



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Ilha Solteira

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE ENGENHARIA  
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA  
POR ISOLADOS FÚNGICOS**

Letícia Louzada Ferreira

ILHA SOLTEIRA- SP  
Dezembro/ 2016

Letícia Louzada Ferreira

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA  
POR ISOLADOS FÚNGICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Engenharia Câmpus de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Heloiza Ferreira  
Alves do Prado

ILHA SOLTEIRA- SP

Dezembro/ 2016

Dedico aos meus pais **Pedro Ferreira** e **Célia Vilela Louzada Ferreira**, por todo amor, carinho e educação.

ao meu irmão **Pedro Tiago Louzada Ferreira**, pela amizade e por todo companheirismo nesses anos.

aos meu sobrinhos, por todo amor recebido.

ao meu Amor, **Diego Gonçalves Feitosa**, pelo carinho, incentivo, amizade e ao longos desses anos juntos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus, pela minha vida e por estar presente em todos os momentos, pelas oportunidades e por permitir a conclusão dessa etapa na minha vida. Obrigada!;

Aos meus pais Pedro Ferreira e Célia Vilela Louzada Ferreira, pelo amor, pela educação, por todos os ensinamentos, que me fizeram a pessoa que eu sou hoje, minha eterna gratidão a vocês;

Ao meu irmão Pedro Tiago Louzada Ferreira, pela amizade, por estar sempre presente e principalmente pelos momentos de adrenalina, ao me levar para prestar vestibular;

A minha cunhada Lindanil Costa Mattos, pelas inúmeras conversas e café;

Aos meus sobrinhos Gustavo, Thalles, Italo, Izabelly e Sophia, obrigada por serem esse amor infinito na vida da Tia;

A minha amiga/irmã Marcela Bilória, pela amizade, por estar presente, mesmo estando a km de distância, pelas conversas, risadas, pelas inúmeras xícaras de café, obrigada minha Amiga.

Aos meus amigos do “Experiência 9” obrigada pela convivência aos longos desses cinco anos, em especial aos meus amigos que permaneceram Carlos, Lumena, Lais e especialmente a minha amiga Vanessa.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Heloiza Ferreira Alves do Prado, pela oportunidade, receptividade, e toda orientação aos longos desses anos, que contribuiu de forma significativa na minha formação, Obrigada!;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP, pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo: 2012/1769-5)

A todos os meus amigos do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos UNESP Campus de Ilha Solteira, Lumena, Sirlene, Erica, Cíntia, Ana Paula, Veridiana, Wanderleia e Aline, obrigada pela convivência diária;

E um agradecimento especial, aquele que eu conheci no início dessa etapa e que caminhou junto comigo ao longo desses anos, ao meu noivo Diego Gonçalves Feitosa, obrigada meu Amor, por fazer essa caminha ainda mais especial.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi selecionar fungos filamentosos com potencial de produção de xilanase em cultivo em estado sólido utilizando diferentes tipos de resíduos agroindustriais como substrato para observação comparativa do perfil de produção enzimática e o efeito da composição do meio de cultivo. Os isolados P5.7, EIFP1-14<sup>a</sup>, CNS4, P2B6-1, EIFP2-1 e P2D19, tiveram uma maior produção enzimática, e estes isolados foram avaliados quanto ao tempo de cultivo, nos substratos que induziram maior atividade enzimática, sendo o pico de produção no tempo de 72h de cultivo. Os isolados EIFP2-4, P2D19, EIFP1-14<sup>a</sup> e P2B6-1, se destacaram e foram caracterizados em relação condições de temperatura e pH. Sendo que em relação a caracterização físico-química, os isolados EIFP2-4 e P2D19 obtiveram maior produção enzimática quando cultivado na mistura bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo por 72h de cultivo, com atividade máxima entre 60°C e 65°C e pH entre 5,0 a 6,5. Assim, observa-se que as condições de crescimento em um processo fermentativo para a produção enzimática, podem ser usadas como um diferencial na produção de xilanase para otimizar este processo.

## **ABSTRACT**

The objective of the present work was to select filamentous fungi with xylanase production potential in solid state culture using different types of agroindustrial residues as substrate for comparative observation of the enzymatic production profile and the effect of the composition of the culture medium. The isolates P5.7, EIFP1-14<sup>a</sup>, CNS4, P2B6-1, EIFP2-1 and P2D19, had a higher enzymatic production, and these isolates were evaluated for the time of culture, in the substrates that induced greater enzymatic activity, being the peak Production of 72 hours culture time. The isolates EIFP2-4, P2D19, EIFP1-14<sup>a</sup> and P2b6-1, which had a higher enzymatic production and was characterized in relation to temperature and pH conditions. The EIFP2-4 and P2D19 isolates showed higher enzymatic production when cultivated in the sugarcane bagasse and wheat bran mixture (1: 1) for 72 h of culture, with activity Maximum between 60°C and 65°C and pH between 5.0 to 6.5. Thus, it is observed that the growth conditions in a fermentative process for the enzymatic production can be used as a differential in xylanase production to optimize this process.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Arranjo típico da parede celular vegetal, com a disposição das fibras de celulose, hemicelulose e lignina.....	12
<b>Figura 2</b> As diversas enzimas que participam do complexo xilanolítico.....	13
<b>Figura 3</b> Esquema simplificado da produção de etanol e xilitol por bactérias e leveduras a partir de material lignocelulósico.....	16
<b>Figura 4</b> Regressão da produção enzimática para os diferentes tempos de cultivo dos isolados selecionados. ....	24
<b>Figura 5</b> Influência da temperatura sobre a atividade de xilanase pelos isolados selecionados.	25
<b>Figura 6</b> Influência do pH sobre a atividade de xilanase pelos isolados selecionados.....	26
<b>Figura 7</b> Análises das estruturas morfológicas do isolado EIFP2-4.....	27

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Produção de enzimas xilanolíticas por fungos usando resíduos lignocelulósicos como substrato ..... 17

**Tabela 2** Produção de xilanase por cultivo em estado sólido, utilizando diferentes substratos, após 72 horas de cultivo. .... 21

**Tabela 3** Fontes de variação e probabilidade F para Atividade e desdobramento de..... 23



## SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVOS .....	11
2.1 Objetivos Gerais.....	11
2.2 Objetivos específicos .....	11
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Parede Celular Vegetal .....	11
3.1.1 Hemicelulose.....	12
3.2 Enzimas do complexo xilanolítico.....	12
3.3 Produção de xilanase.....	14
3.4 Aplicação das xilanases.....	16
3.5 Cultivo em estado sólido.....	16
3.6 Utilização resíduos lignocelulósicos como substratos para produção enzimática por fungos filamentosos.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1 Micro-organismos .....	18
4.2 Pré-inoculo para o cultivo em estado sólido.....	18
4.3 Produção enzimática por fermentação em estado sólido.....	18
4.4 Determinação de atividade enzimática .....	18
4.5 Estudo da influência de diferentes substratos na produção enzimática.....	19
4.6 Influência do tempo de cultivo na produção enzimática.....	19
4.7 Caracterização físico-química da enzima .....	19
4.7.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática .....	19
4.7.2 Efeito do pH na atividade enzimática.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
5.1 Efeito da Fonte de Carbono na Produção Enzimática .....	20
5.2 Efeito do tempo de cultivo na produção enzimática.....	22
5.3 Caracterização físico-química da enzima.....	24
5.3.1 Efeito da temperatura na produção enzimática.....	24
5.3.2 Efeito do pH na produção enzimática.....	25
5.4 Identificação dos isolados selecionados.....	26
6. CONCLUSÃO.....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28

