

**PRODUÇÃO DE XILANASE POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLO DE ÁREA DE  
CAATINGA.**

**MARIA LÚCIA GARCIA SIMÕES**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus  
de Rio Claro, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas (Área de  
Concentração: Microbiologia Aplicada)**

**Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
2006**

**PRODUÇÃO DE XILANASE POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLO DE ÁREA DE  
CAATINGA.**

**MARIA LÚCIA GARCIA SIMÕES**

**Orientadora: Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk Tornisielo**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus  
de Rio Claro, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas (Área de  
Concentração: Microbiologia Aplicada)**

**Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
2006**

*Aos meus pais Sidney e Odila, que me acolheram e me ampararam;*

*Aos meus queridos e amados filhos Paolla e Rodrigo, que na distância me acompanharam e apoiaram;*

*Ao meu amado esposo Daniel que ao meu lado trilhou cada etapa deste processo, cada momento de dificuldade e vitória;*

*À minha amiga Léo que tanto me ajudou;*

*À grande mulher Sâmia, minha orientadora e amiga, que acreditou em mim.....*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

- À Professora Sâmia Maria Tauk Tornisielo, pela orientação, por todos os ensinamentos, pelo apoio em todos os momentos e sincera amizade.
- Ao Centro de Estudos Ambientais da UNESP, pela utilização dos laboratórios e equipamentos.
- Aos funcionários e técnicos do Centro de Estudos Ambientais da UNESP, em especial a Sara, Francisca (Chica) e Eleni, pela ajuda constante e sincera amizade.
- Ao coordenador e professores da Área de microbiologia Aplicada do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da UNESP,
- À Professora Dejanira de Franceschi de Angelis, pela sua amizade, seu apoio e seus conselhos em momentos difíceis.
- À Professora Iracema Schoenlein Crusius, do Instituto Botânico de São Paulo, pela colaboração na identificação dos fungos isolados em solo de área de caatinga, utilizados neste trabalho.
- A Professora Maria Auxiliadora Cavalcanti, da Universidade Federal de Pernambuco, pela identificação dos fungos isolados em solo de área de caatinga, utilizados neste trabalho.
- A meu colega André “Saúva” Rodrigues, mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada), pela colaboração na identificação de alguns fungos.
- Aos meus queridos colegas Alex Fernando, Amauri, Joelma, Eduardo, Ana Kleiber, Gina, Christian entre outros, pelo companheirismo, amizade e colaboração durante estes anos que passamos juntos.

Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

Número	Página
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvi
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	8
<b>2.1 - CAATINGA</b> .....	8
<b>2.1.1 - Caracterização da caatinga</b> .....	8
<b>2.1.2 - Biodiversidade e Biotecnologia</b> .....	13
<b>2.2 - COMPOSIÇÃO DAS PAREDES CELULARES DAS PLANTAS</b> .....	18
<b>2.2.1 - Principais Componentes da Parede Celular Vegetal</b> .....	18
<b>2.2.2 - Celulose</b> .....	19
<b>2.2.3 - Hemicelulose e xilano</b> .....	21
<b>2.2.4 - Lignina</b> .....	26
<b>2.3 - XILANASE</b> .....	26
<b>2.3.1 - Classificação e funções das xilanases</b> .....	26
<b>2.3.2 - Regulação da síntese de xilanases</b> .....	30
<b>2.3.3 - Fatores que afetam a produção de xilanases</b> .....	33
2.3.3.1 - Substrato.....	34
2.3.3.2 - Efeito da adição de outras fontes de carbono ao substrato.....	40
2.3.3.3 - Tempo de cultivo.....	43
2.3.3.4 - Temperatura.....	44
2.3.3.5 - Concentração de esporos.....	45
2.3.3.6 - pH.....	46

<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 - MICRORGANISMOS.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 - COLETA DE MATERIAL.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.1 - Procedimentos para a coleta.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.2 - Parâmetros determinados durante as coletas de solo.....</b>	<b>49</b>
3.2.2.1 - Temperatura do ar (°C).....	49
3.2.2.2 - Temperatura do solo até 15 cm de profundidade (°C).....	49
3.2.2.3 - Teor de umidade (%) do solo.....	49
3.2.2.4 - Determinação do pH, matéria orgânica e macronutrientes do solo.....	50
<b>3.3 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DAS AMOSTRAS DE SOLO.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3.1 - Procedimentos para o isolamento.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3.2 - Quantificação do número total de colônias.....</b>	<b>51</b>
<b>3.3.3 - Identificação e manutenção dos fungos filamentosos isolados.....</b>	<b>51</b>
<b>3.4 - CULTIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....</b>	<b>52</b>
<b>3.4.1 - Seleção preliminar dos fungos produtores de xilanase.....</b>	<b>52</b>
<b>3.4.2 - Padronização do inóculo para cultura.....</b>	<b>52</b>
<b>3.4.3 - Avaliação de produção de biomassa de fungos filamentosos.....</b>	<b>52</b>
3.4.3.1 - Cultivo de fungos filamentosos pelo Método Turbidimétrico Automatizado - Labsystems Bioscreen C, em diferentes fontes de carbono.....	52
3.4.3.2 - Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus microsporus</i> pelo Método Tradicional em diferentes fontes de carbono.....	53
<b>3.4.4 - Cultivo de fungos filamentosos para avaliação da atividade enzimática.....</b>	<b>54</b>
3.4.4.1 - Cultivo dos fungos para produção de xilanase em meios sólidos	54
3.4.4.2 - Cultivo dos fungos para produção de xilanase em meio sólido e líquido acrescidos de outras fontes de carbono.....	54

3.4.4.3 - Cultivo de <i>Aspergillus japonicus</i> e <i>Trichoderma viride</i> em Meio Farelo de Trigo em diferentes temperaturas.....	55
3.4.4.4 - Cultivo de <i>Aspergillus japonicus</i> e <i>Trichoderma viride</i> em Meio Farelo de Trigo em diferentes períodos de incubação.....	55
3.4.4.5 - Cultivo de <i>Aspergillus japonicus</i> e <i>Trichoderma viride</i> em Meio Farelo de Trigo com diferentes concentrações de inoculo.....	56
<b>3.5 - OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.....</b>	<b>56</b>
<b>3.6 - DETERMINAÇÃO DAS CURVAS PADRÃO DE XILOSE.....</b>	<b>56</b>
<b>3.7 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE XILANASE.....</b>	<b>57</b>
<b>3.8 - UNIDADE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....</b>	<b>58</b>
<b>3.9 - DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS.....</b>	<b>59</b>
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1 - COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLO DE ÁREA DE CAATINGA E ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS AMBIENTAIS.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2 - SELEÇÃO PRELIMINAR DOS FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLO PRODUTORES DE XILANASE.....</b>	<b>67</b>
<b>4.3 - CULTIVOS PARA DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....</b>	<b>70</b>
<b>4.3.1 - Determinação da melhor fonte de carbono no crescimento dos fungos filamentosos da 1ª coleta, estudados através do Método Turbidimétrico Automatizado-Labsystems Bioscreem C.....</b>	<b>70</b>
<b>4.3.2 - Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> 9 e <i>Rhizopus microsporus</i> 12 em diferentes fontes de carbono pelo Método Turbidimétrico Automatizado (Bioscreen-C) e Método Tradicional.....</b>	<b>84</b>
<b>4.3.3 - Atividade de xilanase dos fungos filamentosos em meios sólidos sem adição de outras fontes de carbono, a 25°C e 35°C, pH 5,0, por cinco dias.....</b>	<b>86</b>

4.3.3.1 - Atividade xilanolítica dos fungos filamentosos isolados nas duas coletas em cultivos em meio farelo de trigo (MFT).....	86
4.3.3.2 - Atividade xilanolítica dos fungos que apresentaram melhor atividade em MFT, cultivados em meio farelo de soja (MFS)..	90
<b>4.3.4</b> - Atividade xilanolítica dos fungos filamentosos cultivados em MFT e Meio líquido de Vogel, adicionados individualmente de outras fontes de carbono, em temperaturas apropriadas.....	92
<b>4.4</b> - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE DE <i>Aspergillus japonicus</i> e <i>Trichoderma viride</i> .....	99
4.4.1 - Influência da Temperatura.....	99
4.4.2 - Efeito do tempo de cultivo na atividade enzimática.....	102
4.4.3 - Efeito da concentração do inóculo.....	104
<b>5 - CONCLUSÕES</b> .....	107
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	109



## RESUMO

Neste estudo, foram isoladas 67 linhagens de fungos filamentosos de solo de área de caatinga, sendo as coletas efetuadas em períodos seco e chuvoso, com o objetivo de se conhecer a biodiversidade deste bioma não explorado e avaliar o potencial destes fungos na produção de xilanase. Algumas linhagens não foram identificadas por inexistência de metodologias específicas e outras foram identificadas através de métodos microscópicos e bioquímicos. Foi efetuada uma triagem dos fungos potencialmente produtores desta enzima em meio de Vogel contendo xilano 1% como única fonte de carbono e avaliou-se através do Método Turbidimétrico Automatizado (Bioscreen-C), a melhor fonte de carbono para crescimento dos fungos selecionados. As linhagens foram avaliadas quanto à produção de xilanase em Meio Farelo de Trigo (MFT) e Meio Farelo de Soja (MFS), incubados a 25°C e 35°C, por 5 dias, pH 5 e inóculo na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos/mL. As melhores atividades xilanolíticas foram dos fungos isolados da estação seca, em MFT, a maioria a 35°C (*Aspergillus niger* 1, *Aspergillus niger* 5, *Aspergillus niger* 11, *Penicillium implicatum* 2, *Penicillium commune* 6, *Rhizopus microsporus* 12). Entretanto, as atividades das linhagens *Aspergillus japonicus* 8 (143,9 U/mL) e *Trichoderma viride* 13 (39,21 U/mL), que tiveram maior destaque, se deram a 25°C. Os resultados obtidos nos cultivos em MFS, foram inexpressivos quando comparados aos obtidos em MFT. Os melhores produtores de xilanase em MFT foram cultivados em meio líquido de Vogel e MFT com adição individual de outras fontes de carbono a 1% (carbometilcelulose- CMC, xilano e a melhor fonte de carbono para crescimento, determinada pelo Bioscreen-C) em temperaturas apropriadas, pH 5, por 5 dias, inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/mL. O CMC causou repressão catabólica na síntese de xilanase por estes fungos tendo a adição do xilano apresentado o mesmo efeito, com exceção de *Trichoderma viride*, que teve sua atividade aumentada para 143,0 U/mL e *Aspergillus niger* 11 que teve sua atividade aumentada de 33,4 U/mL para 57,1 U/mL. A adição individual da melhor fonte de carbono para crescimento também causou repressão catabólica, mas para *Trichoderma viride*, a adição de sorbitol (que foi o melhor açúcar para seu crescimento) elevou sua atividade para 169,0 U/mL. As linhagens *Aspergillus japonicus* cultivado em MFT a

25°C sem adição de nenhuma fonte de carbono e *Trichoderma viride* cultivado em MFT, a 25°C com adição de sorbitol 1%, tiveram sua atividade xilanolítica avaliada em diferentes temperaturas (20, 25, 35 e 45°C), em diferentes períodos de incubação (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas) e diferentes concentrações de inóculos ( $2 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  e  $4 \times 10^7$  esporos/ mL) com o objetivo de otimizar a produção. *Aspergillus japonicus* apresentou sua melhor atividade a 25°C, com período de incubação de 120 horas e inóculo na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos/ mL. *Trichoderma viride* apresentou sua melhor atividade a 25°C, com período de incubação de 144 horas e inóculo na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/ mL.

**Palavras-chave:** Xilanase, fungos filamentosos, caatinga, otimização

## ABSTRACT

In this study, 67 strains of filamentous fungi were isolated from caatinga area, the collections were performed during the dry and rainy period, aiming to know the biodiversity of this not explored bioma and to evaluate the potential of these fungi to produce xylanase. Some of the strains were not identified due to the lack of specific methodologies and others were identified through microscopic and biochemical methods. A selection of the fungi which were considered potentially producers of xylanase was carried out in Voguel medium containing 1% of xylan as an only carbon source, and through a Automatized Turbidimetric Method (Bioscreen – C) the best carbon source for the fungi growth was evaluated. The strains were evaluated regarding to xylanase production in Wheat Bran Medium (WBM) and Soybean Bran Medium (SBM) and incubated at 25°C and 35°C for 5 days, pH 5,0 and using a spore concentration of  $1 \times 10^7$  spores/mL. The best xylanolytic activities from the fungi isolated during the dry period, in WBM, mostly at 35°C: *Aspergillus niger* 1, *Aspergillus niger* 5, *Aspergillus niger* 11, *Penicillium implicatum* 2, *Penicillium commune* 6, *Rhizopus microsporus* 12. Notwithstanding, the strains of *Aspergillus japonicus* 8 (143,9 U/mL) and *Trichoderma viride* 13 (39,21 U/mL) showed the best activity at 25°C. The results obtained in SBM were not expressive when compared to the ones obtained in WBM. The best xylanase producers in WBM were cultivated in Voguel liquid medium and WBM adding individually other carbon sources at 1% (carboxymethylcellulose –CMC; xylan; and the best growth carbon source determined by Bioscreen-C) at appropriated temperatures, pH 5,0 ; for 5 days, and a spore concentration of  $1 \times 10^7$  spores/mL. The CMC addition caused catabolic repression in xylanase production by these fungi, xylan addition showed the same effect, but *Trichoderma viride* 13 and *Aspergillus niger* 11 which have their activities increased from 39,21 U/mL to 143,0 U/mL and from 33,4 U/mL to 57,1 U/mL, respectively. The addition of the best carbon source for growth also caused catabolic repression but for *Trichoderma viride*, the addition of sorbitol (which was the best grow sugar) increased its activity to 169,0 U/mL. The *Aspergillus* strains cultivated in WBM at 25°C without the addition of any carbon source and *Trichoderma viride* cultivated in WBM at

25°C with the addition of sorbitol 1% have their xylanolytic activities evaluated at different temperatures (20, 25, 35 e 45°C) and different cultivation periods (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 hours) different spore concentrations ( $2 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  e  $4 \times 10^7$  spores/ mL) aiming the enzyme production optimization. *Aspergillus japonicus* showed the best activity at 25°C, at 120 hours cultivation and a spore concentration of  $1 \times 10^7$  spores/ mL. *Trichoderma viride* showed the best activity at 25°C, at 144 hours cultivation and a spore concentration of  $2 \times 10^6$  spores/mL.

