	2,20 ± 0,12
5	1.1 (-1)	4.4 (-1)	7.8 (1)	1,97 ± 0,15
6	2.9 (1)	4.4 (-1)	7.8 (1)	7,57 ± 0,17
7	1.1 (-1)	8.6 (1)	7.8 (1)	15,51 ± 0,73
8	2.9 (1)	8.6 (1)	7.8 (1)	20,08 ± 1,72
9	0.5 (-1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)	2,32 ± 0,18
10	3.5 (1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)	5,01 ± 0,16
11	2.0 (0)	3.0 (-1.68)	6.0 (0)	1,51 ± 0,17
12	2.0 (0)	10.0 (1.68)	6.0 (0)	10,52 ± 0,63
13	2.0 (0)	6.5 (0)	3.0 (-1.68)	1,33 ± 0,21
14	2.0 (0)	6.5 (0)	9.0 (1.68)	12,95 ± 0,76
15	2.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)	15,35 ± 0,98
16	2.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)	14,23 ± 0,72
17	2.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)	16,40 ± 1,07
18	2.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)	15,69 ± 0,69
19*	2.9 (1)	8.6 (1)	7.8 (1)	18,03 ± 1,18

Uma concentração mais elevada de substrato (2.9%) favoreceu a produção de β-glicosidases por *T. crustaceus*. Nesse caso, sugere-se que uma disponibilidade mais elevada de nutrientes favoreceu a produção enzimática. Já para o termófilo *Talaromyces thermophilus*, o emprego do farelo de trigo a 2,0% resultou na obtenção dos maiores níveis de β-glicosidases (MALLEK-FAKHFAKH et al., 2017). Usualmente, com o aumento da quantidade de substrato, a produção enzimática é proporcionalmente favorecida até que o ponto de saturação do meio de cultura seja alcançado. A partir deste ponto, a adição extra de

substrato deixa de influenciar significativamente os níveis de enzimas obtidos, uma vez que a viscosidade do meio interfere na mistura dos componentes e na transferência de oxigênio (GUPTA et al., 2009; AMIN et al., 2013).





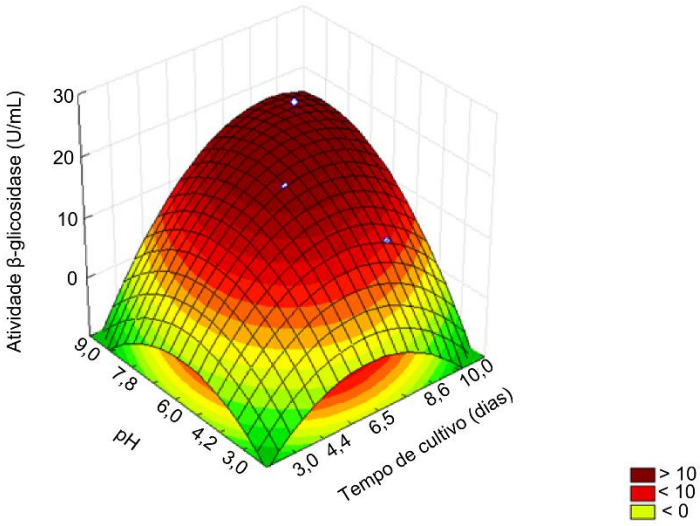


Figura 2. Superfície de resposta para produção de β-glicosidases por *T. crustaceus* cultivado em casca de maracujá. Interação de parâmetros: Tempo de cultivo e concentração de substrato (A), pH e concentração do substrato (B) e pH e tempo de cultivo (C). As diferentes condições experimentais estão resumidas na Tabela 3.

Em relação ao tempo de crescimento, nota-se que os maiores níveis de atividade β-glicosidásica foram obtidos após 8,6 dias de crescimento e que, a partir deste, uma queda na produtividade enzimática foi constatada. Usualmente, após um período de incubação prolongado, a depleção de nutrientes no meio e a excreção de subprodutos resultantes do metabolismo dos microrganismos empregados no processo fermentativo resultam na diminuição dos níveis enzimáticos produzidos (SHAFIQUE; BAJWA; SHAFIQUE, 2009). Tais subprodutos incluem proteases e substâncias que alteram o pH e que diminuem a disponibilidade de água, interferindo com a síntese proteica e, consequentemente, com a atividade enzimática (HAQ; JAVED; KHAN, 2006). Sugere-se, no presente estudo, que a liberação de β-glicosidases intracelulares tenha ocorrido ao longo do tempo devido à morte celular fúngica, que em adição às extracelulares, resultaram na detecção de níveis enzimáticos mais elevados no extrato bruto em torno de 8,6 dias de crescimento. Ainda, como mencionado anteriormente, sugere-se que o declínio na produção enzimática observado após este período possa estar relacionado ao consumo de um componente essencial ou à produção de inibidores.

Resultados similares foram reportados por da SILVA et al. (2016), quando o fungo termófilo *Myceliophthora heterothallica* atingiu sua máxima produção de β-glicosidases após 8 dias de crescimento. Contrariamente, os fungos termófilos *T. aurantiacus* e *Thermomucor indicae-seudaticae* exibiram máxima produção enzimática após 46-72 e 96 horas de crescimento, respectivamente (LEITE et al., 2008; de CASSIA PEREIRA et al., 2015).