## 1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos apresentam um potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas o qual tem sido utilizada comercialmente ao longo dos anos (JAYANI et al., 2005). Os estudos sobre a produção enzimática por micro-organismos têm crescido, assim como a diversidade de substratos alternativos utilizados (VIEILLE e ZEIKUS, 2001; MARTIN et al., 2004; PHUTELA et al., 2005; KAUR et al., 2004).

Entre as enzimas produzidas pelos micro-organismos, as enzimas hemicelulolíticas têm um potencial de aplicação industrial em vários setores como, na indústria de alimentos, na formulação de ração animal, indústria de papel e celulose e mais recentemente na produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais. Assim, as pesquisas por micro-organismos que tenham uma produção de enzimas com características importantes para aplicação no setor industrial são de interesse constante. Dentre os micro-organismos com potencial para aplicações nos processos biotecnológicos, os fungos vêm despertando interesse, em razão à grande diversidade de enzimas que secretam no ambiente. (BHAT, 2000; HOWARD, 2003).

O seu cultivo em substratos lignocelulósicos, que entre estes, inclui os resíduos agroindústriais tais como farelo de trigo, palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar, possibilita fixação ao substrato para o crescimento fúngico, além de ser uma fonte de nutrientes, estes resíduos se aproximam das condições dos habitats naturais em que estes micro-organismos vivem, assim, estes resíduos vem sendo utilizados como substratos e/ou fontes de carbono para a produção enzimática. (BENNET, 1998; SAHA, 2003).

Atualmente, há uma preocupação em minimizar a quantidade de resíduos no ambiente, uma vez que esses podem se tornar um problema ambiental. Assim a busca por micro-organismos produtores de enzimas termoestáveis e com boa atividade enzimática, os quais visem a diminuição dos custos de produção, o aumento da disponibilidade dos produtos de hidrólise, são interessantes para o setor industrial. O avanço das pesquisas sobre as características físico-químicas e de purificação das enzimas, tem possibilitado o surgimento de novas aplicações enzimáticas na indústria (DEMIRIJAN et al.2001).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

O presente trabalho tem como objetivo selecionar fungos filamentosos com potencial de produção de xilanase em cultivo em estado sólido;

### **2.2 Objetivos Específicos**

- i) Estudo do perfil de produção de xilanase por cultivo em estado sólido (CES), visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais;
- ii) Caracterização físico-química da enzima de interesse;

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

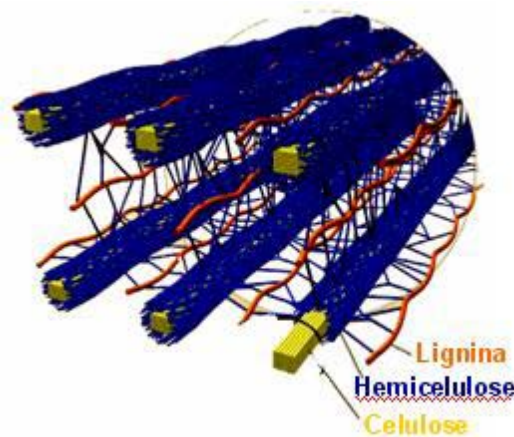
### **3.1. Parede Celular Vegetal**

A parede celular vegetal é responsável pela forma e rigidez da célula, além de definir o tamanho do protoplasto, evita o rompimento da membrana plasmática por entrada de água no interior da célula, além de atuar na defesa contra micro-organismos patogênicos (RAVEN et al., 2001).

Morfologicamente, a parede celular é dividida em três regiões diferentes, a lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é a região de intersecção entre duas células. Esta camada intercelular é rica em substâncias pécticas mergulhadas em um meio aquoso, (SANTOS, 2012), A parede primária da maioria dos vegetais é formada por três estruturas independentes, as microfibrilas de celulose, os polissacarídeos não-celulósicos, que incluem hemiceluloses e pectinas. (RAVEN et al., 2001).

Quimicamente, a parede celular é uma matriz complexa composta de polissacarídeos, proteínas, água e minerais. Dos polissacarídeos, destacam-se a celulose, hemicelulose, lignina e a pectina. (JUNG, 1992).

**Figura 1** Arranjo típico da parede celular vegetal, com a disposição das fibras de celulose, hemicelulose e lignina.



Fonte: PETERS, 2014

### 3.1.1. Hemicelulose

#### 3.1.1.1. Xilano

Segundo Schulze 1891, as hemiceluloses são heteropolímeros de xilose, galactose, manose, arabinose e vários outros açúcares, bem como seus ácidos urônicos. A xilana é o principal polissacarídeo da hemicelulose e é formada por unidades de D-xilose ligadas entre si por ligações xilopiranosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). A xilana está presente na madeira numa proporção que varia de 7 a 30 % de todo o material da parede celular de organismos vegetais.

As xilanas realiza um papel importante na contextura da madeira, interagem covalentemente com a pectina, estão intimamente associadas a lignina e estão ligadas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals à cadeia de celulose (BEG et al, 2001; POLIZELI et al, 2005).

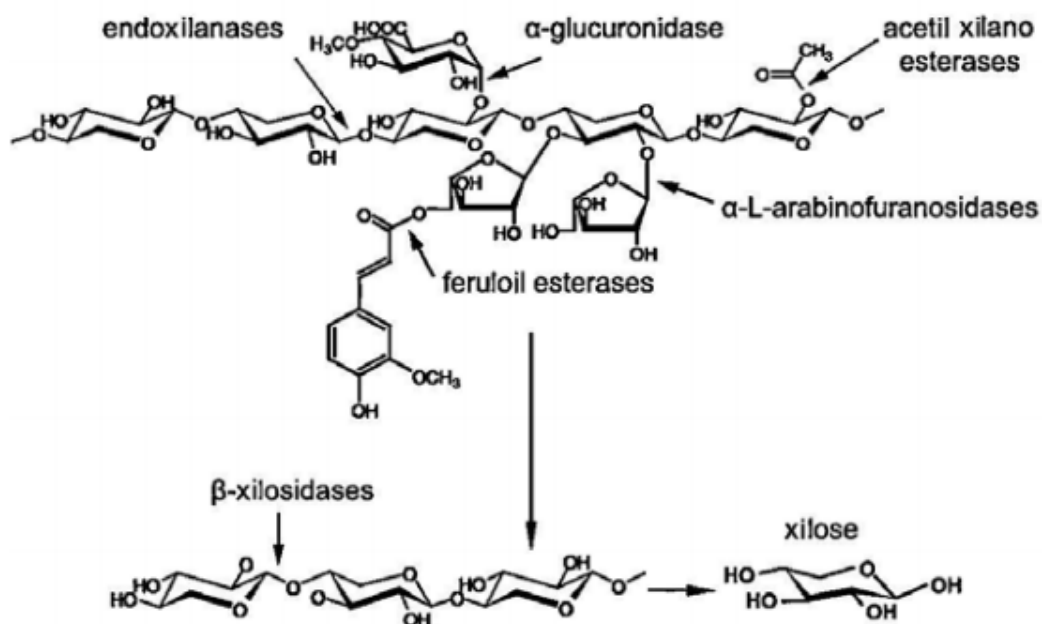
## 3.2. Enzimas do complexo xilanolítico