**KEYWORDS:** Xylanase, filamentous fungi, caatinga, optimization

## LISTA DE FIGURAS

Número	Página
1- Bioma Caatinga.....	09
2- Vegetação caatinga das áreas coletadas, dentro da Floresta Nacional Contendas do Sincorá, BA, Brasil. ....	10
3- Floresta Nacional Contendas do Sincorá (Parque Nacional), na Chapada Diamantina, Bahia.....	13
4- Figura esquemática da celulose (FOELKEL, 1977).....	20
5- Estrutura molecular da celulose.....	20
6- Figura esquemática das camadas da parede vegetal de plantas.....	21
7- Figura esquemática das ligações entre a hemicelulose, celulose e lignina.....	22
8- Estrutura molecular da Hemicelulose.....	23
9- Unidades de $\beta$ -D-xilopiranosose com ligações glicosídicas tipo 1,4.....	25
10- Estrutura generalizada da Lignina.....	26
11- Sítios de ação das endo- $\beta$ - 1,4 xilanases (EC 3.2.1.8).....	27
12- Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam.....	28
13- Umidade do solo no Brasil na camada superficial de 10 cm de espessura (GEVAERD, 2003).....	62
14- Curvas de crescimento de <i>Aspergillus niger</i> 1 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	70
15- Curvas de crescimento de <i>Penicillium implicatum</i> 2 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	71
16- Curvas de crescimento de <i>Aspergillus fumigatus</i> 3 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	71
17- Curvas de crescimento de <i>Aspergillus aculeatus</i> 4 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	72
18- Curvas de crescimento de <i>Aspergillus niger</i> 5 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	72

19-	Curvas de crescimento de <i>Penicillium commune</i> 6 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen ).....	73
20-	Curvas de crescimento de <i>Mucor circinelloides</i> 7 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	73
21-	Curvas de crescimento de <i>Aspergillus japonicus</i> 8 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	74
22-	Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> 9 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	74
23-	Curvas de crescimento de <i>Aspergillus niger</i> 10 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	75
24-	Curvas de crescimento de <i>Aspergillus niger</i> 11 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	75
25-	Curvas de crescimento de <i>Rhizopus microsporus</i> 12 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	76
26-	Curvas de crescimento de <i>Trichoderma viride</i> 13 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	76
27-	Curvas de crescimento de <i>Hyphomyceto sp</i> 14 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	77
28-	Curvas de crescimento de <i>Penicillium sp</i> 15 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	77
29-	Curvas de crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> 17 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	78
30-	Curvas de crescimento de <i>Cladosporium cladosporioides</i> 18 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)...	78
31-	Curvas de crescimento de <i>Humicola sp</i> 19 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	79
32-	Curvas de crescimento de <i>Aspergillus fumigatus</i> 20 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	79
33-	Curvas de crescimento de <i>Emericellopsis mínima</i> 22 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	80

34-	Curvas de crescimento de <i>Emericellopsis mínima</i> 26 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	80
35-	Curvas de crescimento de <i>Aspergillus fumigatus</i> 27 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	81
36-	Curvas de crescimento de <i>Mucor circinelloides f. janssenii</i> (Lendner) Schipper 31 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).....	81
37-	Curvas de crescimento de <i>Rhizopus microsporus</i> 12 com diferentes fontes de carbono pelo método tradicional.....	85
38-	Curvas de crescimento de <i>Rhizopus microsporus</i> 12 com diferentes fontes de carbono pelo método tradicional.....	85

## LISTA DE TABELAS

Número	Página
1- Área dos Biomas Nacionais.....	09
2- Unidades de Conservação Presentes na Bahia.....	12
3- Espécies de organismos e microrganismos conhecidos.....	14
4- Diversidade de microrganismos no Brasil.....	15
5- Número conhecido e estimado de espécies microbianas em relação a material depositado em coleções de culturas.....	16
6- Exemplos de aplicações de SSF utilizando diferentes substratos.....	36
7- Efeito da fonte de carbono para crescimento e produção de xilanases por <i>T. reesei</i> QM9414, avaliado por outros autores.....	40
8- Efeito de diversos açúcares no crescimento e produção de xilanase por <i>T. lanuginosus</i> DSM 5826 (PURKARTHOFER & STEINER, 1995).....	41
9- Tempos de cultivo para produção máxima de xilanases citadas por diversos autores para diversos fungos.....	44
10- Temperaturas ótimas para produção de xilanases citadas por diversos autores para diversos fungos.....	45
11- Concentrações de esporos citadas por diversos autores para produção máxima de xilanase por diversos fungos.....	46
12- pHs ótimos para produção de xilanases por diversos fungos citados por diversos autores.....	47
13- Volumes das soluções utilizadas para determinação das atividades enzimáticas por tubo de reação.....	57
14- Temperatura do ar, solo, pH e percentual de umidade da Caatinga.....	61
15- Análise química do solo da Caatinga.....	61
16- Média das UFCs obtidas em cultivos de solo em diferentes meios, a 35°C e 45°C, em pH 5,0 e pH 7,0.....	64
17- Linhagens de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga nos períodos seco (1ª coleta) e chuvoso (2ª coleta).....	66



18-	Seleção preliminar dos fungos produtores de xilanase cultivados em meio sólido de Vogel acrescido de xilano 1%, a 25° C e 35° C, pH 5, 0, por 5 dias.....	69
19-	Resumo da melhor fonte de carbono para crescimento dos fungos isolados, determinada pelo Bioscreen-C.....	82
20-	Atividade de xilanase dos fungos da 1ª coleta em MFT a 25°C e 35°C, pH 5,0, inóculo $1 \times 10^7$ esporos/ mL, por 5 dias.....	87
21-	Atividade de xilanase dos fungos da 2ª coleta em MFT a 25°C e 35°C, pH 5,0, inóculo $1 \times 10^7$ esporos/ mL, por 5 dias.....	88
22-	Atividade de xilanase dos fungos em MFS, pH 5,0, inóculo $1 \times 10^7$ esporos/ mL, por cinco dias.....	90
23-	Produção de diversas enzimas por fungos filamentosos utilizando farelo de trigo como substrato.....	91
24-	Atividade da xilanase dos fungos em MFT acrescidos individualmente da melhor fonte de carbono determinada pelo Bioscreen C, de xilano e carbometilcelulose 1% (v/w), pH 5,0, por cinco dias, inóculo de $1 \times 10^7$ esporos/ mL.....	94
25-	Atividade de xilanase dos fungos em meio de Vogel acrescido individualmente da melhor fonte de carbono, de xilano e carbometilcelulose a 1%, em temperaturas apropriadas, pH 5,0, inóculo $1 \times 10^7$ esporos/ mL, por cinco dias.....	98
26-	Atividade de xilanase de <i>Aspergillus japonicus</i> em MFT, pH 5,0 por 120 h, inóculo de $1 \times 10^7$ esporos/ mL, em diferentes temperaturas.....	99
27-	Atividade de xilanase de <i>Trichoderma viride</i> em MFT, pH 5,0 por 120 h, inóculo de $1 \times 10^7$ esporos/ mL, em diferentes temperaturas.....	99
28-	Temperaturas ótimas para produção de xilanase por fungos filamentosos citadas por diversos autores.....	101
29-	Atividade de xilanase de <i>Aspergillus japonicus</i> em MFT, pH 5,0, a 25°C, inóculo de $1 \times 10^7$ esporos/ mL, em diferentes períodos de incubação.....	102

30-	Atividade de xilanase de <i>Trichoderma viride</i> em MFT adicionado de sorbitol 1%, pH 5,0, a 25°C, inóculo $1 \times 10^7$ esporos/ mL, em diferentes períodos de incubação.....	103
31-	Atividade de xilanase de <i>Aspergillus japonicus</i> em MFT, pH 5,0, por 120 h, a 25°C, com diferentes concentrações de esporos.....	104
32-	Atividade de xilanase de <i>Trichoderma viride</i> em MFT adicionado de sorbitol 1% , pH 5,0, por 144 h, a 25°C, com diferentes concentrações de esporos.....	105

## 1 - INTRODUÇÃO

A biotecnologia industrial é uma área em rápido desenvolvimento, que está sendo chamada de terceira onda da biotecnologia. Depois das aplicações farmacêuticas e agrícolas da biotecnologia, também chamadas de biotecnologias “vermelha” e “verde”, surge agora a biotecnologia “branca”, com um grande potencial para o futuro. A biotecnologia branca poderá desempenhar um papel vital ao promover processos industriais mais limpos, por exemplo, reduzindo a poluição e o consumo de matérias-primas.

Quando desenvolvida a seu potencial pleno, a biotecnologia industrial poderá ter um impacto maior sobre o mundo do que a biotecnologia da saúde humana ou da agricultura. Ela oferece à indústria uma forma de reduzir custos e criar novos mercados, ao mesmo tempo em que protege o meio ambiente (BOLLIER; GENENCO, 2005).

A obtenção de enzimas é um dos principais exemplos de processos biotecnológicos industriais, em amplo desenvolvimento. Na maioria dos casos, as que são produzidas comercialmente pelas grandes indústrias da área, são de origem microbiana, devida principalmente à maior diversidade de enzimas que são possíveis de se obter pelos microrganismos, às dificuldades operacionais e econômicas existentes

nos processos de extração de tecidos animais e vegetais e o fato que a condução dos processos pode ser controlada, de forma a se atender as necessidades do mercado.

Elas constituem o grupo mais importante de metabólitos microbianos e de diversificada utilização na indústria de alimentos, prevendo-se para 2006 um valor no mercado internacional da ordem de US\$ 214 milhões. Apesar de centenas de enzimas já terem sido descritas e estudadas, passíveis de utilização na indústria de alimentos, menos de 50 foram aceitas para uso efetivo em alimentos, por exemplo, e, aproximadamente, 30 são empregadas industrialmente, devido ao alto custo de desenvolvimento, patenteamento e aprovação (LERAYER, 2006).

As enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, destacando-se as indústrias de alimentos e bebidas, têxtil e farmacêutica, devendo-se isto, principalmente, a algumas vantagens operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão, com pouca formação de metabólitos secundários além de acontecerem em condições brandas de temperatura e pH, o que significa, para as indústrias, uma redução nos custos operacionais.

É importante destacar ainda que, como a poluição ambiental é uma consequência direta do desenvolvimento tecnológico, a implementação de tecnologias, fazendo uso de materiais renováveis, e adequadas, sob o ponto de vista energético e de preservação do meio ambiente, é uma necessidade que se faz presente em todos os segmentos industriais. Durante os últimos anos, tem crescido o interesse em enzimas hemicelulolíticas, principalmente devido ao surgimento de novas aplicações para as mesmas. As hemicelulases, entre as quais as xilanases, estão entre as mais promissoras.

As xilanases catalisam a hidrólise do xilano, o maior componente da hemicelulose, presente na parede das células vegetais. A estrutura do xilano, entretanto, pode diferir grandemente dependendo de sua origem (HUISMAN et al., 2000). Basicamente, a estrutura do xilano consiste de unidades de D – xilopiranosose, conectadas por ligações  $\beta$ -1, 4, que se podem apresentar sob forma linear ou ramificada (BASTAWDE et al., 1992). A completa e eficiente hidrólise enzimática deste polímero complexo depende principalmente de duas classes de enzimas, as endo-1,4-  $\beta$ -xilanases (1,4-  $\beta$ -D xilohidrolase; EC 3.2.1.8), que hidrolisam as unidades de xilanopiranosose da cadeia central e as  $\beta$ -xilosidases (1,4-  $\beta$ -D-xilano xylohidrolase; EC 3.2.1.37), que hidrolisam a xelobiose e outros xilooligossacarídeos resultantes da ação das

endoxilanases. Outras enzimas, as acetilxilano esterases,  $\alpha$ -glucuronidase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidade, atuam em sinergia com as xilanases degradando grupos específicos (BEG et al., 2001).

É crescente o interesse em seu uso nas indústrias de papel e celulose, um dos setores produtivos com maior movimentação econômica a nível mundial. As xilanases são as enzimas mais estudadas para utilização no branqueamento de polpas de celulose, onde o emprego das enzimas do complexo xilanolítico, nesta etapa do processo, leva às reduções significativas na utilização dos produtos organoclorados, que são altamente poluentes e conferem às indústrias de celulose a condição de serem uma das mais poluidoras, dentre todo o seguimento industrial.

Assim, para atender à demanda da indústria, as enzimas que são produzidas naturalmente por microrganismos, porém em baixa quantidade, precisam ser otimizadas tanto pelo processo fermentativo como pela engenharia genética e de proteínas além da necessidade de se buscar microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos. O desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias para produção das xilanases, visando aumento de produtividade, aumento da escala de produção e redução dos custos de obtenção representa, portanto, um alvo de investigação científica altamente relevante nos tempos atuais tendo em vista os impactos ambientais e econômicos gerados pela aplicação dos resultados obtidos por este tipo de trabalho.

A produção das xilanases, por processo biológico, pode acontecer por cultivos submersos sendo dada, no entanto, muita atenção, mais recentemente, à sua obtenção fazendo uso dos cultivos em estado sólido, que apresentam uma série de características favoráveis, quando comparados aos cultivos submersos. Destaque especial deve ser feito à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais e de exploração florestal, como fonte de nutrientes nestes processos, na sua forma natural, o que confere ao microrganismo um ambiente favorável à produção dos metabólitos de interesse, como as xilanases, que, por esta razão, são produzidas com características bioquímicas mais adequadas à aplicação industrial. Os processos de cultivo em estado sólido, no entanto, apresentam algumas dificuldades tecnológicas, principalmente, no que diz respeito ao controle do crescimento microbiano, que precisam ser superadas ou, pelo menos, minimizadas, para que estes possam ser analisados cineticamente e levados, assim, a uma escala maior de produção.

A atividade metabólica microbiana e a produção de enzimas são extremamente afetadas por fatores ambientais, como pH, tempo de cultivo, temperatura de incubação, concentração do inoculo e principalmente pelo substrato utilizado (FADEL, 2000). A escolha deste último deve ser apropriada para o sucesso na produção de xilanases, pois este não somente serve como fonte de carbono e energia, mas também provê os compostos de indução necessários para o organismo produzir a enzima (HALTRICH et al., 1996).