O pH do meio é um dos fatores chaves que afetam o processo fermentativo, influenciando o crescimento microbiano e a atividade enzimática. Este influencia diretamente o transporte de componentes através da membrana celular, afetando diretamente o crescimento microbiano e a formação de produtos (ELLAIAH; SRINIVASULO; ADINARAYANA, 2002; PRAKASHAM; RAO; SARMA, 2006). Na presente investigação, maiores níveis de β-glicosidases foram observados quando o pH do meio de cultivo foi inicialmente ajustado para 7,8. Nos estudos de Mallek-Fakhfakh et al. (2016), o pH inicial do meio 7,0 foi estabelecido como ótimo para a produção de β-glicosidases pelo termófilo *T. thermophilus*, usando o farelo de trigo como fonte de carbono. Contrariamente, o termófilo *T. indicae-seudaticae* teve sua produção de β-glicosidases no farelo de soja favorecida quando o valor do pH inicial do meio correspondeu a 6,0 (de CASSIA-PEREIRA et al., 2015).

Na presente investigação, elevados níveis de β-glicosidases foram obtidos empregando-se a casca de maracujá como substrato. Apenas o trabalho de Almeida et al. (2015) previamente reportou a utilização deste substrato para a obtenção de β-glicosidases por uma linhagem mesofílica de *Penicillium verruculosum*. No entanto, os níveis de produção obtidos após a otimização foram inferiores (8,54 U/mL) aos alcançados no presente estudo (20,05 U/mL), sendo o dobro do valor inicialmente observado. Silva et al. (2016) obtiveram menores níveis de produção β-glicosidásica, utilizando o bagaço de cana (1,09 U/mL) e o papelão (0,36 U/mL) como substratos, por uma linhagem termofilica de *Myceliophthora heterothallica*. Cassia Pereira et al. (2015) avaliaram a produção de β-glicosidases por uma linhagem termofílica de *Thermomucor indicae-seudaticae*, obtendo uma produção correspondente a 4,18 U/mL, ao utilizar uma mistura de farelo de soja e casca de arroz como fonte de carbono.

Devido à sua ampla disponibilidade e baixo custo, diversas vantagens são esperadas por meio do emprego da casca de maracujá em bioprocessos, como a redução de sua deposição na natureza, bem como a possibilidade de agregar valor a este resíduo. Em adição, os processos de produção enzimáticos podem ser beneficiados, por meio da redução de seus custos. Segundo Chen et al. (2010), um dos principais fatores que limita a aplicação de enzimas celulolíticas em processos industriais é o elevado custo de produção, sendo necessário o desenvolvimento de sistemas mais eficientes e economicamente mais competitivos.

Os dados da análise de variância (ANOVA) estão resumidos na Tabela 4. A significância estatística foi verificada pelo teste *F*, onde o modelo mostrou-se significativo. O coeficiente de regressão que indica a importância das variáveis é simbolizado pelo *p*-valor. Se o valor de p for menor que seu nível de significância, o efeito é estatisticamente significativo. Pode-se também observar que o modelo se mostrou preditivo, pois o valor de *F* calculado foi maior que *F* tabelado (50,39 vezes). Ainda, o coeficiente de determinação R^2 indicou que 94,08% da variabilidade dos dados pode ser explicada pelo modelo. A análise estatística dos dados forneceu estimativas dos efeitos que cada fator exerceu sobre a produção enzimática. Compreender como os processos ocorrem, e como a interação de um conjunto de fatores operam de modo dinâmico, nos fornecem mais informações para entender os padrões biológicos (FALLER; KLINGMÜLLER; TIMMER, 2003).

Ainda, os resultados da ANOVA (Tabela 4) mostram que os termos lineares e quadráticos de todas as variáveis investigadas exerceram influência significativa sobre a

produção de β-glicosidases por *T. crustaceus*. Em adição, as interações entre a concentração do substrato e pH de cultivo, bem como o tempo de cultivo e pH, influenciaram significativamente a produção de β-glicosidases. O fato destas interações entre os fatores terem sido signficativas evidencia que o efeito de cada fator é influenciado pelo nível das outras variáveis estudadas.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA). Determinação da significância estatística pelo teste de Fischer (*F*), coeficientes de regressão (*p*-valor), e de determinação (R^2), para β-glicosidases produzidas por *T. crustaceus* cultivado em casca de maracujá.

Produção de β-glicosidases							
Termos	**SQ**	**Gl**	**MQ**	***F***	***F tab***	***F*/*F*tab**	**R^2**
M	2020,71	9	224,52	89,20	1,777	50,39	0,9408
R	110,74	44	2,51				
T	2131,45	53					

Termos	**Coeficientes**	***p*-valor**
Média/Intercepto	15,2910	**0,000000**
[S]	1,2969	**0,012171**
$[S]^2$	-7,2007	**0,000137**
Tempo	6,8406	**0,000000**
$Tempo^2$	-5,5389	**0,000000**
pH	7,2103	**0,000000**
pH^2	-4,7394	**0,000000**
[S] x Tempo	-1,8633	**0,006171**
[S] x pH	3,9833	**0,007993**
Tempo x pH	5,1350	**0,003126**

M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: grau de liberdade; *F: F* calculado; *F* tab: *F* tabelado 10%; [S]: concentração do substrato; T: tempo; pH: potencial hidrogeniônico. Os valores em negrito são estatisticamente significativos ($p<0,05$).

O modelo matemático que representa a atividade β-glicosidásica, levando-se em consideração somente os termos significativos está representado pela equação abaixo:

$$\beta gli = 15{,}311 + 1{,}756S - 7{,}390S^2 + 6{,}383T - 5{,}738T^2 + 6{,}716pH - 4{,}902pH^2 + 4{,}775SpH + 4{,}318TpH$$

Onde: S é a concentração do substrato, T é o Tempo, e pH o potencial hidrogeniônico.