As xilanases são enzimas que degradam as xilanas por mecanismo de ação exo e endo. No entanto, a degradação total da xilana inclui as enzimas que degradam o esqueleto, formado pelos resíduos de D-xilose e aqueles que atuam nos resíduos substituintes das ramificações do esqueleto.

O complexo xilanolítico pode ser clivado pela ação de diferentes enzimas que atuam no xilano, como ilustrado na Figura 2. Assim, têm-se:

**Endo- $\beta$ -1,4-xilanases** (1,4- $\beta$ -D-xilana xilanohidrolase; E.C. 3.2.1.8): clivam as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 internas das moléculas de xilana, liberando xilooligossacarídeos e conseqüentemente reduzindo o grau de polimerização do substrato. De acordo com Wong et al (1988) as endoxilanases podem ser de dois tipo, de acordo com o produto final da reação. Assim podem ser endoxilanases não desramificantes as quais não conseguem hidrolisar o ponto de ramificação 1,3- $\alpha$ -L-arabinofuranosil da arabinoxilana e as endoxilanases desramificantes as quais conseguem clivar essa ligação liberando arabinose.

**Figura 2** As diversas enzimas que participam do complexo xilanolítico.



Fonte: SUN et al., 2012

**$\beta$ -D-xilosidase** (1,4- $\beta$ -D-xilana xilohidrolase; E.C. 3.2.1.37): liberam xilose a partir de xilooligossacarídeos curtos e xilobiose. São capazes de clivar substratos artificiais como  $p$ -nitrofenil e  $o$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (WONG et al., 1988).

**Acetilxilana esterase** (E.C. 3.1.1.6) que remove os grupos O-acetil na posição do C2 e\ou C3 d o resíduo  $\beta$ -D-xilopiranosil da acetil xilano; (WONG et al., 1988).

Arabinases as quais removem resíduos de L-arabinose na posição do C2 e C3 de  $\beta$ -D-xilopiranosil. Elas podem apresentar dois modos de ação: **exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase** (E.C. 3.2.1.55) a qual degrada arabinanas ramificadas e o  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-

arabinofuranosídeo; e a **endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase** (E.C. 3.2.1.99) a qual hidrolisa as arabinanas lineares; (WONG et al., 1988).

**$\alpha$ -Glicuronosídate** (E.C. 3.2.1.-) hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,2 entre o ácido glicurônico e o  $\beta$ -D-xilopiranosil removendo os resíduos de  $\alpha$ -4-O-metil; (WONG et al., 1988).

**Ácido ferúlico esterase** (E.C. 3.1.1.-) e a **Ácido  $p$ -cumaril esterase** (E.C.3.1.1.-) as quais clivam as ligações ésteres do xilano, sendo que a primeira cliva entre a arabinose e o ácido ferúlico e a segunda entre a arabinose e o ácido  $p$ -cumarico. (WONG et al., 1988).

As xilanases são agrupadas em famílias de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos, como pode ser observado na classificação glicosil hidrolases observado no banco de dados Cazy (Carbohydrate-Active enzymes), esta base de dados apresenta a classificação e as informações em relação as enzimas envolvidas na síntese, no metabolismo e no transporte de carboidratos. As famílias estão reunidas em 14 clãs diferentes que apresentam semelhanças estruturais. Esta base de dados compreende, atualmente, 94 famílias de glicosil transferases, 22 famílias de polissacarídeo-liases e 16 famílias de polissacarídeo-esterases (CANTAREL, et al., 2009; Cazy: <http://www.cazy.org/>).

### 3.3. Produção de xilanase

A produção de xilanase pode ocorrer tanto pelo processo de cultivo em estado sólido (CES), quanto por cultivo submerso, a indústria tem adotado o processo de cultivo submerso, em função das condições operacionais, no entanto, o cultivo em estado sólido oferece melhor adaptação ao crescimento do fúngico. Assim, na CES, os substratos sólidos, atuam como fonte de carbono, essa condição de crescimento é mais próximo das condições do habitat natural destes micro-organismos. É um sistema de cultivo alternativo para a produção de produtos de valor agregado a partir de micro-organismos, especialmente enzimas (PARANTHAMAN et al., 2008).

Industrialmente os fungos mais empregados no processo de fermentativo para a obtenção do extrato enzimático, entre os fungos xilanolíticos destacam-se: *Aspergillus niger*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Humicola lanuginosa*; *Humicola grisea*; *Talaromyces emersonii*; *Thermoascus aurantiacus* e entre as bactérias têm-se: *Bacillus stearothermophilus*, *Cellulomonas fimi*; *Bacillus polymyxa*; *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis* entre outras espécies de *Bacillus* sp (BEG et al, 2001; POLIZELI et al, 2005).