A expressão das xilanases em fungos é sujeita a regulação por repressão catabólica, sendo relatados os efeitos negativos na produção, causados pelo acúmulo de açúcares redutores em culturas submersas (SMF) (FADEL, 2000). Por outro lado, tem sido descrita a habilidade dos sistemas de fermentação sólida apresentar resistência à repressão catabólica para a produção de diferentes enzimas hidrolíticas, principalmente quando o substrato utilizado é o farelo de trigo (RAMESH; LONSANE, 1991). O farelo de soja foi avaliado neste trabalho, como substrato em SSF, por ser um resíduo rico em hemicelulose e celulose, e por ser gerado em grande escala, devido às vastas plantações de soja existentes no Brasil.

A glicose é uma das fontes de carbono mais adequada praticamente para todos os bolores, mas outros açúcares podem ser utilizados, como a sacarose, lactose, maltose, assim como também compostos orgânicos mais complexos. Existe, portanto, um grande número de variáveis que afetam a produção de compostos por fungos, dentre elas destaca-se a composição do meio de cultura utilizado (SKOWRONEK; FIEDUREK, 2004).

Neste presente trabalho, foi utilizado um sistema automatizado de crescimento microbiano (Bioscreen C-Labsystems, Helsinki, Finlândia) para avaliar os efeitos de diversos açúcares no crescimento e produção de biomassa de fungos filamentosos e consequentemente na produção de xilanase. Este equipamento tem sido usado para muitas aplicações em microbiologia, na qualidade de controle (MATTILA et al., 1988; JOHNSTON, 1998), em pesquisas gerais (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000), em efeitos de compostos químicos no crescimento de microrganismos (LISOWSKA et al., 2004), e outras aplicações. O “software” converte cineticamente medidas da absorbância em curvas de crescimento e constrói gráficos com calibrações adequadas. As placas e

amostras são esterilizadas e podem ser utilizadas 200 amostras por teste, possibilitando replicações adequadas.

A produção de xilanases por microrganismos estende-se à utilização principalmente, de bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos acerca da utilização de leveduras (HALTRICH et al., 1996), que são citadas para produção de outras enzimas, como por exemplo, a invertase (BOFO et al., 2005).

Via de regra, os fungos sintetizam enzimas mais ativas em pH baixo que, sob o ponto de vista industrial, tornam-se particularmente interessantes, uma vez que podem produzir xilanases extracelulares. Os extratos enzimáticos, obtidos destas culturas, possuem, geralmente, maior atividade do que aqueles provenientes do cultivo de bactérias. Além disto, os fungos possuem a capacidade de produzir diferentes enzimas do complexo xilanolítico, o que permite hidrolisar, não somente a cadeia principal do xilano, mas também, as suas ramificações (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI; SHENDYE, 1999).

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, das quais pouco mais de 5% são atualmente conhecidas (HAWKSWORTH 1991, 1995). Kirk et al. (2001) calcularam que aproximadamente 80 mil espécies foram descritas nos diversos grupos de fungos, a saber: Ascomycota (32.739), Basidiomycota (29.914), Chytridiomycota (914), Glomeromycota (189), Zygomycota (890) e fungos anamórficos (15.945). Comparando-se com a percentagem (70 a 95%) das espécies de plantas vasculares descritas, a proporção de fungos conhecidos é irrisória. A micota dos Neotrópicos, segundo estimativa recente, está representada por 550.000 fungos e 13.500 líquens (<http://sciweb.nybg.org>).

Uma dificuldade a considerar, é o grande número de espécies “órfãs”, ou seja, coletadas, porém não identificadas nem devidamente registradas em micotecas (HAWKSWORTH, 1997) e que a estimativa de 1,5 milhões de espécies seja conservadora, se for levado em conta: a) o número de espécies de plantas vasculares descritas e o número de fungos a elas associados, como sapróbios, parasitas ou simbiontes; b) o número de fungos que estabelecem algum tipo de relação com cerca de três milhões de espécies de insetos; c) os fungos que se encontram em regiões geográficas inexploradas; d) o número de espécies nas regiões tropicais, que deve ser

bem mais elevado do que nas regiões temperadas, com base nas quais foram feitas as estimativas.

Decorrente destas considerações sobre o bioma Caatinga, ele se torna particularmente interessante para pesquisa de espécies fúngicas do ponto de vista biotecnológico. A região semi-árida do Brasil ocupa cerca de 800.000 km<sup>2</sup>, totalizando 11% do território nacional, incluindo parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais. A vegetação típica é a caatinga, bioma único no mundo, caracterizado pela formação de floresta seca composta de vegetação xerófila de porte arbóreo, arbustivo e herbáceo, com ampla variação de fisionomia e flora e elevada diversidade de espécies, (DRUMOND et al., 2000).

Os microrganismos utilizados neste presente estudo foram isolados de solo de área de caatinga, especificamente na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, uma das Unidades de Conservação do bioma caatinga da Chapada Diamantina, localizada na parte centro-sul do bioma, alongada no sentido N-S em forma de "Y", seguindo o alinhamento do divisor de águas da Chapada Diamantina. É inteiramente circundada pela ecorregião da Depressão Sertaneja Meridional. Os limites são explicados principalmente pelas mudanças de relevo, altitude e tipo de solo. É a parte mais alta do bioma Caatinga (<http://www.plantasdonordeste.org/Livro/diamantina.htm> - Consultado em 21/09/2005).

A caatinga encontra-se hoje em acentuado processo de desertificação, ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais (DRUMOND et al., 2000). A desertificação resulta na redução de produção vegetal, acarretando mudanças nas interações que ocorrem no solo, com a conseqüente e muitas vezes irreversível perda da biodiversidade (SKUJINS; ALLEN, 1986).

Apesar de diversos estudos quanto ao potencial biotecnológico dos fungos filamentosos já terem sido realizados em solos brasileiros, ainda são poucos, principalmente em áreas de caatinga, que junto a outras foi considerada como Reserva da Biosfera, Patrimônio Ambiental de todos os povos, pela Organização das Nações Unidas para a Educação, na tentativa de se conter o desmatamento, favorecer o levantamento da biodiversidade existente e estabelecer planos de manejo para a região.



## OBJETIVOS

Assim, o presente trabalho teve como **objetivo geral**:

- Buscar as linhagens de fungos existentes em solo de área de caatinga não manejada, isolá-las e identificá-las;
- Efetuar o levantamento de alguns fatores abióticos em que estas espécies se desenvolvem;
- Estudar o potencial biotecnológico das principais espécies em produzir a enzima xilanase.

Para que o objetivo principal fosse alcançado, os seguintes **objetivos específicos** foram cumpridos:

- Coleta de solo em área de caatinga, em épocas de chuva e seca;
- Determinação das temperaturas do ar e do solo no decorrer das coletas;
- Isolamento dos fungos filamentosos existentes de 0-15 cm de profundidade do solo em diferentes meios de cultura e condições de cultivo, na tentativa de se obter maior diversidade possível;
- Caracterização do solo quanto aos aspectos químicos e físico-químicos;
- Identificação das principais linhagens isoladas até o nível de espécies e contribuir para elaborar um banco de dados das espécies indígenas de fungos filamentosos que ocorrem no ecossistema caatinga - Bahia.
- Determinação da melhor fonte de carbono e temperatura para crescimento de cada linhagem através de Cultivo Automatizado (Bioscreen-C)
- Cultivo das linhagens em frascos com meios de cultura (sólido e líquido), sem e com a adição de outras fontes de carbono, em diversas temperaturas, tempos de cultivo e concentrações de inóculo, para determinação das melhores condições para se obter a máxima produção de xilanase.

## **2 - REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 – CAATINGA**

#### **2.1.1 - Caracterização da caatinga**

A palavra caatinga é de origem tupi-guarani e significa mata branca ou clara, fazendo referência ao fato de apresentar, na estação seca, árvores com caules esbranquiçados que, na ausência de folhas, dão o tom claro àquela região. O bioma caatinga ocupa cerca de 800.000 km<sup>2</sup> (Figura 1), totalizando 9,92% do território nacional (Tabela 1), incluindo parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais. A vegetação típica do bioma é a caatinga, bioma único no mundo, caracterizado pela formação de floresta seca composta de vegetação xerófila de porte arbóreo, arbustivo e herbáceo, com ampla variação de fisionomia e flora e elevada diversidade de espécies (Figura 2), (DRUMOND et al., 2000).



**Figura 1** – Mapa do Brasil mostrando os vários Biomas, dentre eles, o Bioma Caatinga (Disponível em: <http://www.bv.am.gov.br>).

**Tabela 1** – Áreas dos Biomas Nacionais (Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>).

<b>BIOMAS CONTINENTAIS BRASILEIROS</b>	<b>ÁREA APROXIMADA (KM2)</b>	<b>ÁREA / TOTAL BRASIL</b>
Bioma AMAZONIA	4.196.943	49,29%
Bioma CERRADO	2.036.448	23,92%
Bioma MATA ATLANTICA	1.110.182	13,04%
Bioma CAATINGA	844.453	9,92%
Bioma PAMPA	176.496	2,07%
Bioma PANTANAL	150.355	1,76%
Area Total BRASIL	8.514.877	



**Figura 2** - Vegetação caatinga na área de coletas, dentro da Floresta Nacional Contendas do Sincorá, BA, Brasil.

O clima constitui a característica mais importante do semi-árido brasileiro, principalmente devido à ocorrência das secas estacionais e periódicas. Nesta região prevalece o clima semi-árido, com duas estações bem distintas: uma curta estação chuvosa, de 3 a 5 meses de duração, que ocorre nos meses de janeiro a maio, e uma longa estação seca, de 7 a 9 meses, que ocorre nos meses de junho a dezembro. Caracterizado pelo elevado potencial de evapotranspiração ( $2.000 \text{ mm}\cdot\text{ano}^{-1}$ ), precipitação média anual de 700mm (mínima de 300 e máxima de 1.000 mm), (SAMPAIO, 1995). Ao se analisar os recursos hídricos, aproximadamente 50% das terras recobertas com a caatinga são de origem sedimentar, ricas em águas subterrâneas.

Os rios, em sua maioria, são intermitentes e o volume de água, em geral, são limitados, sendo insuficiente para a irrigação. A altitude da região varia de 0-600m e é

considerada uma das regiões mais quentes do planeta com luminosidade elevada, ficando ao redor de 2.800 horas de luz solar por ano (SEMACE, 1997).

A caatinga carece de planejamento estratégico permanente e dinâmico com o qual se pretende evitar a perda da biodiversidade do seu bioma uma vez que já possui extensas áreas degradadas, incorrendo muitas delas em risco de desertificação (CAUSAY et al., 2004). A caatinga encontra-se hoje em acentuado processo de desertificação, ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais (DRUMOND et al., 2000). A desertificação resulta na redução de produção vegetal, acarretando mudanças nas interações que ocorrem no solo, com conseqüente e muitas vezes irreversível perda da biodiversidade (SKUJINS; ALLEN, 1986).

Por causa da extensão territorial da região e visando uma melhor compreensão da área, foram criadas as unidades Geoambientais, as "UGs", que foram agrupadas em unidades maiores. Para isso, a região foi dividida em Grandes Unidades de Paisagem, baseando-se nas características, morfoestruturais e/ou geomorfológicas e geográficas, tradicionalmente utilizadas. Na denominação dessas unidades, procurou-se usar nomes já consagrados, que expressam o ambiente de maneira simples e objetiva, como, por exemplo: Depressão Sertaneja, Chapadas Altas, Chapada Diamantina, Tabuleiros Litorâneos e outros. Dessa divisão resultaram 20 Grandes Unidades de Paisagem, as quais englobam 172 "Ugs".

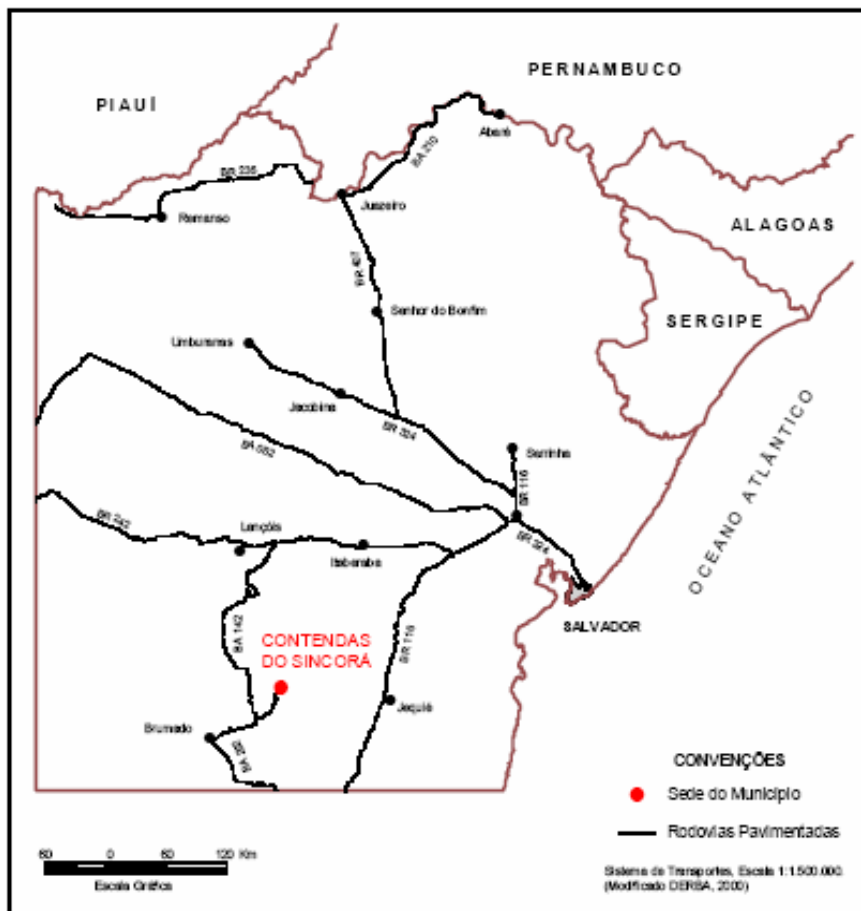
Nestas unidades, foram determinadas unidades de conservação, entre elas as Florestas Nacionais (FLONA). As FLONAs são áreas de posse e domínio públicos, provida de cobertura vegetal nativa ou mesmo plantada, estabelecida com objetivos de promover o manejo dos recursos naturais, com ênfase na produção de madeira e outros produtos vegetais, garantir a proteção dos recursos hídricos, das belezas cênicas e dos sítios históricos e arqueológicos, assim como fomentar o desenvolvimento da pesquisa científica básica e aplicada, da educação ambiental e das atividades de recreação, lazer e turismo, sendo considerada uma unidade de conservação do Brasil e protegida pela Lei de Crimes Ambientais. As três unidades de conservação na Bahia, situadas em área de caatinga estão apresentadas na (Tabela 2).