3.4 Caracterização física e química das β-glicosidases produzidas por *T. crustaceus*

3.4.1 Efeito do pH e da temperatura

As β-glicosidases de *T. crustaceus* foram caracterizadas bioquimicamente, avaliando-se seu pH e temperatura ótimos de atuação, bem como sua resistência térmica e estabilidade frente a distintos valores de pH. Este tipo de análise é fundamental para verificar o potencial de aplicabilidade industrial das enzimas produzidas.

Por meio da análise da Figura 3, observa-se que as β-glicosidases exibiram atividade ótima a 70 ºC e em pH 5,0. O aumento na atividade catalítica da enzima até o seu ponto ótimo está relacionado com a alta energia cinética, condicionado pelo aumento da temperatura, a qual prova maior colisão entre as moléculas de enzima e substrato (KUSUMA; REDDY, 2014). Em contrapartida, a redução da atividade observada após o ponto ótimo, pode ser explicada pela alteração da conformação estrutural da enzima, resultando em sua desnaturação (REHMAN et al., 2015).

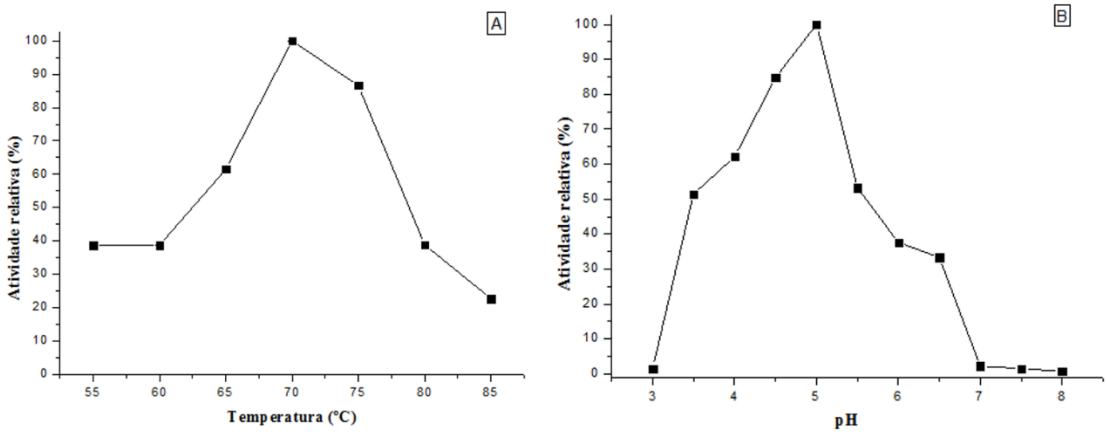


Figura 3. Influência da temperatura (A) e do pH (B) sobre a atividade relativa das β-gicosidases produzidas por *T. crustaceus*, a partir da carca de maracujá, na concentração de 2,9%, após 8,6 dias em fermentação submersa em pH inical de 7,8.

Ressalta-se aqui a importância de avaliar a influência do potencial hidrogeniônico do meio líquido de reação. No caso das β-glicosidades de *T. crustaceus*, em valores de pH acima do estabelecido como ótimo houve uma acentuada redução na atividade enzimática, provavelmente em decorrência da mudança na carga dos aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima, influenciando sua habilidade catalítica.

Similarmente, as β-glicosidases produzidas por *M. heterothallica* apresentaram atividade ótima a 70 ºC e pH 5,0 (SILVA et al., 2016). As produzidas por *T. indicae-seudaticae* a 75 ºC e pH 4,5 (de CASSIA PEREIRA et al., 2015); e aquelas provenientes de uma linhagem termofílica de *Thermomyces lanuginosus* exibiram atividade ótima a 65 ºC e pH 6,0 (LIN; PILLAY; SINGH, 1999). Uma linhagem termofílica de *Myceliophthora thermophila* produziu β-glicosidases mais ativas a 60 ºC (BONFÁ et al., 2018). De acordo com Sorensen et al. (2013), na maioria dos casos, β-glicosidases fúngicas apresentam atividade ótima entre os valores de pH 4,0 e 5,0.

3.4.2. Estabilidade das β-glicosidases produzidas frente à temperatura e ao pH

Quanto à estabilidade térmica das β-glicosidases produzidas (Tabela 5), observa-se que estas enzimas apresentaram boa estabilidade a 60 °C e 65 °C, constatando-se após uma hora de incubação 53,88% e 44,14% de sua atividade residual, respectivamente. Nota-se, ainda, que acima de sua temperatura ótima de atuação (70 °C), os valores de atividade residual foram drasticamente reduzidos.

Tabela 5. Termoestabilidade das β-glicosidases produzidas por *T. crustaceus*, após 30 e 60 minutos de incubação.

	Atividade β-glicosidásica residual (%)	
Temperatura (ºC)	**Tempo (30 min.)**	**Tempo (60 min.)**
60	61,55	53,88
65	54,98	44,14
70	25,30	20,92
75	1,97	1,09
80	0,98	0,54

As β-glicosidases produzidas por *T. crustaceus* foram termicamente mais estáveis que as produzidas por *M. heterothallica*, as quais retiveram menos de 30% de sua atividade residual após uma hora de incubação a 65 ºC (SILVA et al., 2016). Em adição, foram mais termoestáveis que aquelas produzidas por *T. lanuginosus*, as quais exibiram uma atividade residual de 60% a 60 ºC e 28% a 65 ºC, após 30 min de incubação (LIN; PILLAY; SINGH, 1999). Contrariamente, as β-glicosidases produzidas por *T. indicae-seudaticae* apresentaram uma maior termoestabilidade. A atividade residual a 70 ºC após uma hora de incubação correspondeu a 70% (de CASSIA PEREIRA et al., 2015).