### 3.4. Aplicação das xilanases

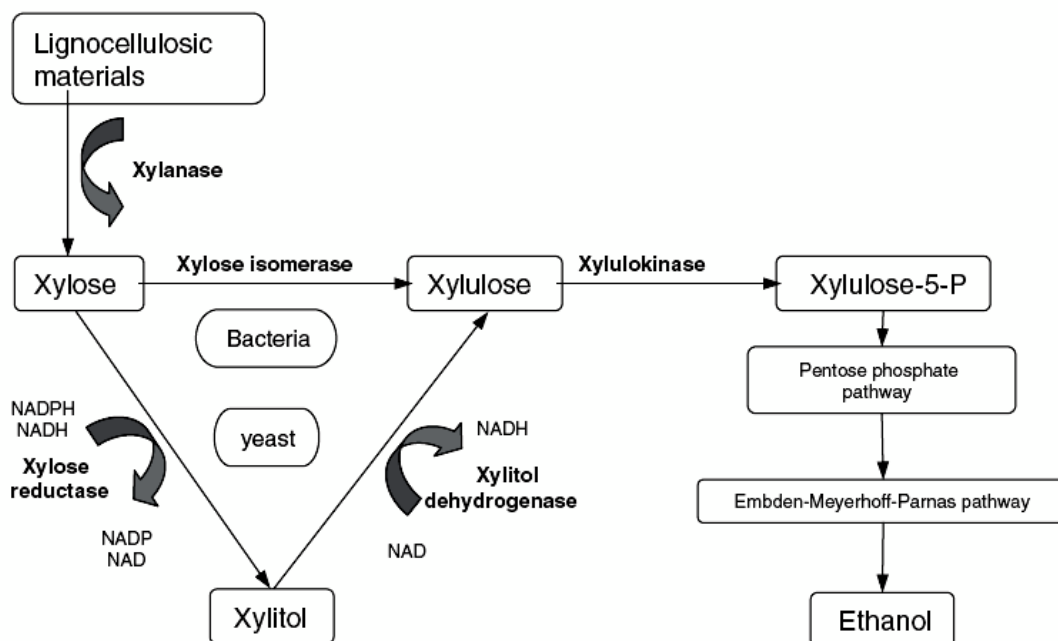
As xilanases têm uma ampla utilização no setor industrial e tem sido utilizada em vários processos biotecnológicos, a aplicação de tecnologia enzimática reduz custos operacionais podendo aumentar a qualidade do produto, utilizando processos limpos que contribuem para minimizar os impactos ambientais (MAYRINK, 2010).

Na indústria papelreira a xilanase participa no processo de branqueamento da polpa kraft, o biobranqueamento da polpa por xilanase, em substituição ao cloro, promovendo a remoção da xilana ligada ao complexo ligninacarboidrato, facilitando a lixiviação da lignina. Por outro lado, o tratamento do material com xilanase na fase de pré-cozimento ajuda a desorganizar a estrutura da parede celular, facilitando, também, as etapas iniciais do processo. (BOCCHINI, et al, 2005).

As xilanases são usadas na produção de ração animal, sendo importante para o setor do agronegócio, juntamente com glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitase, galactosidases e lipases, estas enzimas quebram arabinosilanos nos ingredientes da ração, reduzindo a viscosidade da matéria crua (POLIZELLI, et al., 2005).

Outra aplicação, ainda em ascensão é o estudo das xilanases, associadas a outras enzimas como mananases, ligninases, xilosidases, glucanases, glicosidases, para a produção de combustíveis biológicos e do xilitol a partir de biomassa lignocelulolítica. O processo biológico de produção de etanol combustível requer a deslignificação da lignocelulose para liberar celulose e hemicelulose complexada com a lignina. Em seguida há uma despolimerização dos polímeros de carboidrato para produzir açúcar livre e finalmente, fermentar, geralmente com *Saccharomyces* sp a mistura dos açúcares de pentose e hexose para a produção de etanol. Um esquema desse processo está ilustrado na Figura 3. (BEG et al,2001; POLIZELI et al, 2005).

**Figura 3** Esquema simplificado da produção de etanol e xilitol por bactérias e leveduras a partir de material lignocelulósico.



Fonte: Polizeli et al, 2005

### 3.5. Cultivo em estado sólido

O cultivo em estado sólido (CES) está relacionado com o crescimento do micro-organismo em substratos sólidos, e com uma quantidade de água mínima, assim a matriz sólida fornece uma estrutura de fixação, ou até mesmo pode ser uma fonte de nutrientes para o crescimento do micro-organismo. O cultivo estado sólido, cria um ambiente próximo as condições ambientais em que muitos fungos vivem, permitindo a penetração das hifas no substrato, auxiliando as trocas gasosas e a manutenção metabólica. (HÖLKER; LENZ, 2005).

No CES algumas variáveis físicas podem afetar este processo, como por exemplo a temperatura, que pode influenciar o crescimento, produção enzimática e estabilidade da enzima, em relação aos níveis de umidade ao longo do processo de cultivo, é importante que mantenha uma condição ótima, pois baixos níveis de umidade diminuem a difusão de nutrientes, crescimento microbiano, estabilidade enzimática e a absorção do substrato. Os níveis de umidade em processos de FES variam entre 30 a 85%. No caso de fungos filamentosos, podem variar entre 20 a 70% (KRISHNA, 2005).



Outra variável importante é o substrato, já que o tamanho das partículas estabelece espaço vazio que é ocupado pelo ar, e a taxa de transferência de oxigênio para o espaço vazio pode influenciar o crescimento fúngico. Assim partículas de substrato menores normalmente possibilita o aumento da área de superfície para ação dos micro-organismo. (KRISHNA, 2005).

### 3.6. Utilização resíduos lignocelulósicos como substratos para produção enzimática por fungos filamentosos

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para o cultivo de micro-organismo tem crescido nas últimas décadas, este processo objetiva a produção enzimática por meio da degradação de material vegetal. (BANSAL et al., 2012).

Produtos ou subprodutos provenientes da agroindústria, na forma de resíduos não processados, são empregados na CES como substratos, como fonte de carbono para o crescimento dos micro-organismos, além de apresentarem um valor menor, esses substratos são divididos em três grupos: os que apresentam amido como fonte de carbono principal, como por exemplo batata; os que apresentam celulose ou lignocelulose como fonte de carbono principal, como por exemplo, as madeiras e os que apresentam açúcares solúveis como fonte de carbono principal sendo eles forragens, entre outros (ORLANDELLI et al., 2012).

**Tabela 1** Produção de enzimas xilanolíticas por fungos usando resíduos lignocelulósicos como substrato

Fungo	Substrato	Temperatura de crescimento	Enzimas	Tempo	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 1808	Aveia	28°C	Xilanase	96h	Christov et al. (1999)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Farelo de trigo	55°C	Xilanase	168h	Alam et al. Thermoascus (1994)
<i>Thermoascus auranticus</i>	Palha de trigo	50°C	Xilanase	120h	Kalogeris et al. (1998)

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Micro-organismos**

Foram utilizados 20 isolados fúngicos que estão depositadas na coleção de fungos do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia, da UNESP Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade da Prof. Dr<sup>a</sup>. Heloiza Ferreira Alves do Prado. As linhagens foram isoladas de solos coletado em duas áreas do Cerrado do estado do Mato Grosso do Sul.

### **4.2. Pré-inóculos para o cultivo em estado sólido**

O inóculo dos isolados fúngicos foi feito em placa de Petri contendo o meio de cultivo ágar Sabouraud, mantendo-se as placas por 48h a 30°C. Após este período foram retirados 5 discos miceliais, de 0,5 cm de diâmetro, que foram transferidos para frascos de Erlenmeyer.