**Tabela 2 - Unidades de Conservação Presentes na Bahia**

UC	Tamanho	Localização	Observações
Parque Nacional da Chapada Diamantina	152.000ha	Região central da BA.	Não tem plano de manejo, e contém quase exclusivamente vegetação de campos rupestres.
Parque Estadual Morro do Chapéu	6.000ha	Morro do Chapéu, BA	
FLONA Contendas do Sincorá	11.034ha	Contendas do Sincorá e Barra da Estiva, BA	Parte na ecorregião da Depressão Sertaneja Meridional.

Fonte: ECORREGIÕES PROPOSTAS PARA O BIOMA CAATINGA, Resultados do Seminário de Planejamento Ecorregional da Caatinga, 1ª Etapa - 28 a 30 de Novembro de 2001 - Aldeia, PE. Disponível em: <http://www.plantasdonordeste.org>

Foi na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (Figura 3), uma das unidades de uso sustentável existentes na Chapada Diamantina, que se deram as coletas das amostras de solo para o presente trabalho. A Floresta Nacional Contendas do Sincorá possui área total aproximada de onze mil, trinta e quatro hectares e trinta ares, localizada no Município de Contendas do Sincorá, Comarca de Ituaçu, Estado da Bahia. É administrada pelo IBAMA, de acordo com o Regulamento das Florestas Nacionais (DECRETO nº. 1.298, 1994- <http://www.cprh.pe.gov.br>).



**Figura 3** - Floresta Nacional Contendas do Sincorá (Parque Nacional), na Chapada Diamantina, BA, Brasil (Disponível em: <http://www.cprm.gov.br>)

### **2.1.2 - Biodiversidade e Biotecnologia**

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana incluem, entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por exemplo, as plantas e animais. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos.

A diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos, sendo que a participação dos produtos oriundos das atividades microbianas no mercado global pode atingir de US\$ 35 a 40 bilhões ao ano. Entretanto, pode-se afirmar que esta exploração ainda é incipiente (GRANDI, 1999).

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos bio-geoquímicos (MEYERS, 1996) e apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (STALEY, 1998). Conhecemos mais de 80% das plantas e mais de 90% dos vertebrados existentes na natureza, enquanto que conhecemos menos de 1% das bactérias e vírus, e menos que 5% dos fungos (Tabela 3). Embora sejam menos estudados, muitos grupos de microrganismos são essenciais para a sobrevivência das formas de vida na terra (HAMMOND, 1995).

**Tabela 3** - Espécies de organismos e microrganismos conhecidos

(Disponível em: [www.iea.usp.br](http://www.iea.usp.br))

Grupo <sup>b</sup>	Número de espécies conhecido	Número estimado de espécies	No. conhecido como % do no. estimado
<b>Plantas</b>			
Algas	40.000	60.000	67
Dicotiledôneas	170.000		
Pteridófitas	10.000		
Monocotiledôneas	50.000		
Musgos	17.000	25.000	68
<b>Animais</b>			
Pássaros	9.000	9.100	quase 100
Peixes	19.000	21.000	90
Insetos	800.000	2.000.000 a 80.000.000	1 a 40
		ou	ou
		5.000.000 a 10.000.000 <sup>c</sup>	8 a 16
Mamíferos	4.000	4.000	quase 100
Nematóides	15.000	500.000	3
Répteis e anfíbios	9.000	9.500	95
<b>Microrganismos</b>			
Fungos	69.000	1.500.000	5
Procariotos <sup>d</sup>	4.760	40.000 a 3.500.000	0.1 a 12
Protozoários	30.800	100.000	31
Vírus	5.000	130.000	4



Segundo estudos efetuados pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA (Secretaria de Biodiversidade e Florestas – SBF, Diretoria de Conservação da Biodiversidade – DCBio) sobre o estado atual de conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil, estima-se que a diversidade taxonômica de gêneros/espécies de microrganismos no Brasil é muito limitada, conforme é demonstrado na tabela 4 e apesar do volume de informações disponíveis na literatura serem abrangentes, este grupo de microrganismos apresenta uma grande diversidade de espécies e diversidade genética ainda por ser estudada.

**Tabela 4** - Diversidade de microrganismos no Brasil (Disponível em: [www.iea.usp.br](http://www.iea.usp.br))

Grupo taxonômico	Nº de espécies conhecidas no mundo	Nº de espécies conhecidas no Brasil
Filo Ascomycota: Classe Ascomycetes: 46 ordens	32.000	N.d
Filo Zygomycota: Classe Zygomycetes: 7 ordens 125 gêneros	867	162
Classe Trichomycetes: 4 ordens 48 gêneros	189	N.d
Filo Deutromycota: Classes Hyphomycetes, Coelomycetes Agomycetes (2.600 gêneros)	15.000	N.d
Filo Chytridiomycota	793	93

Apesar de existirem coleções de culturas nacionais, poucas possuem os dados informatizados e/ou disponíveis na Internet (Tabela 5). A ausência de dados sobre a diversidade de microrganismos no Brasil é marcante e revela o descaso e a falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana, tanto por falta de pesquisadores como pelo desconhecimento de sua importância por parte dos órgãos governamentais. (GRANDI et al., 1999).

**Tabela 5** - Número conhecido e estimado de espécies microbianas em relação a material depositado em coleções de culturas (Disponível em: [www.iea.usp.br](http://www.iea.usp.br))

Grupo <sup>b</sup>	Número de espécies		Material disponível em coleções de culturas		
	Conhecido	Estimado	Total por grupo	% do número de espécies conhecidas	% do número estimado de espécies
Algas	40.000	60.000	1.60	4.0	2.6
Bactérias	4.760	30.000	2.30	48.3	7.7
Fungos	69.000	1.500	11.50	16.7	0.8
Vírus	5.000	130.000	2.20	44.0	1.7

<sup>a</sup>Modificado a partir de Nisbet e Fox (1991). <sup>b</sup>Nomes dos grupos refletem definições coloquiais e não são empregados no sentido taxonômico formal.

Segundo Bull et al. (2000), a biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do(s) melhor (es) candidato(s) a partir de uma lista reduzida de opções e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL et al., 2000). Inventários de diversidade taxonômica determinam, portanto, a extensão da diversidade de organismos presente na amostra e como tal potencial pode ser explorado.

Como ecossistemas apresentam condições diversas que irão selecionar os grupos de organismos do solo que melhor se adaptem (GRISI; GRAY, 1986), espera-se que os microrganismos adaptados às condições inóspitas do bioma caatinga, sejam interessantes nos processos biotecnológicos industriais.

Alguns mitos, entretanto, foram criados em torno da biodiversidade da caatinga: o primeiro diz que ela é homogênea, o segundo que sua biota é pobre em espécies e em endemismos, o terceiro é que está pouco alterada pelas ações antrópicas e o quarto diz que a caatinga é um bioma marginal. Tais mitos, entretanto, estão hoje superados, pois a caatinga é bastante heterogênea, onde encontramos centenas de diferentes tipos de

paisagens únicas, detectamos sua grande biodiversidade, de endemismo reconhecido e está entre os biomas brasileiros como o mais degradado pelo homem. Assim, detecta-se, o estigma que sofre o bioma, historicamente por ser considerado pobre em todos os sentidos, levando sua desvalorização tanto por parte da população, comunidade científicas e ambientalistas, como por parte dos governantes locais e nacionais. Este fato é agravado pela enorme carência de conhecimento técnico científico sobre o bioma de modo geral e sobre seu valor biológico, paisagístico e aproveitamento econômico sustentável da sua biodiversidade, ofuscando as riquezas que realmente apresenta (CASTRO et al., 2003)

O conceito de biodiversidade envolve tanto uma dimensão quantitativa, número e variedade de genes, espécies e ecossistemas, quanto à dimensão qualitativa, isto é, a "saúde" das realidades biológicas e dos ambientes onde ocorrem. A biodiversidade, na verdade, é um termo utilizado para definir o grau de variedade na natureza, incluindo tanto o número quanto a frequência de genes, espécies e ecossistemas em determinada região. É normalmente considerada em três níveis diferentes: diversidade genética, diversidade de espécies e diversidade de ecossistemas. A biodiversidade corresponde à "variedade e variabilidade entre os organismos vivos e complexos ecológicos em que ocorrem. O termo engloba diferentes ecossistemas, espécies, genes e suas abundâncias seletivas" (BORGES et al., 2003).

Desta forma, torna-se evidente e urgente o conhecimento da flora, fauna, solo e clima com informações fundamentais para o desenvolvimento de quaisquer estratégias de ações, evidenciando o valor da biodiversidade, que venham a contribuir para um melhor planejamento de manejo, usos e enriquecimento da caatinga.

Assim se devem incrementar as ações de pesquisas relacionadas ao impacto ambiental no semi-árido brasileiro, principalmente, relativo às áreas de mineração, manejo e conservação do solo e água, manejo de solos salinos e alcalinos, manejo de bacias hidrográficas, manejo florestal e a conservação da biodiversidade. Para isto uma das necessidades é a ampliação da base genética das espécies através da prática de reflorestamento e criação de bancos de dados referentes ao tema, a fim de centralizar fonte de tecnologias e facilitar o repasse desses conhecimentos. Destaca-se aqui que a biodiversidade não deve ser abordada e restrita somente aos dois reinos, vegetal e

animal, existindo outros três de igual importância devido a suas aplicabilidades tecnológicas e ao banco genético que proporcionam, dentre eles, o Reino Fungi.

## **2.2 - COMPOSIÇÃO DAS PAREDES CELULARES DAS PLANTAS**

### **2.2.1 - Principais Componentes da Parede Celular Vegetal**

A biomassa vegetal é formada basicamente de celulose, hemicelulose e lignina e constitui o único recurso natural que poderá sustentar a demanda do mercado mundial de produtos bioquímicos e químicos por ter um ciclo de reposição suficientemente rápido (GOHEEN, 1981). A degradação microbiológica da celulose representa a maior fonte de carbono para o solo, considerando-se que é dos polímeros naturais, o mais abundante do planeta, apresentando uma quantidade global estimada em  $26,5 \times 10^{10}$  ton. /ano (TEUNISSEN; CAMP, 1993).

Os modelos mais recentes de parede celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993; MCCANN; ROBERTS, 1991), propõem que esta seja formada de três domínios independentes (celulose, hemicelulose, pectinas e proteínas). Nestes modelos os três domínios formam um compósito com características semelhantes a um cristal líquido (ROLAND et al., 1992). Segundo Coscrove (2000) têm sido propostos três modelos para a estrutura da parede primária no que se refere à interação celulose-hemicelulose.

O primeiro modelo considera que hemiceluloses, como o xiloglucano, recobre a superfície da celulose conectando diretamente várias microfibrilas entre si. As pectinas formariam uma matriz, onde os xiloglucanos e a celulose estariam mergulhados.

O segundo modelo considera que as hemiceluloses, revestem a celulose, mas não unem as microfibrilas. Segundo estes modelos existiriam duas camadas de hemicelulose: uma interna formada por hemicelulose como o xiloglucano que se liga fortemente à celulose e uma externa, que recobre a interna. O conjunto formado pelas microfibrilas e pelas camadas de hemicelulose estaria mergulhado na matriz de pectina. Nesse modelo, as microfibrilas seriam mantidas juntas somente por forças coesivas entre sucessivas camadas de hemicelulose lateralmente associadas.

O terceiro modelo, chamado estratificado, considera que as microfibrilas de celulose estariam conectadas por xiloglucanos formando lamelas, que não teriam

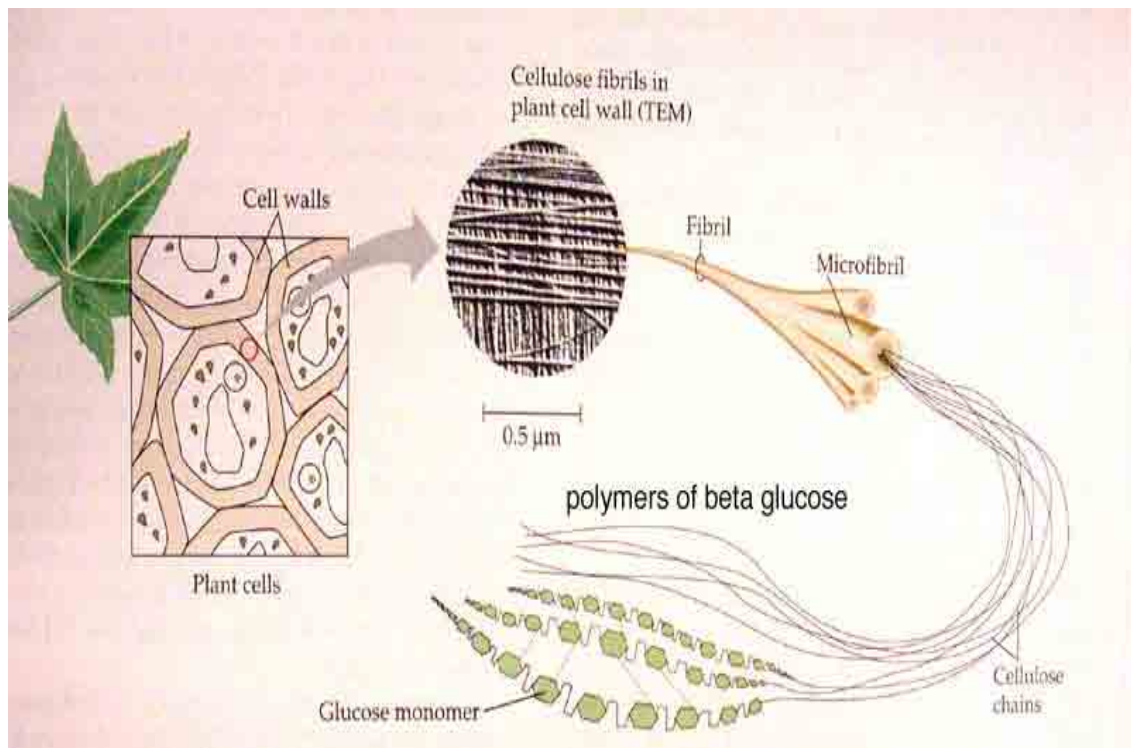
conexão direta entre si, e o espaço entre as lamelas seria preenchido por uma camada de pectina.