Quanto à estabilidade das β-glicosidases produzidas frente a diferentes valores de pH (Figura 4), constata-se que houve uma diminuição mais pronunciada na atividade residual, comparada à análise de estabilidade térmica (Tabela 5). No caso, as β-glicosidases de *T. crustaceus* exibiram menos de 65% de sua atividade residual em toda faixa de pH avaliada (3,0 a 8,0). Um componente que talvez corroborado para a esta baixa estabilidade tenha sido a solução tampão McIlvaine, utilizada para agir no tamponamento da reação, que apresenta citrato em sua composição, o qual é um quelante de ions. Neste caso, o citrato poderia estar removendo um ion importante como co-fator para a β-glicosidase (KNOB; CARMONA, 2012).

Diferentes espécies e até mesmo linhagens de uma mesma espécie podem apresentar variações na estabilidade frente a diferentes valores de pH. Contrariamente aos dados obtidos no presente trabalho, Silva et al. (2016) observaram que β-glicosidases produzidas por *M.*

heterothallica mantiveram sua atividade residual entre 70 a 95% em uma faixa de pH de 3,0 a 9,0. Para uma linhagem de *T. indicae-seudaticae*, as β-glicosidases apresentaram atividade residual em torno de 90% entre valores de pH de 4,5 a 9,5 (de CASSIA PEREIRA et al., 2015); e uma para uma linhagem de *T. lanuginosus* a atividade residual das β-glicosidases manteve-se acima de 95% entre os valores de pH de 5,0 a 12,0 (LIN; PILLAY; SINGH, 1999). Uma vez que a estrutura formadora de uma molécula proteica catalisadora sofre influências do meio em que está atuando, seu potencial de transformação do substrato também é afetado, resultando em menores rendimentos de produtos.

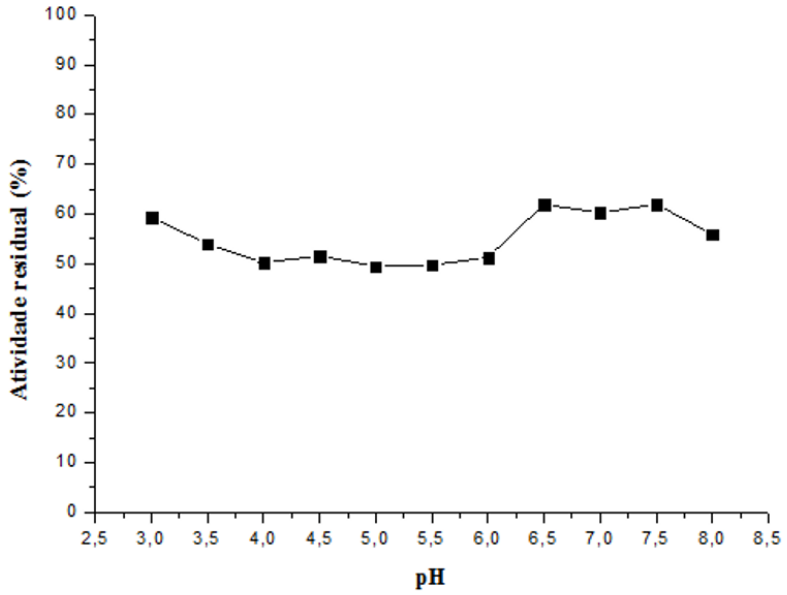


Figura 4. Estabilidade das β-glicosidases produzidas por *T. crustaceus* a partir da casca de maracujá na concentração de 2,9%, sob fermentação submersa conduzida por 8,6 dias em pH inicial de 7,8, frente a diferentes valores de pH

A importância de verificar a estabilidade enzimática está relacionada com o seu potencial de aplicação biotecnológica. A termoestabilidade e a estabilidade frente a diferentes valores de pH nos fornecem informações relevantes quanto às características moleculares das enzimas (SOUZA et al., 2010).

4. CONCLUSÃO

A partir de amostras de solo e de serapilheira de FOM, foi possível obter o isolamento de um número representativo de espécies de fungos filamentosos termofílicos. Dentre as linhagens obtidas, a molecularmente caracterizada como *T. crustaceus* exibiu maior potencial de produção de β-glicosidases, empregando-se a casca de maracujá como substrato.

Ferramentas estatísticas posteriormente empregadas permitiram, com eficiência, elevar os níveis enzimáticos produzidos. As enzimas obtidas exibiram propriedades interessantes, como atuação a 70 °C e boa estabilidade térmica, as quais as tornam interessantes para a aplicação em bioprocessos conduzidos sob temperaturas elevadas, como a sacarificação da biomassa lignocelulósica.

A utilização da casca de maracujá no processo de produção de β-glicosidases mostra-se bastante promissora, no sentido de prover um destino ambientalmente mais correto a este subproduto e de agregar valor a esta matéria-prima, de baixo custo e amplamente disponível no país, além de diminuir o custo de produção da enzima.

Por fim, ressalta-se a importância da condução de estudos de bioprospecção em ambientes criticamente ameaçados como a FOM, não somente pela oportunidade de se obter novas linhagens microbianas de interesse biotecnológico, como também para ilustrar a importância de promover a conservação dessas regiões, uma vez que constituem importantes fontes de recursos genéticos e bioquímicos até então pouco exploradas.

5. REFERÊNCIAS

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for celulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 844-856, 2012.

AHMED, A. et al. Microbial β-glucosidase: sources, production and applications. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 5, p. 31-46, 2017.