### **4.3. Produção enzimática por cultivo em estado sólido**

O cultivo em estado sólido foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5,0 g de substrato, o qual foi umedecido com 10 ml de solução de minerais (1,5 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 g L<sup>-1</sup> uréia, 0,03 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), visando um teor de umidade inicial em torno de 75 %. O inóculo fúngico foi preparado a partir do cultivo descritos no item 4.2, utilizando um bastão de vidro para homogeneizar o inóculo no substrato e a solução salina. Após o período de incubação de 72 horas, as amostras foram retiradas do climatizador e foi adicionado de 50 mL de água destilada nos frascos de Erlenmeyer com o crescimento fúngico, seguido por agitação em shaker a 100 ciclos/min por 1 hora à temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada em tecido tipo gaze, seguido por centrifugação a 10.000g, 5 °C durante 15 min. A suspensão resultante foi utilizado como extrato enzimático bruto para a determinação da atividade enzimática.

### **4.4. Determinação de atividade enzimática**

A atividade enzimática para xilanase foi determinada de acordo com DAMIANO et al, 2003, adotando o micro-ensaio, onde a mistura de reação contendo 0,025 mL da solução enzimática bruta e 0,225 mL de solução xilana Birchwood-

Sigma a 0,5 % em tampão acetato 0,1 M em pH 5,0, foi incubada por 10 min a 60 °C. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método do DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), adicionando 0,250 mL do reagente DNS à mistura de reação. Tal mistura foi incubada em banho maria a 100 °C por 5 minutos, e em seguida resfriada e foi adicionado 2,5 mL água destilada. Após a homogeneização, foi determinada leitura em espectrofotômetro a  $\lambda$  540 nm. Uma unidade de atividade xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de xilose por minuto, nas condições de reação, a partir da curva padrão de xilose.

#### **4.5. Estudo da influência de diferentes substratos na produção de xilanase**

Para o estudo do efeito da fonte de carbono na produção de xilanase, utilizou-se os substratos, farelo de trigo (FT), palha de milho triturada (PM), bagaço de cana-de-açúcar triturada (BC), pó de serra (S) e a mistura bagaço de cana-de-açúcar + farelo de trigo (BC+FT 1:1 p/p), como fonte de carbono, respeitando o protocolo descrito no item 4.3.

#### **4.6. Influência do tempo de cultivo na produção enzimática**

O Efeito na produção de xilanase ao longo do tempo foi realizada nas melhores condições de substrato, descritas no item 4.5, variando o tempo de cultivo em 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A atividade enzimática foi determinada de acordo com item 4.4.

#### **4.7. Caracterização físico-química das enzimas**

##### **4.7.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática.**

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da xilanase foi realizada nas mesmas condições descritas no item 4.4, com mudança na temperatura, onde a mistura de reação contendo 0,025 mL da solução enzimática bruta e 0,225 mL de solução xilana Birchwood-Sigma a 0,5 % em tampão acetato 0,1 M em pH 5,0, foi incubada por 10 min nas diferentes temperaturas, de 30 a 90°C, com intervalos de 5°C.

#### **4.7.2. Efeito do pH na atividade enzimática**

Para a determinação do pH ótimo, as atividades enzimáticas foram avaliadas como descrito no item 4.4, com diferentes valores de pH, onde a mistura de reação contendo 0,025 mL da solução enzimática bruta e 0,225 mL de solução xilana Birchwood-Sigma a 0,5 % em tampão acetato 0,1 M em diferentes valores de pH, na faixa de 3,0 a 8,5, foi incubada por 10 min, na melhor condição de temperatura descrita no item 4.7.1.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Avaliação da influência de diferentes substratos na produção enzimática**

Em relação aos substratos analisados como fonte de carbono para a produção enzimática, pode-se observar na tabela 1, que os valores máximos de atividade de xilanase foram para os isolados, EIFP2-4, P2D19 e P5-7, com valor máximo de produção enzimática de 27,08; 24,03 e 20,78 U ml<sup>-1</sup>, respectivamente, quando cultivado na mistura de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (1:1), P2B6-1 com valor máximo de produção enzimática de 25,19 U ml<sup>-1</sup>, quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e EIFP1-14<sup>a</sup> e CNS4, com valor máximo de produção enzimática de 16,98 e 16,02 U ml<sup>-1</sup> respectivamente, quando cultivado em farelo de trigo. Em relação aos outros resíduos utilizados como substrato, a palha de milho triturada e o pó de Serragem o valor máximo de atividade de xilanase não foi superior a 6,0.

A mistura bagaço de cana-de-açúcar + farelo de trigo (1:1), favoreceram a produção enzimática de xilanase, sendo que os valores máximos de produção para o isolado EIFP2-4 quando cultivado na mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1), foi de 27,08 U ml<sup>-1</sup>, enquanto que, quando o mesmo isolado foi cultivado em farelo de trigo obteve o valor máximo de 4,90 U ml<sup>-1</sup> e quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar foi de 3,49 U ml<sup>-1</sup>.

Segundo Leite et al. (2008), o farelo de trigo é uma fonte de carbono e nitrogênio e tem sido utilizado para produção de celulases e hemicelulases. O farelo de trigo além de outros constituintes, apresenta celulose (7,57%), hemicelulose (31,19%) e contém baixo teor de lignina (4,06%), o que torna este resíduo menos recalcitrante do que o bagaço de cana-de-açúcar, sendo utilizado pelos fungos na etapa inicial de crescimento. Já a mistura

de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1) utilizados como substratos favoreceram o crescimento fúngico e a indução de enzimas para a degradação do material vegetal presente no substrato.

**Tabela 2** Produção de xilanase por cultivo em estado sólido, utilizando diferentes substratos, após 72 horas de cultivo.

Isolados	Atividade enzimática de xilanase (U mL <sup>-1</sup> )					Média	Valor Máximo
	FT*	BC*	FT+BC*	PM*	PS*		
EIFP2-4	4,90	3,49	27,08	4,29	1,58	8,27	<b>27,08</b>
P2B6-1	4,78	25,19	7,37	0,08	4,78	8,44	<b>25,19</b>
P2D19	16,30	4,89	24,03	5,25	2,24	10,54	<b>24,03</b>
P5-7	4,17	6,29	20,78	3,19	4,76	7,84	<b>20,78</b>
EIFP1-14 <sup>a</sup>	16,98	3,17	13,52	2,05	5,14	8,17	<b>16,98</b>
CNS4	16,02	11,29	13,56	0,46	0,12	8,29	<b>16,02</b>
A-6.3	6,85	7,71	8,46	0,10	3,73	5,37	8,46
AF-22	5,49	6,29	4,24	3,73	2,00	4,35	6,29
EIFP2-2	5,83	4,61	6,10	0,08	4,19	4,16	6,10
EIF5A-3	5,88	2,44	5,41	0,58	1,37	3,14	5,88
EIFP2-1	4,81	3,81	3,93	5,85	1,71	4,02	5,85
EP-11	1,32	3,95	5,55	0,20	5,78	3,36	5,78
EIFP4B-2	3,49	5,72	4,17	2,44	4,25	4,01	5,72
9-A.1	5,56	4,78	5,63	1,51	3,24	4,14	5,63
EIFP2-2/1	3,12	2,15	2,66	5,41	2,61	3,19	5,41
P2B6-2	3,51	4,42	5,24	0,08	5,05	3,66	5,24
EIF5A	5,00	1,98	1,76	0,56	0,08	1,88	5,00
EIFP2-2/2	4,76	3,14	2,88	0,07	2,08	2,59	4,76
E-2.3	0,68	4,17	0,36	0,34	0,82	1,27	4,17
IAI5F	1,36	0,05	0,37	0,02	0,02	0,36	1,36

Fonte: Próprio Autor.