Entre 50% e 80% da matéria seca dos vegetais é carboidrato, enquanto os microrganismos contêm até 60% de C orgânico. A quantidade e proporção deste elemento na célula, nos tecidos ou organismos inteiros são determinadas pelas espécies e idade dos indivíduos. Por exemplo, embora os carboidratos solúveis em água possam predominar em plantas jovens, as maduras têm maior porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina. De modo geral, a matéria orgânica vegetal é constituída de celulose, compreendendo 40% a 60% do lenho maduro, 10% das folhas, 30% a 40% do caule e 90% das fibras de algodão; hemicelulose, grupo diverso de polissacarídeos solúveis em álcalis, intimamente associados à celulose; substâncias pécticas, polissacarídeos estruturais e lignina, importante composto de carbono constituinte de plantas vasculares, participando com 15% a 34% da madeira (TAUK, 1990).

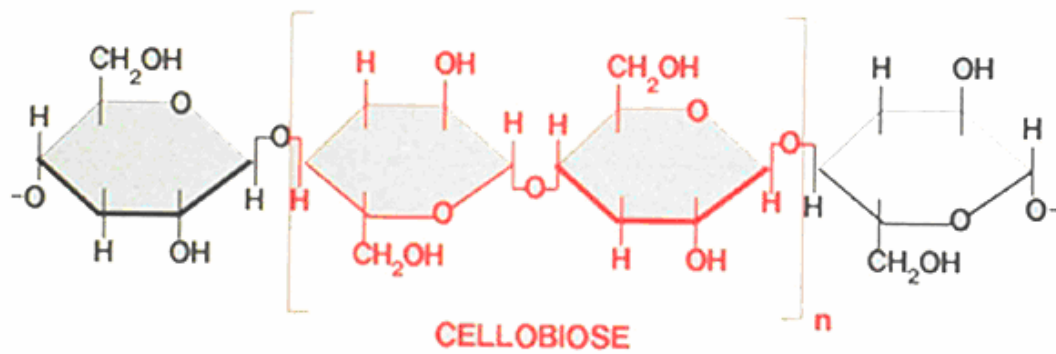
### **2.2.2 - Celulose**

A parede celular das células vegetais é formada por uma trama de fibrilas de celulose. Cada fibrila é formada pela agregação de mais ou menos 250 microfibrilas cuja integridade é mantida por ligações de hidrogênio entre os numerosos grupos  $\text{OH}^-$  adjacentes (Figura 4). Cada microfibrila apresenta mais de 10.000 resíduos de  $\beta$ -glicose anidra (Figura 5). Isto significa que o peso molecular é de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$ . O comprimento total da molécula é de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  variando, entretanto de acordo com a fonte e o grau de processamento à qual tenha sido submetida (GHOSE; BISARIA, 1979).

As microfibrilas de celulose agregam-se para formar as fibrilas elementares, que apresentam áreas ordenadas e outras menos ordenadas, denominadas áreas cristalinas e amorfas, respectivamente (KOSARIC et al., 1983). A biodegradação da molécula de celulose está relacionada com a distribuição e configuração destas duas áreas, como também com a sua associação com outros polímeros que a protegem, tais como a lignina, hemicelulose, amido, proteínas e compostos minerais (KOSARIC et al., 1983; GHOSE et al., 1977).



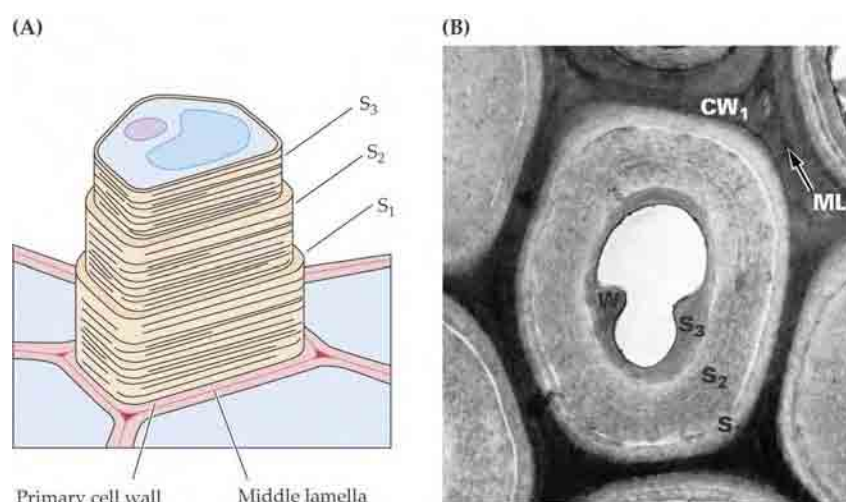
**Figura 4** - Figura esquemática da celulose (Disponível em: <http://academic.brooklyn.cuny.edu>)



**Figura 5** - Estrutura molecular da celulose (Disponível em: <http://www.swst.org>)

### 2.2.3 - Hemicelulose e xilano

As hemiceluloses são representadas por um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina (Figura 6). Cerca de 40% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais refere-se à hemicelulose sendo, portanto, depois da celulose, o carboidrato mais abundante na natureza (DA SILVA et al., 1997).

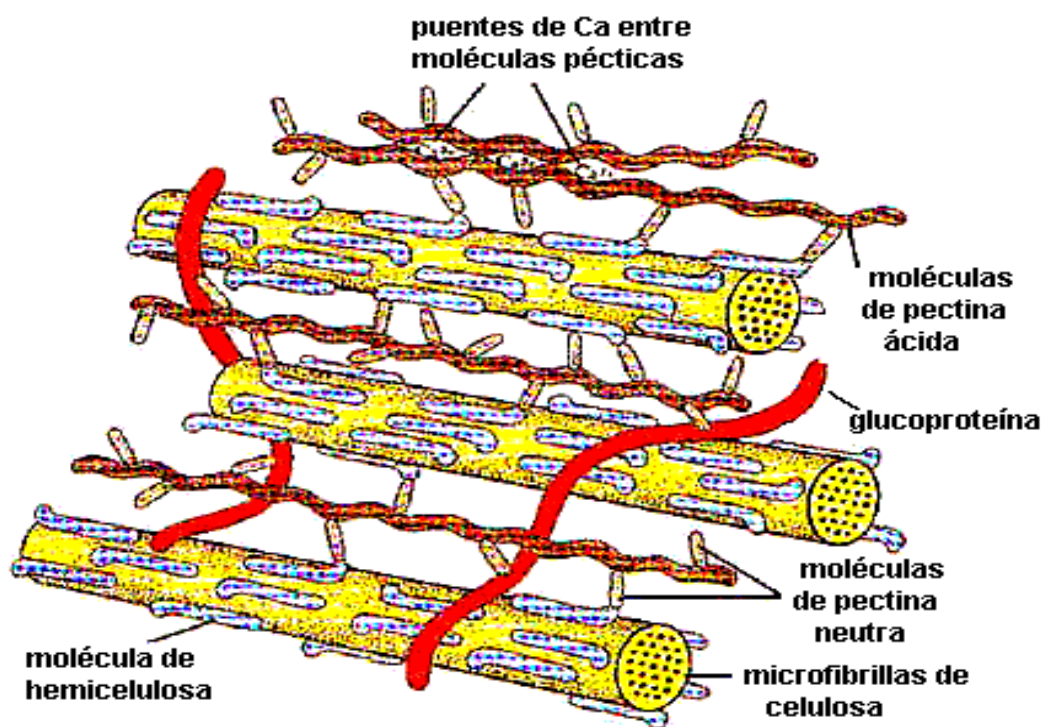


**Figura 6** - Modelo esquemático das camadas da parede celular de plantas (Disponível em: <http://www.nrsl.umd.edu>)

As hemiceluloses envolvem as microfibrilas de celulose, ligando-se firmemente entre si e à superfície das microfibrilas por pontes de hidrogênio, e por ligações covalentes a resíduos fenólicos da lignina (Figura 7), promovendo a adesão destes componentes, formando uma complexa rede de fibras (WONG et al., 1988).

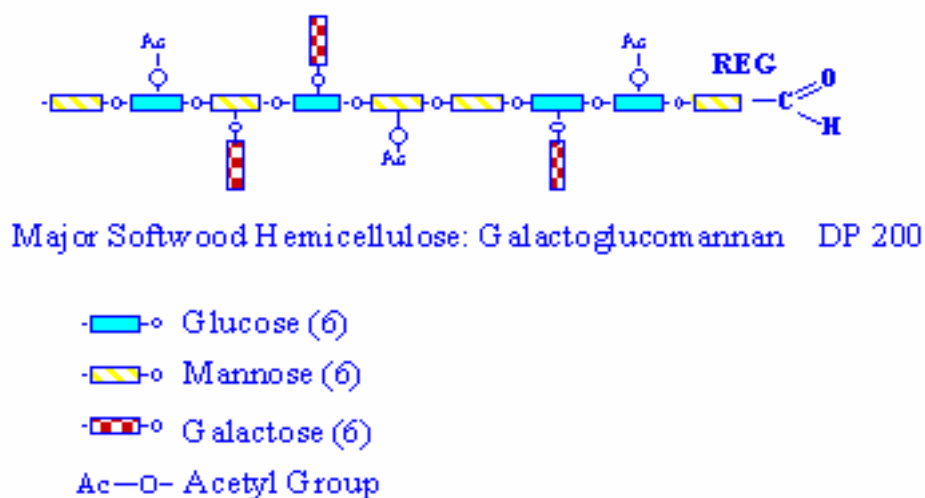
Quimicamente, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos, que ao contrário da celulose, pode ser formado por diversos açúcares (pentoses e hexoses), dando origem a cadeias moleculares mais curtas e com alto grau de substituição. Cada heteropolissacarídeo geralmente apresenta uma cadeia principal formada por uma única unidade, podendo apresentar diversas outras unidades como substituintes (PHILIPP;

D'ALMEIDA, 1988) tais como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros e por seus ácidos urônicos (HAN, 1978) (Figura 8). Têm-se apresentado de dois até seis resíduos de açúcares diferentes unidos por ligações  $\beta$ -(1-4) sendo o grau de polimerização geralmente de 200. A forma mais abundante apresenta D-xilose na cadeia principal e L-arabinose nas cadeias laterais.



**Figura 7** - Modelo esquemático das ligações entre a hemicelulose, celulose e lignina  
(Disponível em: <http://www2.mcdaniel.edu/Biology>)





**Figura 8** - Estrutura molecular da hemicelulose. Disponível em:  
<http://natural-resources.ncsu.edu>)

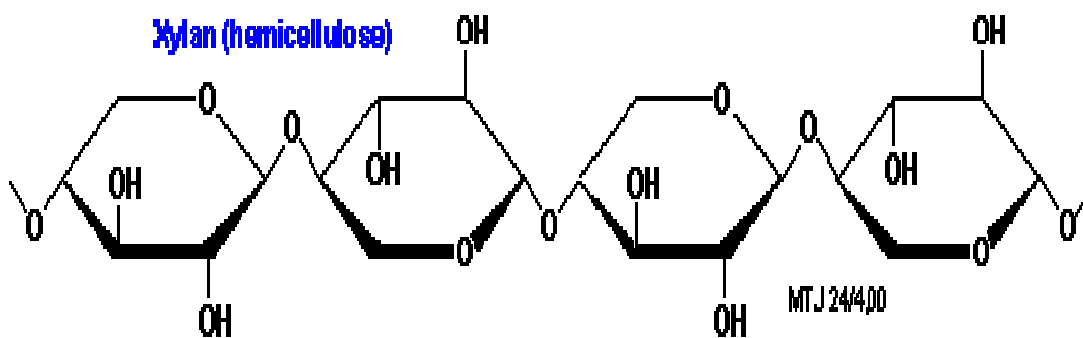
Estes açúcares estão ligados entre si, por ligações glicosídicas  $\beta$ -1, 4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Elas são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono-xilanas, arabino-4-metil-glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilana, galactosanas, galacto-arabino-glucurono-xilana, são diferentes denominações das hemiceluloses em função da estrutura química que as compõem (BIELY, 1985; DA SILVA et al., 1997).

Segundo Rodríguez-Palenzuela et al. (1996), as glucomananas constituem o tipo de hemicelulose mais abundante na parede secundária das gimnospermas, sendo um 7componente minoritário nas angiospermas. Constituem uma cadeia principal de resíduos de glicose e manose unidos por ligações  $\beta$ - 1, 4, na proporção de 1:3 (glicose-manose). A seqüência de glicose e manose é arbitrária e não é raro que existam cadeias laterais de arabinose e que os resíduos de manose possam estar acetilados. As galactomananas e mananas aparecem nas paredes celulares dos endospermas, onde também têm um papel de reserva energética e absorção de água. È formada por uma cadeia de manoses unidas por ligações  $\beta$ - 1, 4 e quando aparece um resíduo da galactose, este se une à manose por ligações X (1-6). As mananas põem formar estruturas cristalinas de grande resistência. As glucomananas estão presentes em pequenas quantidades em muitas espécies e é um componente de alguns exsudatos que

são produzidos tipicamente em frutas. Consiste de uma cadeia de manoses unidas por ligações X(1-4) e resíduos de ácido glucurônico unidos por ligações X (1-2), possivelmente em seqüência alternada. As cadeias laterais incluem xilose e arabinose.

Os xiloglucanos estão presentes em grande número de sementes e são conhecidas vulgarmente como amilóides, uma vez que podem ser tingidas por iodo. A cadeia principal está formada por glicoses unidas por ligações X(1-4) e a maioria das quais se unem a resíduos de xilose por ligações X(1-6). Alguns resíduos de xilose estão por sua vez, substituídos por fucose X(1-2), por galactose X(1-2) e ocasionalmente por arabinose. As arabinogalactanas são componentes da parede primária das gimnospermas e possuem um núcleo de galactano muito ramificado, que contém unidades de galactose unidas por ligações X(1-3) e X(1-6). Os resíduos de arabinose aparecem nas cadeias externas unidas por ligações X(1-3). A maior parte das hemiceluloses presentes nas madeiras é constituída por xilana, ou seja, um polímero polissacarídeo, cuja cadeia principal é constituída por 30-100 unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosose com ligações glicosídicas tipo 1,4 (Figura 9) ou como heteropolímeros altamente ramificados (ALEXANDER, 1977).