ALMEIDA, J. M. et al. Passion fruit peel as novel substrate for enhanced β-glucosidases production by *Penicillium verruculosum*: Potential of the crude extract for biomass hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 216-226, 2015.

ALMEIDA, J.M. et al. Effective and low-cost saccharification of pinepple peel by *Trichoderma viride* crude extract with enhanced β-glucosidase activity. **BioEnergy Research**, v.9, p. 701-710, 2016.

ALVAREZ, E.; CASTILLO, A.; ITURRIETA, I. Fungal peritonits by *Thermoascus crustaceus* in a peritoneal dialysis patient from Chile. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2017.

AMIN, F. et al. Utilization of wheat bran for enhanced production of exopolygalacturonase by *Penicillium notatum* using response surface methodology. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 50, n. 3, p. 469-477, 2013.

APINIS, A. E.; CHESTERS, C. G. C. Ascomycetes of some salt marshers and sand dunes. **Transactions of The British Mycological Society**, v. 47, p. 419-435, 1964.

AZEVEDO, E. et al. Biodiversity of filamentous fungi on soils and sands In: Rai,M.; Kövics, G. (Eds.). **Progress in Mycology**. New Pali, India: Scientific Publishers, p. 233-257, 2010.

BADHAN, A.K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504–510, 2007.

BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Research**, v. 3, p 82-92, 2010.

BEITEL, S. M.; KNOB, A. *Penicillium miczynskii* β-glucosidase: A Glucose-Tolerant Enzyme Produced Using Pineapple Peel as Substrate. **Industrial Biotechnology**, v. 9, p. 293-300, 2013.

BERKA, R. M. et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922-927, 2011.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.

BHATTACHARYA, A. S.; BHATTACHARYA, A.; PLETSCHKE, B. I. Synergism of fungal bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production. **Biotechnology Letters**, p. 13, 2015.

BISARIA, V. S.; MISHRA, S. Regulatory aspects of celulase biosysthesis and secretion, **Critical reviews in biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 61-103, 1989.

BODENMANN, J.; HEINIGER, U.; HOHL, H. R. Extracellular enzymes of *Phytophthora infestans*: endo-cellulases, β-glucosidases, and 1,3-β-glucanases. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 75-82, 1985.

BONFÁ, E. C. et al. Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7. **Biocatalysis and Agricultural Technology**, v. 13, p. 311-318, 2018.

BROCARDO, C. R.; CÂNDIDO-JUNIOR, J. F. Persistência de mamíferos de médio e grande porte em fragmentos de Floresta Ombrófila Mista no estado do Paraná, Brasil. **Revista Árvore**, v. 36, n. 2, p. 301-310, 2012.

BRZOBOHATY, B. et al. Release of active cytokinin by a β-glucosidase localized to the maize root meristem. **Science**, v. 262, n. 5136, p. 1051-1054, 1993.

BULL, A. T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.BUSCHINI, M. L. T.; DONATTI, A. J. Nesting behavior of *Trypoxylon* (Trypargilum) *agamemnom* Richards (Hymenoptera: Crabronidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 353-362, 2012.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: General aspects and analysis of the physicochemical characteristics os substrates for agro-industrial wastes valorization**. Waste and Biomass Valorization**, v.6, p. 1085-1093, 2015.

CAVASINI, R. et al. Comparison of drosophilidae (Díptera) assemblages from two highland araucaria forest fragments, with and without environmental conservation policies. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 761-768, 2014.

CELESTINO, J. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v.49, p. 569–575, 2014.

CHANDRA, M. et al. Biochemical and proteomic characterization of a novel extracellular β-glucosidase from *Trichoderma citrinoviride*. **Molecular Biotechnology**, v. 53, p. 289-299, 2013.

CHAYNIKA, P., SRIVIDYA, S. Bioprospecting of Lovastatin Producing Fungi Isolated from Soil Samples. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 3(9), p. 42-46, 2014.

CHEN, M. et al. Isolation and characterization of a β-glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 444–449, 2010.

CLARK, F. E.; Agar-plate method for total microbial count. In: BLACK, C.A.;EVANS, D.; WHITE, J. L.; ENSMINGER, L. E.; CLARK, F. E.; DINAUER R. C. (Eds.). **Methods of soil analysis**. Part 2. Chemical and microbiological properties. New York: Madson Inc., p. 1460-1466, 1965.

COELHO, E. M.; AZÊVEDO, L. C.; UMSZA-GUEZ, M. A. Fruto do maracujá: importância econômica e industrial, produção, subprodutos e prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, v. 9, n. 3, p. 347-361, 2016.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 881–885, 2006.

COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian atlantic forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 697-708, 2010.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi: an account of their biology, activities and classification.** W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1964.

CÓRDOVA, J. et al. Identification of mecixan thermophilic and thermotolerant fungal isolates. **Micologia Aplicada International**, v. 15, n. 2, p. 37-44, 2003.

COSTA, L. A.; GUSMÃO, L. F. P. Characterization saprobic fungi on leaf litter of two species of tree in the Atlantic forest, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1027-1035, 2015.

CRAWFORD, R. L. Microbial diversity and its relationship to planetary protection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 4163-4168, 2005.

DARWIN, C. **On the origin of species**. London, 1859, 502 p.

da SILVA, V. C. T. et al. Effect of pH, temperature, and chemicals on the endoglucanases and *β*-glucosidases from the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. obtained by solid-state and submerged cultivation. **Biochemistry Research International**, v. 2016, Article ID 9781216, 2016.

de CASSIA PERERIA, J. et al. Production and characterization of b-glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 2, p. 723-732, 2015.