**Legenda:** FT (Farelo de Trigo); BC (Bagaço de Cana-de-açúcar); FT+BC (Mistura de Farelo de Trigo e Bagaço de Cana-de-açúcar (1:1)); PM (Palha de Milho) e PS (Pó de serragem)

Dentre os substratos alternativos, a mistura de bagaço de cana-de-açúcar + farelo de trigo, foram os que apresentaram as maiores atividades enzimáticas. Segundo DaSilva (2005) o cultivo em estado sólido de uma forma geral apresentam os melhores resultados em relação ao cultivo submerso, pois fornecem ao fungo um ambiente mais próximo do seu habitat natural (madeira e matéria orgânica em decomposição), que estimula esta cepa para produzir mais enzimas hemicelulases.

Na literatura, a utilização de resíduos agroindustriais como fonte fácil de acesso, para a produção de xilanase, foi relatada para vários fungos (Morretti et al., 2012; Chapla

et al., 2010; Facchini et al., 2011; Masui et al., 2012). Facchini et al (2011) observou a maior produção de xilanase (224,62 U g<sup>-1</sup>) por *Aspergillus japonicus* cultivado em farelo de soja, enquanto o fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7 (1292.0 U g<sup>-1</sup>) teve sua maior atividade de xilanase em cultivo em bagaço de cana-de-açúcar (Morretti et al., 2012), e neste mesmo substrato Chapla et al (2010) verificou a maior atividade de xilanase por *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 (51,88 U g<sup>-1</sup>).

## 5.2. Efeito do tempo de cultivo na produção enzimática

As linhagens P2D19 (BC+FT), EIFP1-14A (FT), EIFP2-4 (BC+FT), P2B6-1 (BC), P5-7 (BC+FT) e CNS4 (FT) foram selecionadas na etapa anterior, no item 5.1 e em seguida submetidas a diferentes tempos de cultivo nos substratos que induziram maior atividade enzimática.

A análise estatística dos dados foi feita por meio de análise de variância a 5% utilizando o software SISVAR (Sistema para Análise de Variância) e apresentadas na Tabela 2, e demonstraram que as melhores linhagens foram as P2D19, EIFP2-4 e

P2B6-1, com valores médios de atividade enzimática de 17,29; 13,12 e 11,02 (U ml<sup>-1</sup>), respectivamente.

Em relação atividade enzimática ao longo do tempo de cultivo, os valores apresentaram um comportamento de regressão quadrática, como observado na figura 4, apresentando o valor de R<sup>2</sup> de 0,73, sendo que os maiores valores são encontrados próximos do tempo de 72 horas.

De acordo com a tabela 2 observou-se que a interação linhagem com o tempo é significativo a 1%, observando-se que os períodos de 72, 96 horas se apresentaram como os melhores tempos para a atividade enzimática de quatro das seis linhagens, porém o período de 72 horas ao contrário do de 96 horas, não se igualou estatisticamente com tempos que apresentaram valores de atividade inferiores.

**Tabela 3** Fontes de variação e probabilidade F para Atividade e desdobramento de Linhagem dentro de cada nível de Tempo.

Fontes de variação	Atividade (U ml <sup>-1</sup> )
<u>Linhagem</u>	
P5.7	6,51 c
EIFP114	7,88 bc
CNS4	5,91 c
P2B6-1	11,02 abc
EIFP2-4	13,12 ab
P2D19	17,29 a
	$y = -0,0031x^2 + 0,5288x - 8,073$
<u>Tempo</u>	$R^2 = 0,73$
<u>Probabilidade de F</u>	
Linhagem	59,207**
Tempo	118,227
Linhagem x Tempo	9,557**
Regressão	
Regressão Linear	19,19**
Regressão Quadrática	22,95**
CV (%)	12,01

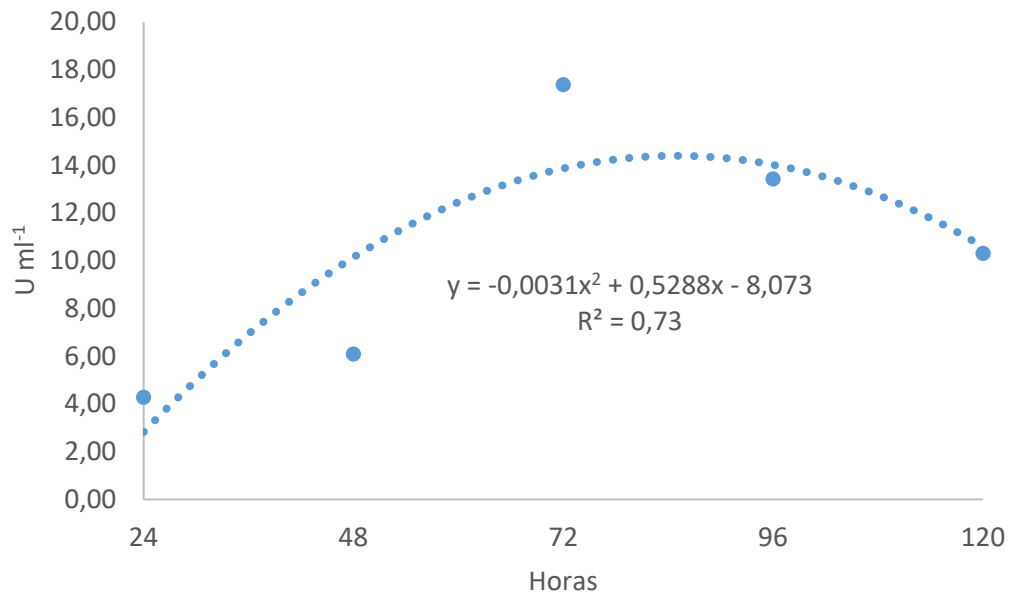
Linhagens	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
P5.7	0,51 b	2,14 ab	15,11 Aba	11,45 ABab	3,36 Bab
EIFP114A	0,64 b	2,69 ab	16,44 Aba	12,94 ABab	6,66 Bab
CNS4	1,98 b	4,34 ab	17,17 Aba	3,63 Bab	2,43 Bb
P2B6-1	8,00	10,05	11,79 B	13,19 AB	12,07 AB
EIFP2-4	7,32	12,13	16,47 AB	14,58 AB	15,09 AB
P2D19	7,18 b	5,16 b	27,21 Aa	24,71 Aa	22,19 Aa

ns = Não significativo, \*\* = Significativo a 1% de probabilidade, \* = Significativo a 5% de probabilidade, letras maiúsculas se diferem entre linhagens e letras minúsculas entre tempos

**Fonte:** Próprio Autor

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os dados apresentados por Shar e Madamwar (2005) que, trabalhando com *A. foetidus*, concluíram que a produção máximas de xilanase foi 72 horas. O resultado também está de acordo com Aguiar e Menezes (2000) que, em fermentação submersa com bagaço de cana não tratado utilizando *A. niger*, apresentaram melhor produção em 72 horas.