Os substituintes mais freqüentes são do tipo  $\alpha$ -1,2 ou  $\alpha$ -1,3 dos seguintes resíduos: ácido glucurônico, ácido D-galacturônico, grupos acetil, L-arabinose, D-galactose, entre outros. Nas madeiras duras quase a totalidade da hemicelulose é composta de O-acetil-4- O - metilglucuranoxilana. Já as madeiras moles contêm maiores proporções de D-manose e apresentam uma composição majoritária de arabinoxilanas e minoritária de galactomananas. Resíduos de ácido ferúlico e cumárico podem ainda apresentar-se esterificados aos substituintes do tipo L-arabinose (PHILIPP; ALMEIDA, 1988). Mas segundo Wong et al. (1988) os dois tipos principais de xilanos são os acetilxilanos de madeiras duras e arabinoxilanos de madeiras macias.



**Figura 9** - Unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosose com ligações glicosídicas tipo 1,4  
(Disponível em: <http://www.biosite.dk/leksikon/images/xylan.gif>)

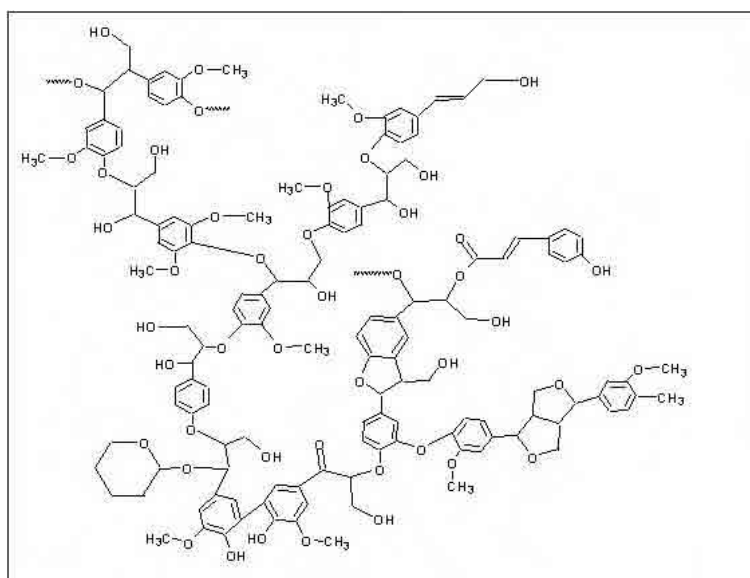
O xilano é encontrado nas paredes celulares de todas as células vegetais de plantas terrestres e, em quase todas as partes da planta (WONG et al., 1988), mas a distribuição dos vários componentes lignocelulósicos na parede celular das células vegetais depende do crescimento e diferenciação celular (WILKIE, 1979) e da espécie (SELVENDRAN, 1985).

A xilana, em madeiras duras e plantas anuais como o milho, rami e cana de açúcar, corresponde de 20 a 35% do peso total seco. Em madeiras leves a xilana é encontrada em menor quantidade, correspondendo aproximadamente a 8% do peso total seco (PRADE, 1995). Quantidades consideráveis de xilana estão presentes em resíduos agrícolas e agroindustriais sólidos, bem como em resíduos líquidos liberados durante o processamento de madeiras, muitas vezes lançados em mananciais, com grande prejuízo para o ecossistema (BIELY, 1985). Encontra-se preferencialmente nas paredes secundárias das células vegetais, distribuindo-se entre a lignina, os outros polissacarídeos hemicelulósicos, e as fibras de celulose, promovendo a adesão destes componentes, o que é essencial para a manutenção da integridade da parede celular da planta (PRADE, 1995).

A estrutura do xilano confere resistência à célula vegetal contra a degradação microbiana através das ligações entre as unidades de xilose e pela proteção conferida pelos substituintes laterais e outros polissacarídeos. Assim, a existência de um complexo enzimático, tendo enzimas com funções especializadas, é uma estratégia que os microrganismos usam para conseguir a hidrólise completa do xilano (KHENG; IBRAHIM, 2005).

### **2.2.4 - Lignina**

A lignina, segundo Eaton; Hale (1993) é definida como um polímero tridimensional complexo, de elevado peso molecular, amorfo, que trabalha como material incrustante em torno das microfibrilas, conferindo rigidez às paredes celulares dos elementos anatômicos, tornando-as resistentes a solicitações mecânicas (Figura 10). A lignina é uma macromolécula, com elevado peso molecular, que resulta da união de vários ácidos e álcoois fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico e sinapílico). O acoplamento aleatório destes radicais dá origem a uma estrutura tridimensional, polímero amorfo, característico da lignina. È o polímero natural mais complexo em relação à sua estrutura e heterogeneidade. Por esta razão numerosos modelos representam uma “aproximação” de sua estrutura.



**Figura 10** - Estrutura generalizada da lignina (Disponível em: <http://academic.scranton.edu>)

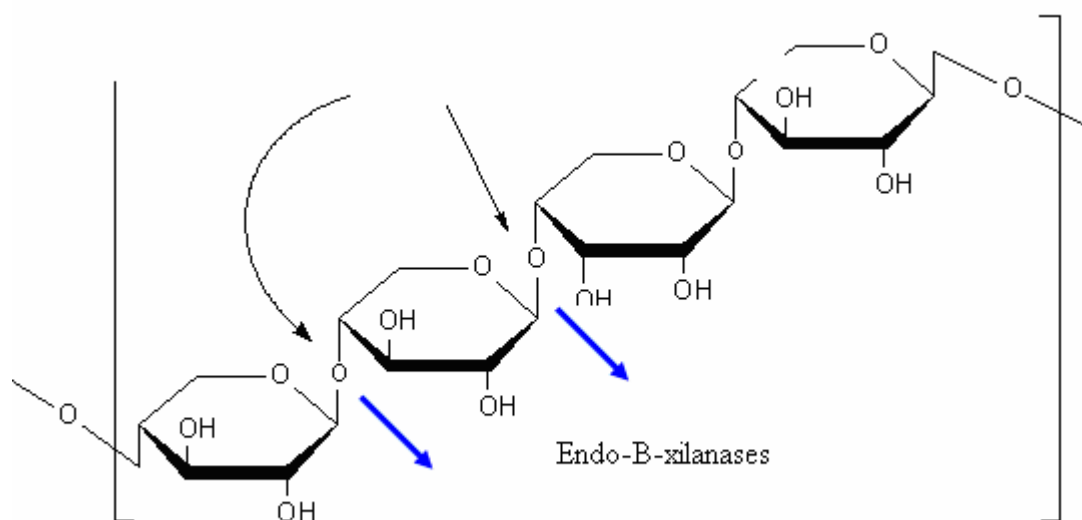
## **2.3 - XILANASE**

### **2.3.1 - Classificação e funções das xilanases**

Os microrganismos usam um sistema enzimático, denominado sistema xilanolítico, como uma estratégia para alcançar a hidrólise completa do xilano, uma vez

que as ligações entre os resíduos da cadeia não são acessíveis de forma equivalente às enzimas xilanolíticas, além de que a acessibilidade a algumas ligações pode mudar durante o processo de hidrólise enzimática (WONG et al., 1988).

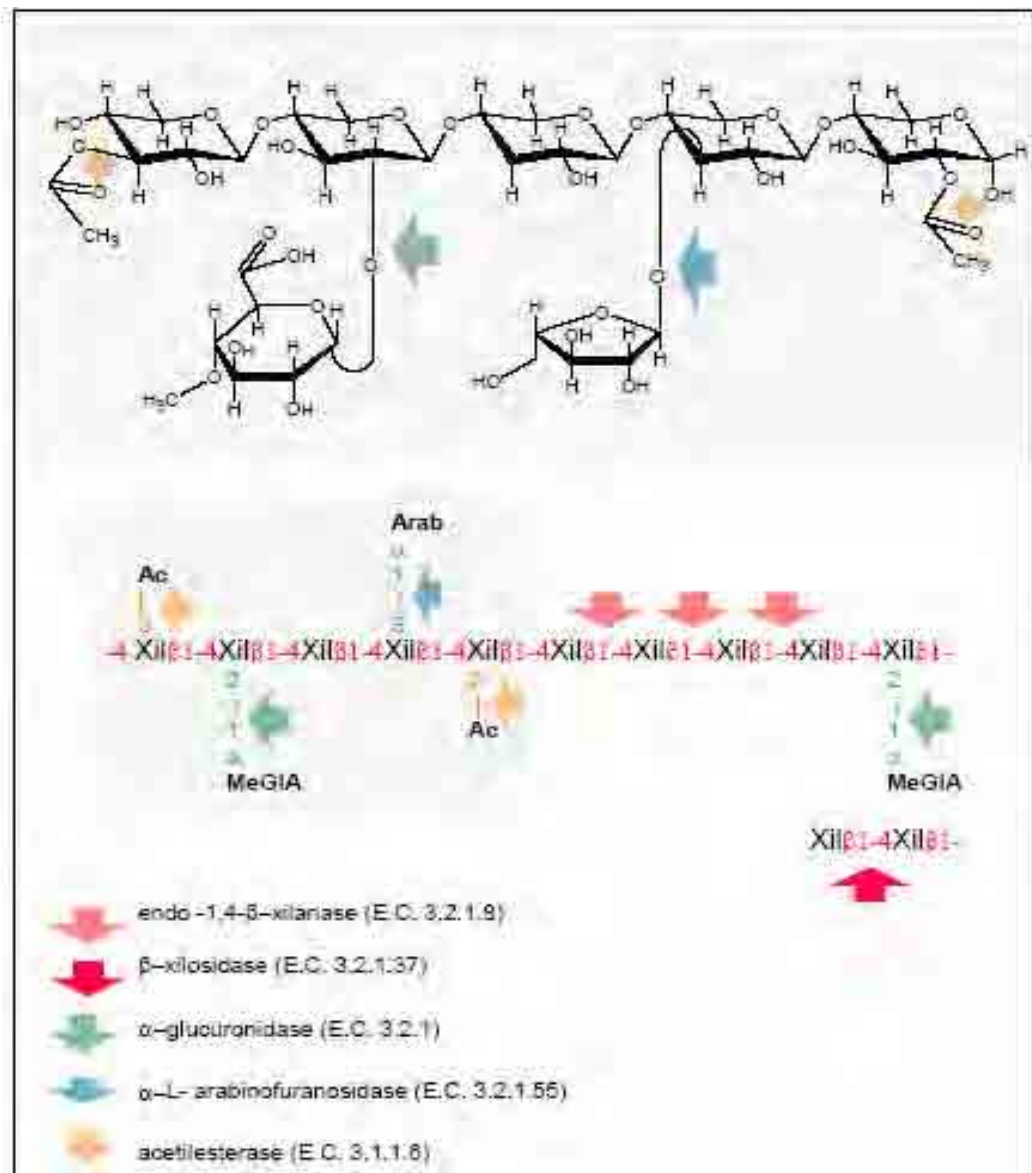
A primeira função das múltiplas xilanases seria de destruir a integridade das fibras de xilano, uma vez que o mesmo atua na coesão das fibras de celulose e expor os outros componentes lignocelulósicos a outras hidrolases. Tal função está relacionada à atividade de desramificação de algumas xilanases e não apenas na hidrólise de ligações xilanosídicas. É também possível que a significância de múltiplas xilanases esteja em sua habilidade de funcionar sob diferentes condições uma vez que suas propriedades fisicoquímicas diferem substancialmente (WONG et al, 1988). As duas principais enzimas do sistema xilanolítico, responsáveis pela degradação do xilano são as endo- $\beta$ -xilanases (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37). As endo- $\beta$ -xilanases (Figura 11) são endo-enzimas responsáveis pela clivagem das ligações  $\beta$ -1,4 entre as moléculas de xilose não substituídas, liberando xilose (REILLY, 1981).



**Figura 11** - Sítios de ação das endo-  $\beta$ - 1,4 xilanases (EC 3.2.1.8) (Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>)

As  $\beta$ -xilosidases (Figura 12) são consideradas exo-enzimas, pois hidrolisam xilobiose e outros pequenos xilo-ologossacarídeos resultantes da ação das endoxilanases, também liberando xilose (ANGELO, 1999). Ambas, portanto, tem a

habilidade de hidrolizar xilo-oligômeros a xilose, uma fonte primária de carbono que pode substituir a glicose e ser utilizada por microrganismos como fonte de carbono (FINELL et al., 2002).



**Figura 12** - Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam (Fonte: BIELY, 1985).

Uma vez que o xilano pode se apresentar como heteropolímeros altamente ramificados com substituições tipo  $\alpha$ -1,2 ou  $\alpha$ -1,3 de resíduos de ácido glucurônico, ácido D-galacturônico, grupos acetil, L-arabinose e D - galactose (ALEXANDER, 1977), outras enzimas constituintes do sistema xilanolítico (Figura 12) são responsáveis

pela hidrólise dos mesmos ( $\alpha$ -L-arabinosidases,  $\alpha$ -D-galactosidases,  $\alpha$ -D-glucuronidases, acetil-esterases e feruloil ou cumaril esterases) (BEG et al., 2001; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002)

Assim, de acordo com BIELY (1985) as enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- $\beta$ -1,4 xilanase e  $\beta$ -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais ( $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e acetilesterase). Segundo WONG et al. (1988), as xilanases podem também ser classificadas com base nos produtos finais de reação: xilanases não desramificantes, que não hidrolisam pontos de ramificação de arabinoxilanos, não liberando arabinoses; e as desramificantes que os hidrolisam, liberando arabinoses.

As xilanases podem ainda ser classificadas segundo a análise de grupamentos hidrofóbicos e a seqüência de aminoácidos podendo ser divididas em dois grandes grupos: as famílias F/10 e G/11. A família F/10 corresponde às xilanases de maior massa molecular (a partir de 30-35 KDa), enquanto a família G/11 é composta pelas enzimas com massas moleculares menores, ao redor de 20 KDa. A família G/11 é composta de endo-xilanases de baixo peso molecular, altamente específicas, formando um grupo muito homólogo de enzimas. Já as endoxilanases da família F/10, embora demonstrem grande versatilidade, possuem baixa especificidade. Em geral as enzimas pertencentes à família G/11 possuem pH ótimo ao redor de 5, enquanto as pertencentes à família F/10 apresentam ponto isoelétrico mais baixo que as da família G/11 (JEFFRIES, 1996).