DAMASO, M. C.T., ANDRADE, C. M.C., PEREIRA JR., N. Production and properties of cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* 10C-4145. **Brazil Journal of Microbiology**, v. 33, p. 4-13, 2002.

DESHPANDE, V.; ERIKSSON, K. E.; PETTERSSON, B. Production, purification and partial characterization of 1,4-β-glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 191-198, 1978.

DIX, N.J., WEBSTER J., **Fungal ecology**. London: Chapman & Hall, 1995, 549 p.

EASEN, A. β-glucosidases. Biochemistry and molecular biology. **American Chemical Society**, Washington, DC, USA, 1993.

ELLAIAH, P.; SRINIVASULO, B.; ADINARAYANA, K. A review on microbial alcaline proteases. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 61, p. 690-704, 2002.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul, EDUCS, 2010.

FARINAS, C. S. A Parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos: **Embrapa Instrumentação**, 2011.

FALLER, D.; KLINGMÜLLER, U.; TIMMER, J. Simulation methods for optimal experimental design in systems biology. **Simulation**, v. 79, n. 12, p. 717-725, 2003.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá – aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

FERREIRA, M. F. P.; PENA, R. S. Estudo da secagem da casca do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 15-28, 2010.

FLEMING, L. W.; DUERKSEN, J. D. Purification and characterization of yeast beta-glucosidases. **Journal of Bacteriology**, v. 93, n. 1, p. 135-141, 1967.

FORTKAMP, D.; KNOB, A. High xylanase production by *Trichoderma viride* using pineapple as substrate and its apllication in pulp biobleaching. **African Jornal of Biotechnology**, v. 13, n. 22, p. 2248-2259, 2014.

FRAGA, M. E. et al. Interação micro-organismos, solo e flora como condutores da diversidade na Mata Atlântica. **Acta Botânica Brasilica,** v. 26, n. 4, p. 857-86, 2012.

FROCK, A. D.; KELLY, R. M. Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis. **Chemical Engeneering**, v. 1, p. 363-372, 2012.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2014- 2015. Relatório Nacional – São Paulo, 2016.

FUPEF – Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná. Conservação do Bioma Floresta com Araucária: relatório final. **Diagnóstico dos remanescentes florestais/PROBIO Araucária.** Curitiba, v. 2, p. 236, 2001.

GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophlilic fungal *Aspergillus Terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623- 7629, 2008.

GERMANO, S. et al. Characterization and stability of protease from Penicillium sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.

GHORAI, S. et al. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v. 42, p. 577-587, 2009.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 339-354, 2004.

GLASS, N. L. et al. Plant cell wall deconstruction by Ascomycete fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 477-498, 2013.

GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GUERREIRO, R. T. DNA extraction from frozen field-collected and denydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. **Biotemas**, v. 18, p. 19-32, 2005.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOSWAMI, G.K.; PATHAK, R.R. Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 237-246, 2013.

GUNASEKARAN S, POORNIAMMAL R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p. 1894-1898, 2008.

GUPTA, V. K. et al. Optimization of xylanase production from free and immobilized cells of *Fusarium Solani* F7. **BioResources**, v. 4, n. 3, p. 932-945, 2009

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HAN, Y. W.; SRINIVISAN, V. R. Purification and characterization of beta-glucosidase of *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 100, n. 3, p. 1355-1363, 1969.

HAQ, I., JAVED, M. M.; KHAN, T. S. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 609-614, 2006.

HAWSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycology Research,** v. 105, n. 12, p. 1422–1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.

HEATON, L. et al. Analysis of fungal networks. **Fungal Biological Reviews**, v. 26, p. 12-29, 2012.

HENDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, v. 5, p. 245-249, 1998.

JAIN, K. K. et al. Production of thermostable hydrolases (cellulases and xylanase) from *Thermoascus aurantiacus* RCKK: a potencial fungus. **Bioprocess Biosystems Engineering**, p. 10, 2014.

JARAMILLO, P. M. D. et al. The characterization of a pectin-degrading enzyme from *Arpergillus oryzae* grown on passion fruit peel as the carbon source and the evaluation of its potential for industrial applications. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-13, 2016.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1-5, 2000.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro wastes. **Asian Journal of Biotechnology**, p. 10, 2010.

KAWAMORI, M.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA, S. Production of cellulases by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* A-131. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 647-654, 1987.

KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, v. 12, n. 12, p. 17-44, 1960.

KNOB, A. et al. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **Bioresources**, v. 9, p. 5738-5773, 2014.

KNOB, A; CARMONA, E. C. Purification and properties of an acid β-xylosidase from *Penicillium sclerotiorum*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, 501-508, 2012.

KUHAD, R, C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, p. 10, 2011.

KULKARNI, P.; GUPTA, N. Screening and evaluation of soilfungal isolates for xylanase production. **Recent Research in Science and Technology**, v. 5, p. 33-36, 2013.

KUMAR, D.; MURTHY, G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 63, p. 3-20, 2013.

KUSUMA, M.P.; REDDY, D. S. R. Purification and Characterization of Polygalacturonase using Isolated *Bacillus subtilis* C4. **Research Journal of Microbiology**, v. 9, p. 95-103, 2014.

LANGE, L. The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. **IMA Fungus**, v. 5, n. 2, p. 463-471, 2014.

LEE, H. et al. Isolation and analysis of the enzymatic properties of thermophilic fungi from compost. **Mycobiology**, v. 42, p. 181-184, 2014.

LEE, M. W.; LEE, S. W. Bioprospecting Potential of the Soil Metagenome: Novel Enzymes and Bioactivities. **Genomics & Informatics**, v. 11, n. 3, 2013.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude β-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391–395, 2008.