**Figura 4** Regressão da produção enzimática para os diferentes tempos de cultivo dos isolados selecionados.



Fonte: Próprio Autor

### 5.3. Caracterização físico química da enzima.

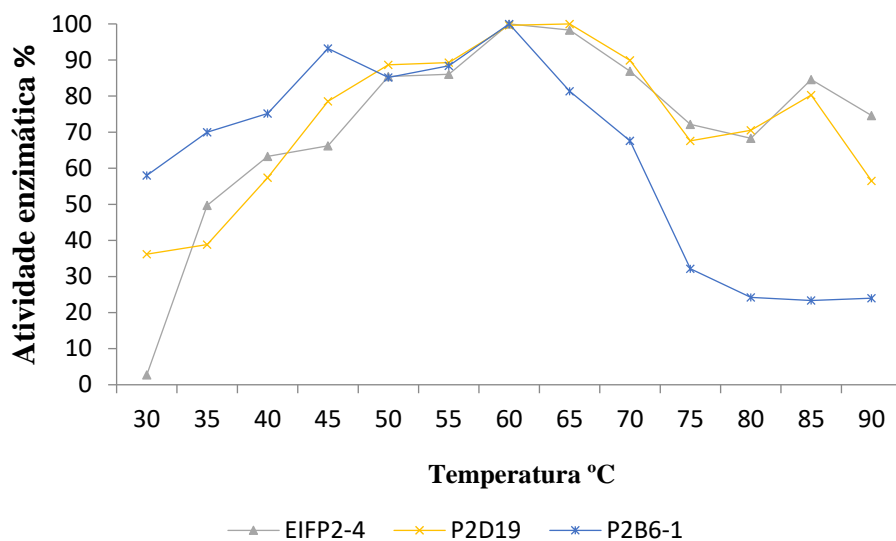
#### 5.3.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática.

As linhagens selecionadas e descritas no item 5.2 foram avaliadas em relação às condições ideais de temperatura para a produção de atividade enzimática. Pode se observar na Figura 5, que a temperatura ótima para as linhagens em estudo ficou entre os valores de 60°C a 65°C.

De acordo com o trabalho de Durand (1984), fungos dos gênero *Penicillium*, *Trichoderma reesei*, *Thielavia terrestres* e *Sporotrichum cellulophilum* apresentam condições ótimas de temperatura para a produção enzimática de xilanase, nos valores de 60 e 65°C.



**Figura 5** Influência da temperatura sobre a atividade de xilanase pelos isolados selecionados.



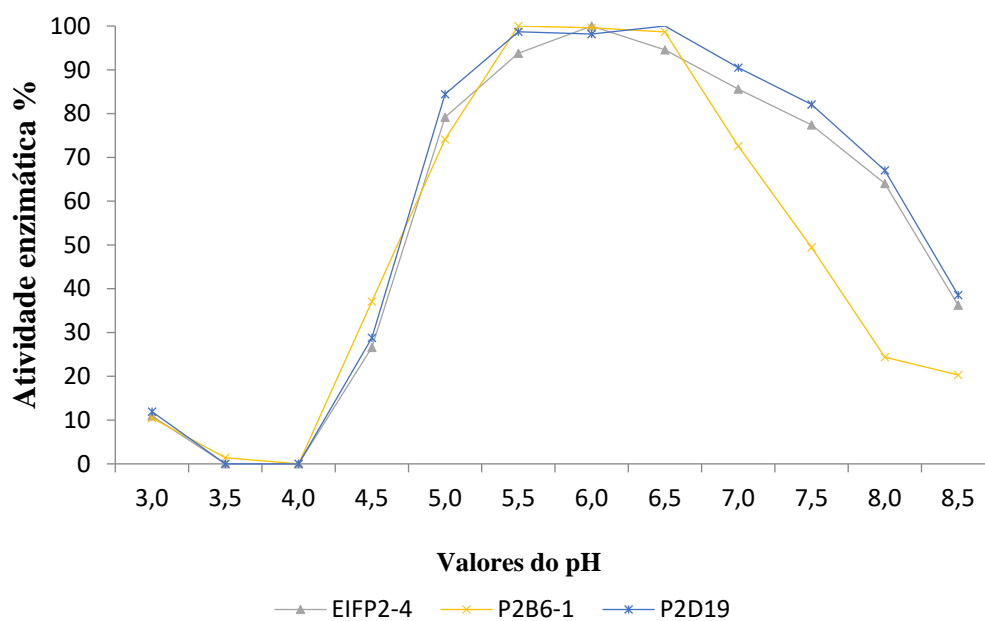
Fonte: Próprio Autor

### 5.3.2. Efeito do pH na atividade enzimática

As atividades de xilanase produzidas pelos fungos em estudo apresentaram pH ótimo entre os valores 5,0 a 6,5, o que é característico para as xilanases de linhagem fúngica. Na literatura em geral esse é o pH ótimo da maioria das xilanases estudadas.

De acordo com o trabalho de Alves-Prado (2010), estes mesmo valores de condições de pH ótimas de 5,0 a 6,0 foram encontrados para fungos do gênero *Neosartorya*. Enquanto que Singh et al. (2000) trabalhando com o fungo *Thermomyces lanuginosus* encontrou condições de pH ótimo com valores de 6,5. Em um estudo feito por DaSilva et al., (2005) a xilanase produzida por *Thermoascus aurantiacus* apresentou pH ótimo entre 5,0-5,5, sendo os valores próximo ao obtido no presente estudo.

**Figura 6** Influência do pH sobre a atividade de xilanase pelos isolados selecionados.

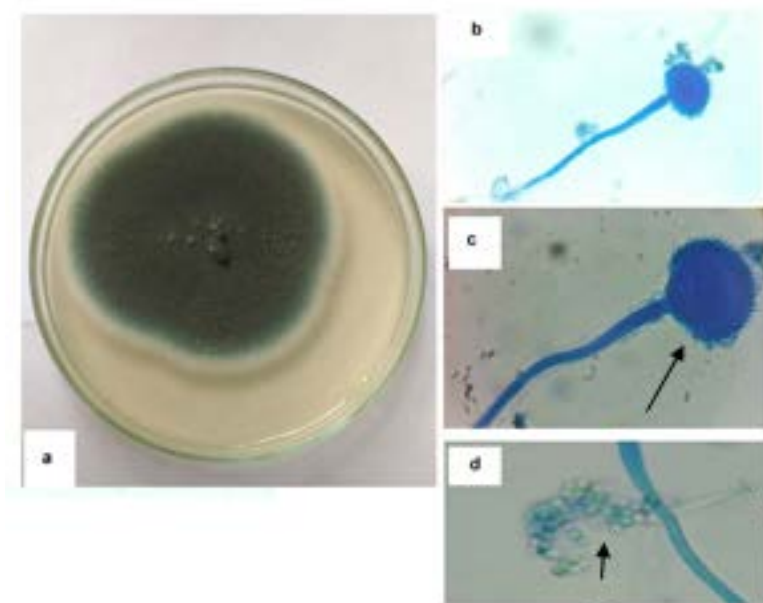


Fonte: Próprio Autor

#### 5.4. Identificação dos isolados selecionados

O isolado P2D19 foi identificado como o gênero *Neosartorya*, em projeto de pesquisa paralelo, Alves-Prado (2010) e o isolado EIFP2-4 foi identificado como gênero *Aspergillus*, através de análises de estruturas morfológicas. (Figura 7).