As famílias F/10 e G/11 possuem em comum o caráter endo de clivagem das ligações glicosídicas e o mecanismo de hidrólise do xilano. As enzimas de ambas as famílias têm se mostrado aptas a hidrolisar a ligação beta 1,4 do xilano, sugerindo que a hidrólise do substrato deve seguir um mecanismo de dupla substituição envolvendo dois resíduos de ácido carboxílico (KRENGEL; DIJKSTRA, 1996). Os grupos catalíticos são compostos de dois resíduos glutamato, localizados em oposição um ao outro na abertura do sítio ativo. O papel de um glutamato é agir como um catalisador ácido/base com o outro resíduo servindo como um nucleófilo estabilizador do intermediário de reação (TORRONEN et al., 1997).

Apesar das semelhanças, as duas famílias podem apresentar alta variação nas suas propriedades funcionais, como atividade catalítica, padrões de clivagem do

substrato, pH ótimo e estabilidade térmica. Xilanases microbianas pertencentes às famílias F/10 e G/11 diferiram na sua ação da hidrólise de 4-O-metilglucuranoxilana: as enzimas da família F/10 não precisam de altas unidades consecutivas não substituídas na cadeia principal, sugerindo que seus sítios ativos sejam menores que os da família G/11. Até mesmo xilanases dentro de uma mesma família podem ter propriedades bastante distintas.

De uma forma geral, as xilanases de origem microbiana possuem uma composição protéica simples e massa molecular entre 8 e 145 KDa, sendo que a faixa ótima de temperatura para produção de endo-xilanases, por bactérias ou fungos, varia de 40 a 60 °C, sendo as bactérias mais conhecidas por produzirem xilanases termoestáveis. As xilanases, provenientes de diferentes microrganismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, sendo, no entanto, a melhor produção enzimática obtida entre pH 4 e 7 (KULKARNI; SHENDYE, 1999).

### **2.3.2 - Regulação da síntese de xilanases**

As endo- $\beta$ -xilanases e  $\beta$ -xilosidases, apesar das suas especificidades e modos de ação diferentes, atuam com um alto grau de complementação na hidrólise do xilano (WONG et al., 1986) e o comprimento da cadeia e o grau de substituição se constituem em fatores-chaves que influenciam a taxa de hidrólise deste composto (LIAB et al., 2000). A capacidade hidrolítica das primeiras aumenta com o comprimento da cadeia, enquanto que a das segundas diminui com o comprimento da cadeia (PRADE, 1995).

A importância dos substituintes na cadeia principal do xilano, nas limitações dos processos de hidrólise enzimática, sugere que exista uma relação inversa entre o processo de hidrólise e o conteúdo destes resíduos (BRICE; MORRISON, 1982). Algumas xilanases purificadas são hábeis em clivar xilotriose, mas não arabinó-xilotriose, indicando que os substituintes de  $\alpha$ -L-arabinose protegem as ligações xilosídicas das xilanases (TAKENISHI; TSUJISAKA, 1975). Entretanto, é possível que os resíduos substituintes tenham uma função positiva para que as ligações enzima-substrato sejam alcançadas, uma vez que muitas xilanases demonstrem preferência em hidrolisar cadeias de xilano ramificadas (FREDERICK et al., 1985). As enzimas



metabólicas produzidas no processo tais como as proteases e as transglicosidases afetam também o rendimento real da produção das xilanases (HRMOVA et al., 1991).

Algumas xilanases são produzidas em menor quantidade, ou porque podem exercer funções que não são requeridas com frequência (como por exemplo, para hidrólises de ligações que não ocorrem frequentemente), ou porque as condições de cultivo não induzem sua produção ou ainda porque são perdidas devido à degradação ou adsorção pelo substrato (WONG et al., 1988). Devido ao seu alto peso molecular, o xilano não pode entrar na célula e então não pode diretamente induzir a síntese das enzimas xilanolíticas. São os fragmentos do xilano (xilose, xilobiose e xilo-oligossacarídeos), que por terem baixo peso molecular, vão ter ação na biossíntese da xilanase (KULKARNI; SHENDYE, 1999). Em geral, a indução de xilanases é um fenômeno complexo e o nível da resposta a um indutor individual varia com os organismos.

Apenas em raros casos a expressão constitutiva da xilanase tem sido relatada (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 1993). Geralmente, a expressão da xilanase em fungos está sujeita à indução pelo substrato e repressão catabólica pela glicose. (DE VRIES; VISSER, 2001; TONUARI et al., 2002).

Biely (1985) propôs um mecanismo de indução de xilanase para a levedura *Cryptococcus albidus*, em meio contendo xilano, no qual é produzida uma pequena quantidade de xilanase constitutiva que é excretada no meio e degrada o xilano em xilo-oligossacarídeos e xilobiose que após serem absorvidos pela célula, induzem os genes a produzirem xilanase extracelular. As xilanases induzidas degradam então o xilano em xilo-oligossacarídeos e xilobiose. O acúmulo destes monômeros provenientes da ação da enzima, entretanto, faz com que atuem como repressores na produção da mesma. Segundo esse autor, este sistema pode ser a explicação para a indução de xilanase em outros microrganismos. Os derivados dos substratos e produtos enzimáticos finais podem desempenhar, portanto, um papel positivo chave na indução da enzima, e também podem agir como inibidores dos produtos finais, possivelmente em concentrações mais elevadas. Um indutor que produz a atividade máxima de xilanases em uma espécie, porém, pode ser o inibidor da atividade em uma outra espécie (HRMOVA et al., 1989). Haltrich et al. (1996) descreveram, genericamente, a indução

de xilanases produzidas por fungos por um mecanismo semelhante ao descrito anteriormente.

A biossíntese de xilanase ocorre várias horas após o indutor do meio ter sido consumido, em contraste à síntese de L- permease e L- xilosidase que tem um período de indução mais curto (LAMPEN et al., 1972).

De Graaff et al. (1994) relataram que a repressão catabólica do gene da xilanase e *A. tubigensis* pareceu ser controlada em dois níveis, diretamente pela repressão do gene da transcrição e indiretamente, pela repressão do ativador de transcrição. O mesmo padrão de regulação foi observado em *A. niger* e *A. nidulans*. A repressão catabólica pelo carbono em microrganismos é, portanto, uma maneira de se controlar a síntese de várias enzimas requeridas para utilização de fontes de carbono menos favorecidas quando fontes de carbono mais rapidamente utilizáveis estão disponíveis no meio. Os microrganismos são induzidos a desativar um grande número de genes na presença de glicose como resposta a uma economia de energia, isto afeta primariamente as enzimas usadas para metabolizar outras fontes de carbono que são dispensáveis na presença de glicose (RONNE, 1995).

De modo geral, as enzimas xilanolíticas podem ser produzidas em grandes quantidades durante o crescimento em meio contendo xilano, e também submetidas à repressão catabólica por fontes de carbono mais facilmente utilizáveis, como glicose e xilose (BIELY, 1985; PRADE, 1995).

Trabalhos com leveduras e fungos filamentosos têm revelado que o mecanismo para repressão da glicose em eucariotos é diferente ao encontrado em bactérias. A expressão da maioria dos genes para xilanase relatados de fungos fitopatogênicos são inibidos pela glicose (GÓMEZ-GÓMEZ et al., 2002; TONUARI et al., 2002).

Recentes evidências indicam que a xilose nem sempre é indutora de expressão de xilanase em *Aspergillus* sp, mas atua preferencialmente como um repressor em alta concentração (DE VRIES et al., 1999) através do conhecido processo de repressão catabólica do carbono. Estudos com *Aspergillus* sp e *Trichoderma* sp a nível celular e molecular indicam que a expressão genética é regulada na fase de transcrição (DE GRAAFF et al., 1994; MARGOLLES-CLARK et al., 1997) e que o ativador no processo *XlnR* (positive acting element) é conhecido por regular a indução da expressão

da xilanase. Em geral, pouco é conhecido sobre os mecanismos pelos quais os genes que codificam a xilanase são induzidos.

Um dos fatores básicos para uma eficiente produção de xilanases por microrganismos, refere-se à adequada escolha do substrato e a otimização da composição do meio de cultivo, pois, a partir daí, pode-se definir as características da enzima, bem como controlar a formação de compostos indesejáveis, como a produção de celulases, quando a enzima produzida destina-se a indústria de celulose papel, por exemplo. Neste caso, o substrato não é somente a fonte de carbono e energia, mas fornece também, os compostos indutores da produção enzimática para o microrganismo (KULKARNI; SHENDYE, 1999).

O rendimento da produção da xilanase é governado por alguns fatores chaves, além dos parâmetros padrões. Quando a produção da enzima é realizada em substratos heterogêneos complexos, vários fatores têm um efeito combinado no nível da expressão da xilanase. Incluem a acessibilidade, a taxa, a quantidade e a natureza química dos xilo-oligossacarídeos liberados do substrato, e a quantidade da xilose liberada, que age na maioria dos casos, como fonte do carbono e como inibidor da síntese da xilanase. As xilanases ligam-se firmemente ao substrato e uma parte da enzima produzida durante a fermentação frequentemente é perdida junto com o substrato insolúvel. As enzimas metabólicas produzidas no processo tais como as proteases e as transglicosidases afetam também o rendimento real da produção da xilanase (HRMOVA et al., 1991).

### **2.3.3 - Fatores que afetam a produção de xilanases**

Quando se objetiva a síntese de xilanase “in vitro” por microrganismos, busca-se definir as características da enzima, a fim de se obter uma eficiente produção e se controlar a formação de compostos indesejáveis. Entretanto, vários parâmetros se constituem em fatores que podem afetar o processo, tais como: microrganismo utilizado, escolha do substrato, composição do meio e atividade de água (PANDEY et al., 2000), aeração do meio (GHILDYAL et al., 1994), pH (XIONG, 2004), temperatura (YUAN, 2005), tempo de cultivo (SHAH; MADAMWAR, 2005) e a concentração do inóculo (GHANEM et al., 2000).

### 2.3.3.1 - Substrato

A escolha do tipo de substrato adequado para os cultivos de microrganismos objetivando a biossíntese enzimática depende de uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade de uso (PANDEY et al., 2000). Os processos mais utilizados para cultivos de microrganismos para produção de enzimas e dentre elas as xilanases, são por fermentação submersa (SMF) e fermentação em estado sólido (SSF), e apresentam variáveis na forma de condução (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Atualmente, a grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente é produzida fazendo uso da SMF, geralmente utilizando-se microrganismos geneticamente modificados. No entanto, o custo da produção destas enzimas por SMF é alto e o processo torna-se, muitas vezes economicamente inviável (PANDEY et al., 2000).

A estrutura do xilano varia com a espécie vegetal (BIELY, 1985). A hidrólise do xilano depende do número e posição de suas ramificações, as quais podem afetar positivamente ou negativamente a formação do complexo enzima - substrato (FERREIRA-FILHO, 1994). A partir da descrição do mecanismo de indução das endoxilanases, pode-se concluir que a utilização de xilana pura, ou de seus derivados de baixa massa molecular, é uma excelente opção para a produção destas enzimas, o que vem sendo feito, frequentemente, em pequena escala (HALTRICH et al., 1996). Existem estudos que pesquisam a produção de enzimas por microrganismos em diferentes substratos lignocelulósicos (PANDEY et al., 2000).

No trabalho de Gupta et al. (2001) observaram que a utilização de resíduos, como farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e cavaco de madeira, para fornecimento de carbono nos cultivos, levou a uma produção cinco vezes maior de xilanase por *Staphylococcus* sp, comparando-se com os resultados obtidos para os cultivos conduzidos a partir de xilose e xilana pura.

Vários resíduos agroindustriais e de exploração florestal tem sido avaliados como fontes de xilana e xilo-oligômeros, podendo ser utilizados, na forma natural, como é o caso dos processos em estado sólido, ou após pré-tratamentos (químicos, físicos ou enzimáticos), que se fazem necessários para sua utilização nos cultivos submersos e, em alguns casos, também nos cultivos em estado sólido (KULKARN; SHENDYE, 1999).

Os materiais utilizados como substrato nos cultivos em meio sólido incluem produtos como arroz, mandioca, soja, beterraba, batata e batata doce (FENG et al., 2000; NWE et al., 2002; ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002) e resíduos da exploração destes produtos como farelos e palha de trigo e arroz (GOMES et al., 1994; RIDDER et al., 1999; BAKIR et al., 2001; JECU, 2000; CASTILHO et al., 2000; BIESEBEKE et al., 2002; CHEN et al., 2002), casca de soja, de milho e arroz (HAN, 1987; YANG et al., 2001), bagaço de mandioca (VANDENBERGHE et al., 2000; PALMA et al., 2002) e de cana-de-açúcar (PALMA et al., 1996; SOUZA et al., 1999), resíduos da indústria de processamento do café (BRAND et al., 2000; SOARES et al., 2000), resíduos das indústrias processadoras de frutas como maçã, figo, morango e manga (BRAMORSKI et al., 1998; COURI et al., 2000; ROUKAS, 2000; ZHENG; SHETTY, 2000; SHOJAOSADATI; BABAEIPOUR, 2002), resíduos das indústrias extratoras de óleo como torta de oliva, torta de soja, torta de amendoim, torta de canola e torta de babaçu (HADDADIN et al., 1999; PALMA et al., 2000; FENICE et al., 2003), sabugo de milho (DAMASO et al., 2000; BAKIR et al., 2001), dentre outros.

As vantagens para o uso de substratos sólidos visando à obtenção de enzimas por SSF são atraentes: ricos em xilano, baixo custo (SOARES et al., 2000), maior atividade enzimática por unidade de volume (MADAMWAR; PATEL, 1992), obtenção de níveis de atividade superiores aos obtidos pelo cultivo submerso, além de se obter enzimas com propriedades funcionais mais adequadas às aplicações industriais (NIGAN; SINGH, 1994; MITCHELL et al., 2000), maior termo estabilidade e resistência ao pH (ZHENG; SHETTY, 2000), o cultivo aproxima-se muito do ambiente natural de crescimento dos microrganismos (HOURS; SAKAI, 1994; PANDEY, 2003) e constituem importante auxílio na resolução de problemas de poluição ambiental, causados pelo grande volume deste material que é gerado pelas indústrias (PANDEY et al., 2000).

Além destes, outras vantagens a nível industrial são relatadas por Palma (2003), como a redução de custos quanto à maquinaria, o espaço ocupado é pequeno, o índice de contaminação bacteriana é baixo devido à baixa atividade de água, o resíduo remanescente é pequeno, utilizando-se alta concentração de substrato pode-se obter alta concentração de produto e quando necessários, os processos de filtração são simples.