LI, D.; LI, A.; PAPAGEORGIOU, A. C. Cellulases from thermophilic fungi: Recent insights and biotechnological potential. **Enzyme Research**, 2011.

LIEPMAN, H. A. et al. *Arabidopsis* – A powerful model system for plant cell wall research. **The Plant Journal**, v. 61, p. 1107–1121, 2010.

LIN, J.; PILLAY, B.; SINGH, S. Purification and biochemical characteristics of β-D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 30, n. 1, p, 81-87, 1999.

LÓPEZ-VARGAS, J. H. et al. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, p. 756-763, 2013.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 2ª ed. José Olympio, Rio de Janeiro, 1981.

MADHU, K.M.; BEENA, P.S.; CHANDRASEKARAN, M. Extracellular β-glucosidase production by a marine *Aspergillus Sydowii* BTMFS 55 under solid state fermentation using statistical experimental design. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 4, p. 457-466, 2009.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MALLEK-FAKHFAKH, H. et al. Agricultural wastes as substrates for β-glucosidase production by *Talaromyces thermophilus*: Role of these enzymes in enhancing waste paper saccharification. Preparative Biochemistry and Biotechnology, v. 47, n. 4, 2017.

MARTINS, D. A. B. et al. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. In: KUMAR, S. **Integrated Waste Management – Volume II**. InTech, p. 319-360, 2011.

MCGUIRE, K. L. et al. Fungal community composition in neotropical rain forests: the influence of tree diversity and precipitation. **Microbial Ecology**, 2011.

MENDOZA, N. S.; CALIWARA, M. T. E.; UNCIANO, N. M. A local isolate of non-cellulolytic, xylanolytic, and Pectinolytic thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* Cla. **Philippine Journal of Science**, v. 135, n. 2, p. 113-119, 2006.

MIRANDA, J. M. D.; ZAGO, L. Assembleia de morcegos em remanescente de floresta ombrófila mista no planalto de Guarapuava, Paraná, Brasil. **Mastozoología Neotropical**, v. 22, n. 1, 2015.

MISHRA, S. K.; SANGWAN, N. S.; SANGWAN, R. S. Physico-kinetic and functional features of a novel β-glucosidase isolated from milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn.) flower petals. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 2014.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-state fermentation bioreactors**.** **Fundamentals of Design and Operation**, Springer, 2006.

MOORE J.C. et al. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. **Ecology Letters**, v. 7, p. 584-600, 2004.

MORGENSTERN, I. et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**, v. 2, n. 6, p. 489-502, 2012.

MORAÏS, S. et al. Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes. **MBio**, v. 3, n. 6, 2012.

MORETTI, M. M. S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1062-1071, 2012.

MOUCHACCA, J. Thermophilic fungi: Biodiversity and taxonomic status. **Cryptogamie Mycologie**, v. 18, 19-69, 1997.

MURRAY, P. et al. Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 β-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. **Protein Expression and Purification**¸v. 38, n. 2, p. 248-257, 2004.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NASCIMENTO-FILHO, W. B.; FRANCO, C.R. Avaliação do potencial dos resíduos produzidos através do processamento agroindustrial no brasil. **Rev. Virtual Quimica**, v. 7, n. 6, p. 1968-1987, 2015.

NASCIMENTO, T. A.; CALADO, V.; CARVALHO, C. W. P. Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. **Food Research International**, V. 49, p. 588–595, 2012.

OGUNDERO, V. W. Amylase and celulase activities of thermophilic fungi causing deterioration of tabacco products in Nigeria. **Mycopathologia**, v. 69, n. 3, p. 131-135, 1979.

OGUNDERO, V. W. Lipase activities of thermophilic fungi from mouldy groundnuts in Nigeria. **Mycologia**, v. 72, n. 1, p. 118-126, 1980.

OKASI, F.; PÉLLICO NETTO, S.; Flutuação da população de fungos sob Floresta Ombrófila Mista e em povoamento de *Pinus taeda*. **Revista Floresta**, v.42, n.4, p. 795-808, 2012.

OLIVEIRA, T. B.; GOMES, E.; RODRIGUES, A. Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy. **Extremophiles**, v. 19, p. 31-37, 2015.

ORGIAZZI, A. et al. A knowledge-based approach to estimating the magnitude and spatial patterns of potential threats to soil biodiversity. **Science of the Total Environment**, v. 545, p. 11-20, 2016.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

OSTERGAARD, L.; OLSEN, H. S. Industrial applications of fungal enzymes. In: ESSER, K. **The mycota – a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research – Industrial Applications X**. Springer, 2010, p. 269-290.

OZ, Y. et al. Colonization of peritoneal catheter with a thermophilic fungus, *Thermoascus crustaceus*: a case report. **Medical Mycology**, v. 48, p. 1105-1107, 2010.

PAN, W. et al. Diversity of thermophilic fungi in Tengchong Rehai National Park revealed by ITS nucleotide sequence analyses. **The Journal of Microbiology**¸v. 48, n. 2, p. 146-152, 2010.

PANAGIOTOU, G. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 1, p. 37-45, 2003.

PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology.** New Delhi, Asiatech Publishers, 2005

PECIULYTE, A. et al. Impact of the supramolecular structure od cellulose on the efficiency of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**¸v. 56, n. 8, p. 1-13, 2015.