**Figura 7** Análises das estruturas morfológicas do isolado EIFP2-4.



**Fonte:** Próprio Autor

**Legenda:** a) cultivo do isolado EIFP2-4 em meio PDA, após 48h de cultivo; b) conidióforo (aumento de 100x); c) conidióforo (aumento de 400x) e d) conídios (aumento 400x)

## 6. CONCLUSÃO

Os fungos selecionados demonstraram potencial para a produção de xilanase. A produção enzimática dos fungos foi influenciada pela fonte de carbono, sendo que a mistura dos resíduos farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (1:1 p/p) utilizados como substrato, teve uma maior influência na indução para a produção de xilanase.

Os isolados EIFP2-4 e P2D19 apresentaram os maiores valores de atividade de xilanase  $270,8 \text{ U g}^{-1}$  e  $240,3 \text{ g}^{-1}$  respectivamente, utilizando como substrato a mistura de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (1:1p/p) sob cultivo em estado sólido, quando cultivado no tempo de 72 horas.

Estes resultados indicam a viabilidade da incorporação de fontes de carbono alternativos, e como vários fatores influenciam no cultivo dos micro-organismos, incluindo-se o pH, temperatura, fontes de carbono e o tempo de cultivo, para que um processo biotecnológico seja viável economicamente.

Nota-se a importância de estudos acerca da interferência da utilização de diferentes substratos e um processo de cultivo dos micro-organismos para a produção enzimática, bem como a análise de outras variáveis que possam otimizar este processo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B. CEPPA**, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000.

ALAM, M., GOMES, I., MOHIUDDINT, G., HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme Microbial Technology**, v. 16, p. 298-302, 1994.

BENNET, J.W. Mycothecnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal Biotechnology**, v.66, p. 101-107, 1998.

ALVES-PRADO, H.F.; PAVEZZI, F.C.; LEITE, R.S.R.; OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; DA SILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from brazilian cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 161, p.333-346, 2010.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste management**, v. 32, n. 7, p. 1341–6, 2012. Elsevier Ltd.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n.1-6, p. 355–383, 2000.

BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their applications: a review. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BOCCHINI, D.A.; OLIVEIRA, O.M.M.F; GOMES, E.; DASILVA, R. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3653– 3659, 2005.

CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research** vol. 37, p. 233-238, 2009.

Chapla, D.; Divecha, J.; Madamwar, D.; Shah, A. 2010. Utilization of agroindustrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**. 49, 361–369

CHRISTOV, L. .; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 511–517, 1999.

DAMIANO, V.B.; BOCCHINI, D.A.; GOMES, E.; DASILVA, R. Application of crude xylanase from *Bacillus licheniformis* 77-2 to the bleaching of eukalyptus Kraft pulp. **World Journal of Microbiology & biotechnology**, v.19, p. 139-144, 2003.

DaSilva, R; Lago, E. S; Merheb, C. W; Macchionr, M M; Park, Y K; Gomes, E. Production of xylanase and CMCase on solid-state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal Microbiology**. 36, 235-241. 2005

DEMIRIJAN, D; MORIS-VARAS, F; CASSIDY, C. Enzymes from extremophiles. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 144-151, 2001.

DURAND, H. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi : mesophiles *Trichoderma reei* and *Penicillium sp.* and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 6, p. 175–180, 1984.

Facchini, F. D. A.; Vici, A. C.; Reis, V. R. A.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. F., Reis, R. A.; Polizeli, M. L. T. M. 2011. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 34, 347–355.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–6, 2005.

HOWARD R. L. Lignocellulose biotechnonology: issues of bioconversion & enzye production. **African Journal of Biotechnonology**, Nairobi, v. 2, p. 602-19, 2003.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40 (9), p. 2931 - 2944, 2005.

JUNG, H.G. AND K.P. VOGEL. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **Journal Science Foodand Agriculture**, v.59, p.769-776, 1992.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. . Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 155–163, 1998.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n. 1- 2, p. 1–30, 2005.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; et al. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e 85 *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid – state fermentation using agro – industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 813 – 819, 2004.

Masui, D. C.; Zimbardi, A.L.R.L.; Souza, F.H.M; Guimarães, L. H. S.; Furriel, R. P.M.; Jorge, J. A. 2012. Production of a xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase and a cellulase- free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 28, 2689–2701

MAYRINK, M. I. C. B. Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulases na sacarificação da celulose. 2010. 94 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2010

Moretti, M. M. S; Bocchini-Martins, D. A.; Da Silva, R.; Rodrigues, A, Sette, L.D.; Gomes, E. 2012. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal Microbiology**. 43, 1062-1071

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-8, 1959.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; ALENCAR, J. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PARANTHAMAN, R.; VIDYALAKSHMI, R.; MURUGESH, S AND SINGARAVADIVEL. K.; Optimisation of Fermentation Conditions for Production of Tannase Enzyme by *Aspergillus oryzae* Using Sugarcane Baggasse and Rice Straw. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry** v. 3 n. 2 p. 105-110, 2008.

PETERS, N. K Doe Bioenergy Reserarch Centers. **Bionergy Science Center**. DOE-SCO162, p.1-35, 2014.

PHUTELA, U. DHUNA, V.; SANDHU, S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36: 63-69, 2005.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZALTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties e industrial applications. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Biology of plants. New York: **Worth Publ.**, p.791, 2001.

SANTOS, E.A.O. **Isolamento e seleção de microorganismos produtores de xilanase**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"- UNESP, Ilha Solteira, 2012.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v. 30, p 279–291, 2003.

SHAR, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization, **Process Biochem.** v. 40, p. 1763–1771, 2005.

SINGH, S.; REDDY, P.; HAARHOFF, J.; et al. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 2-3, p. 119–28, 2000.

SUN, J., TIAN, C., DIAMOND, S., GLASS, N. L. Deciphering Transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, vol. 11, n. 4, p. 482-493, 2012.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J.G. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol 65, n° 1, p. 1-43, 2001.