PIRES, M. M.; GOMES, A. S.; MIDLEJ, M. M. B. C.; SÃO JOSÉ, A. R.; ROSADO, P. L.; PASSOS, H. D. B. Caracterização do mercado de maracujá. In: PIRES, M. M.; SÃO JOSÉ, A. R.; CONCEIÇÃO, A. O. **Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade**. Editus, 2011. 237 p.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Caracterização de fungos isolados da região amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. H. S.; SARMA, P. N. Gram husk-anin expensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1449-1460, 2006.

RAJASEKARAN, A. K.; MAHESHWARI, R. Thermophilic fungi: an assessment of their potential for growth in soil. **Journal Bioscience**, v. 18, p. 345-354, 1993.

RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Enzymatic saccharification of cellulosic materials. **Methods in Biotechnology**, v. 16, p. 219-233, 2004.

REHMAN, H. U. et al. Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-7, 2015.

RENGE, V.C.; KHEDKAR, V.S.; NANDURKAR, N. R. Enzyme synthesis by fermentation method: a review. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 2, n. 4, p. 585-590, 2012.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food And Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 61-66, 2010.

SACCARO-JÚNIOR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil**. Ambiente e Sociedade**¸ v. 14, n. 1, p. 229-244, 2011.

SALAR, R. K.; ANEJA, K. R. Thermophilic fungi: Taxonomynad biogeography. **Journal of Agricultural Technology**, v. 3; n. 1, p. 77-107, 2007.

SÁNCHEZ, C.; Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-164, 2009.

SANTOS, F. R. S. et al. Production and characterization of β-glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 16, p. 633-641, 2016.

SCARAMUZZA, N.; BERNI, E. Heat-resistent of *Hamigera avellanea* and *Thermoascus crustaceus* isolated from pasteurized acid products. **International Journal of Food Microbiology**, p. 63-68, 2014.

SEO, J. et al. Production of endoglucanase, beta-glucosidase and xylanase by *Bacillus licheniformis* grown on minimal nutrient medium containing agriculture residues. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 7, p. 946-950, 2014.

SERNA-CHAVEZ, H. M.; FIERER, N.; BODEGON, P. M. Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. **Global Ecology and Biogeography**, v. 22, p. 1162-1172, 2013.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extracellular alpha-amylase activity. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 897-905, 2009.

SIGOILLOT, C. et al. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. **Journal of Biotchnology**, v. 115, p. 333-343, 2005.

SILVA, V. C. T. et al. Effect of pH, temperature, and chemicals on the endoglucanases and β-glucosidases from the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. obtained by solid-state and submerged cultivation. **Biochemistry Research International**, p. 9, 2016.

SINGH, S.; PILLAY, B. ORIOR, A. Thermal stability of β-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 26**,** p. 502-508, 2000.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solidstate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOUZA, R. L. A. et al. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 987–992, 2010.

SOUZA, W. R. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. In: A. K. Chandel; S. S. da Silva (Eds.); Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization improve, p.207–233, 2013.

SORENSEN, A. et al. Fungal Beta-glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, v. 3, p. 612-631, 2013.

STOLK, A. C. Thermophilic species of *Talaromyces* Benjamin and *Thermoascus* Miehe. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 31, p. 317-330, 1965.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SZÉKELY, A. J. et al. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. **Microbial Ecology**, v. 57, p. 522-533, 2009.

TAKAHASHI, J. A. et al. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soilfor antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, p. 98–204, 2008.

TANG, J. et al. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as dectected by the quinone profile method. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1999-2006, 2004.

TANI, S.; KAWAGUCHI, T.; KOBAYASHI, T. Complex regulation of hydrolytic enzyme gene for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, p. 4829-4837, 2014.

TAYLOR, D. L. et al. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. **Ecological Monographs**, v. 84(1), p. 3–20 2014.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, p. 1078-1088, 2014.

TIWARI, P.; MISRA, B. N.; SANGWAN, N. S. β-glucosidases from the fungus *Trichoderma*: An eficiente celulase machinery in biotechnological applications. **BioMed Research Internetional**, v. 13, p. 10, 2013.

THOMPSON, C. E. et al. A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves. **AMB Express**, 2013.

TOMME, P.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v. 37, p. 1-81, 1995.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 9, 2007

UCHOA, A. M. A. et al. Parâmetros físico-químicos, teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.

VASCONCELLOS, R. L. F. et al. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agricola**, v.67, n.6, p. 743-746, 2010.

VEGA, K. et al. Production of alkaline cellulase by fungi isolated from an undisturbed rain forest of Peru. **Biotechnology Research International**, 2012.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). **Microbial Genetic Bull**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, J. C. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Citino**, v. 1, p. 44-50, 2011.

WANG, J. et al. Antiviral Merosesquiterpenoids Produced by the Antarctic Fungus *Aspergillus ochraceopetaliformis* SCSIO 05702. **Journal of Natural Products**, v. 79(1), p. 59-65, 2015.

WANG, M. et al. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. **Advances Biochemistry Engineering Biotechnology**, v. 128, p. 1-24, 2012.

WAREING, P. W. Incidence and detection of thermotolerant and thermophilic fungi from maize with particular reference to *Thermoascus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 137-145, 1997.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR-Protocols: A Guide to Methods and Applications**, p. 315-322, 1990.

WILSON, C. A.; MCCRAE, S. I.; WOOD, T. M. Characterization of a β-D-glucosidase from anaerobic rumem fungus *Neocallimastix frontalis* with particular reference to attack on cellooligossacharides. **Journal of Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 217-227, 1994.

WOICIECHOWSKI, A. L. et al. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. **Biotecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 143-171, 2013.

YOSHIOKA, H.; HAYASHIDA, S. Relationship between carbohydrate moiety and thermostability of β-glucosidase from *Mucor miehei* YH-10. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, p. 571-577, 1981.