A tabela 6 apresenta alguns exemplos de recentes aplicações da SSF, com os respectivos substratos e microrganismos utilizados.

**Tabela 6** - Exemplos de aplicações de SSF utilizando diferentes substratos

Produto	Microrganismo	Substrato	Referência
Pectinases	<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	Castilho et al. (2000)
Xilanase, celulase	<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	Couri et al. (2000)
Lacase	<i>Panus tigrinus</i>	Sabugo de milho	Fenice (2003)
Endoglucanase	<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	Jecu (2000)
Amilases	<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	Nandakumar et al. (1999)
Xilanases	<i>T. aurianticus</i>	Bagaço de cana	Souza et al. (1999)
Poligaracturonase	<i>Lentinus edodes</i>	Bagaço de maçã	Zheng; Shetty (2000)

É difícil generalizar as vantagens relacionadas aos processos sólidos ou líquidos, pois os microrganismos podem se adequar a um ou outro processo e até mesmo produzir complexos enzimáticos diferentes. Nos sistemas sólidos o tamanho da partícula e o nível de umidade no meio são fatores importantes para o crescimento microbiano e a formação do produto de interesse (PANDEY, 2003).

Fungos filamentosos tais como *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium* são importantes microrganismos utilizados na SSF, pois crescem naturalmente em frutas e grãos ou sobre resíduos agrícolas lignocelulósicos e amiláceos. Estes fungos crescem na superfície de substratos sólidos de um modo similar às raízes das plantas crescendo no solo. O longo corpo tubular da hifa dos fungos cresce junto à partícula sólida, utilizando a fina camada líquida da superfície como fonte de umidade e nutrientes, penetrando nas fendas e no interior do substrato para chegar aos nutrientes mais distantes. As extremidades das hifas do fungo se alongam e produzem enzimas ativas para converter o polímero natural em açúcares metabolizáveis (NIGAN; SINGH, 1994).

Os microrganismos encontram nos substratos de partículas pequenas maior área superficial para a utilização, mas, partículas muito pequenas podem resultar em aglutinação do substrato, o que, conseqüentemente, interfere na aeração do sistema, bem como na utilização do oxigênio pelos microrganismos. Partículas grandes fornecem menor área superficial, mas, levam a um aumento do espaço interpartículas, melhorando os processos relacionados à transferência do oxigênio (PANDEY et al., 2000).

Oriol et al. (1988) observaram que em cultivos de *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar, o aumento na granulometria do substrato levou a uma diminuição da velocidade do crescimento celular, pela dificuldade na difusão interpartículas dos nutrientes, uma vez que se constatou, microscopicamente, que o crescimento celular ocorreu apenas na superfície das partículas. Ridder et al. (1999) obtiveram resultados semelhantes em cultivos em meio sólido para produção de xilanase e glicoamilase, respectivamente. O mesmo resultado está relatado no trabalho de Damaso et al. (2000) que, comparando a utilização de dois tamanhos de partícula (4,5 e 6,0 mm) de sabugo de milho na produção de endo-xilanases por *Thermomyces lanuginosus*, obtiveram a máxima produção enzimática nos cultivos realizados com substrato de menor granulometria.

Ramesh; Lonsane (1991) sugeriram que a ausência de repressão catabólica em sistemas sólidos seja devido a diversos fatores coletivos, incluindo o lento e baixo processo de difusão nos substratos sólidos devido à baixa atividade de água.

Diversos autores descreveram que as fermentações sólidas para produção enzimática realizada com farelo de trigo apresentaram resistência à repressão catabólica:  $\alpha$ -amilases por *Bacillus licheniformis* (RAMESH; LONSANE, 1991), *Bacillus coagulans* (BABU; SATYANARAYANA, 1995), *Aspergillus niger* (NANDAKUMAR et al., 1999); xilanases por *Bacillus licheniformis* (ARCHANA; SATYANARANA, 1997), *Bacillus* sp (GESSESSE; MAMO, 1999), *A. terreus* e *A. niger* (GAWANDE; KAMAT, 2000) e *A. fumigatus* (ANTHONY et al., 2003); produção de pectinases por *Aspergillus* sp (AGUILAR; HUITRO, 1986), *Aspergillus niger* (SOLIS-PEREYRA et al., 1996; CASTILHO et al., 2000), endoglucanase por *Aspergillus niger* (JECU et al., 2000) e protease ácida por *Neosartorya fischeri* (WU; HANG, 2000).

Recentemente, De Souza et al. (2001) verificaram o efeito de vários açúcares facilmente metabolizáveis como glicose, xilose, frutose, maltose, celobiose e lactose, na

indução de xilanase por *Aspergillus tamarii*. Esses autores observaram que a adição de 1% destes açúcares nos meios de cultivo, constituídos à base de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, causou uma severa repressão catabólica no sistema. No entanto, verificou-se que os cultivos conduzidos em meios à base de farelo de trigo foram resistentes à presença dos açúcares, não se detectando efeitos de repressão catabólica com a adição de, até, 10% de glicose.

Estudos indicaram que o farelo de trigo apresenta um suporte de nutrientes balanceado, ideal para o crescimento de muitos microrganismos (GESSESSE; MAMO, 1999). Alguns trabalhos mostraram que, dentre os fatores avaliados, a umidade do substrato apresentou-se como variável de grande relevância para a produção enzimática, como ocorreu na produção de proteases ácidas por *Neosartorya fischeri*, em farelo de trigo (WU; HANG, 2000).

Gutierrez-Correa et al. (1998) mostraram que a presença de uma fonte de nitrogênio orgânico no meio (farelo de soja) aumentou em sete vezes a produção de xilanases, em um cultivo misto utilizando *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis*, quando se comparou com o processo suplementado com nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio). O farelo de soja tem sido utilizado por vários autores para avaliação da atividade enzimática, não como substrato, mas como fonte de nitrogênio alternativa, natural e mais barata, conforme relatado por Lu et al. (2003) que utilizaram farelo de soja e farelo de peixe na produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus*, em escala piloto.

Bakir et al. (2001) também fizeram uso de farelo de soja, como fonte de nitrogênio, na produção de endo-xilanase por *Rhizopus oryzae* e observaram que, um aumento na concentração deste composto de 1 para 2%, no meio de cultivo, levou a um aumento de 26% na produção de xilanase. Esses autores ressaltaram que este valor é pequeno quando comparado com o efeito causado pelo aumento da concentração da fonte de carbono (sabugo de milho), de 1 para 3%, que levou ao acréscimo de 80% na produção de xilanase. Este fato foi atribuído, pelos autores, a um provável aumento da atividade proteolítica, estimulado pela presença de uma maior concentração de nitrogênio no meio. Testou-se ainda a combinação de 1% de farelo de soja com 1% de uma fonte de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio, nitrato de potássio e nitrato de sódio), obtendo-se os melhores resultados na combinação entre farelo de soja e sulfato



de amônio, chegando-se a uma produção de, aproximadamente, seis vezes maior da enzima do que com a utilização dos outros sais testados.

O tipo e a concentração da fonte de nitrogênio utilizada no cultivo de *Thermoactinomyces thalophilus* afetaram, consideravelmente, a produção de xilanase e a formação de biomassa, conforme constatação de Kohli et al. (2001). Esse autores avaliaram diferentes fontes de nitrogênio como farelo de soja, peptona e triptona, em diferentes concentrações (0,1, 0,15, e 0,20%) frente a um controle feito com 0,25% de extrato de levedura. Observou-se que a utilização do farelo de soja levou a redução da atividade enzimática bem como da formação de biomassa. Nos experimentos conduzidos com peptona e triptona verificou-se que houve aumento de 11% na atividade de xilanase, quando se utilizou a concentração de 0,1%, o que, no entanto, não alterou a formação de biomassa. Quando a concentração destes compostos foi elevada para 0,20% observou-se, entretanto, redução na atividade de xilanase e aumento na biomassa total formada. Os autores atribuíram estes resultados, possivelmente, aos efeitos da repressão catabólica ou da mudança no balanço carbono: nitrogênio, que afeta, de uma forma geral, a produção enzimática.

Cheilas et al. (2000) obtiveram resultado semelhante na produção de arabinase, uma enzima do complexo xilanolítico, por *Fusarium oxysporum*, pois a utilização de uma fonte de nitrogênio orgânico foi mais favorável à produção da enzima, sendo o licor de maceração de milho, o composto que levou às mais altas atividades.

Gomes et al. (1994) avaliaram a influência da fonte de nitrogênio na produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus* e verificaram que a indução da enzima ocorreu somente na presença de uma fonte de nitrogênio orgânica no meio de indução. Sem especificação dos compostos utilizados, relataram que a substituição do nitrogênio orgânico, pela mesma quantidade de nitrogênio inorgânico, reduziu a atividade de xilanase. Kalogeris et al. (1998), no entanto, chegaram a resultados contrários, alcançando maiores atividades de xilanase de *Thermoascus aurantiacus* em meios contendo nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio), concordando com os resultados de Ghanem et al. (2000), que também obtiveram melhor produção de xilanase por, *Aspergillus terreus*, quando o meio foi suplementado com sulfato de amônio, que foi avaliado dentre outras possibilidades de suplementação de nitrogênio inorgânico como cloreto de amônio, fosfato de amônio e nitrato de sódio e fontes orgânicas como

peptona, extrato de levedura, licor de maceração de milho, farelo de soja e extrato de malte.

### 2.3.3.2 - Efeito da adição de outras fontes de carbono ao substrato

A produção de metabólitos primários por microrganismos é altamente influenciada pelo seu crescimento, que por sua vez é determinado principalmente pelos nutrientes presentes no meio de cultura. Seria, portanto de se esperar que a suplementação de fontes de carbono ao meio, favoreceria também a produção de enzimas. Observa-se, entretanto, que a maioria dos açúcares reprime a atividade enzimática, talvez por constituírem uma fonte de carbono mais facilmente metabolizável que pode reprimir a expressão dos genes que controlam a atividade enzimática. Assim, a melhor fonte de carbono para crescimento de um fungo nem sempre será uma boa fonte para a indução enzimática, o que pode ser constatado pelo trabalho de diversos autores que avaliaram diversas fontes de carbono para crescimento e produção de xilanases por *T. reesei* QM9414 (Tabela 7).

**Tabela 7** - Efeito da fonte de carbono para crescimento e produção de xilanases por *T. reesei* QM9414, avaliado por outros autores.

Fonte de carbono	Crescimento	Indução	Referência
D - glicose	+++	-	Margolles-Clark et al. (1997)
D - xilose	+++	-	Margolles-Clark et al. (1997)
Manose	+++	-	Margolles-Clark et al. (1997)
D - galactose	++	-	Margolles-Clark et al. (1997)
Celulose	+++	++	Margolles-Clark et al. (1997)
Celobiose	+	+	Margolles-Clark et al. (1997)
Xilano	+++	++	Margolles-Clark et al. (1997)
Arabinose	n.r.	-	Zeilinger et al. (1996)
Xilobiose	+	+	Zeilinger et al. (1996)

Uma substância que se apresenta como indutora enzimática para uma espécie pode ser inibidora da mesma atividade para outra espécie (HRMOVA et al., 1989). Purkardhofer; Steiner (1995) também avaliaram o efeito de diversos açúcares no crescimento e produção de xilanase por *T. lanuginosus* DSM 5826 sendo os resultados apresentados na tabela 8. Segundo Bajpai et al. (1997), a síntese de xilanase está sujeita aos mecanismos de repressão e indução catabólica. Fadel (2000) verificando a síntese de xilanases observou que esta é afetada pelo substrato e também pela concentração da fonte de carbono adicionada ao substrato.

**Tabela 8** - Efeito de diversos açúcares no crescimento e produção de xilanase por *T. lanuginosus* DSM 5826 (PURKARTHOFER; STEINER, 1995)

Fonte de carbono	Xilanase (U/mL)	Peso seco (mg/mL)
D - Glicose	0,21	5,92
D- Galactose	0,41	4,94
D- Manose	0,29	5,32
D- Arabinose	8,08	4,31
D- Xilose	73,50	4,55
L- Arabinose	0,83	3,83
D- Frutose	0,16	4,97
Celobiose	0,15	3,96
Sacarose	0,66	3,85
Lactose	0,16	3,07
Maltose	0,46	4,99
Xilano	4,26	-
Nenhum	0,16	1.35

A xilose tem sido descrita por diversos autores como indutora na produção de xilanase por diversos microrganismos: *Fusarium oxysporum* (SINGH et al., 1995) e *T. lanuginosus* (PURKARTHOFER; STEINER, 1995). Quando a xilose foi usada nos cultivos de *A. tamarii* em fermentação sólida, entretanto, a produção de xilanase foi

reprimida (DE SOUZA et al., 2001), sendo o mesmo observado por Gessesse; Mamo (1999) com *Bacillus* sp, Gawande; Kamat (2000) com *Aspergillus* sp, De Souza et al. (2001) com *A. tamarii*, Haq et al. (2002) com *A. niger*, Shah; Madamwar (2005) com *A. foetidus*, Rawashdeh et al. (2005) com *Streptomyces* sp, Kheng; Ibrahim (2005) com *A. niger*.

Muitos trabalhos citam a glicose como repressora na atividade enzimática. Gomes et al. (1994) relataram que alguns fatores afetam a indução de xilanase de *Thermoascus aurantiacus*, sendo que, dentre quatorze diferentes fontes de carbono testadas, os melhores indutores dessa enzima foram xilana “birchwood”, glucuronoxilana “birchwood” e metil  $\beta$ -D-xilopiranosídeo (MXP), este último responsável pela maior atividade detectada, 2,5 mg/mL. Constatou-se a produção de pequenas quantidades de xilanase constitutiva em todos os cultivos, e a repressão da síntese por glicose, foi irreversível. Quando a concentração de glicose no meio foi reduzida ao nível detectado como não-repressor 0,2 mg/mL, entretanto, a repressão da síntese de xilanase foi totalmente revertida.

Lemos; Pereira (2002) avaliaram os efeitos da adição de xilose e glicose em diferentes concentrações na síntese de xilanase e  $\beta$ -xilosidase por *A. awamori* cultivado em bagaço de cana e observaram repressão gradual da atividade endo-xilanásica à medida que a concentração destes açúcares era aumentada: a produção de xilanase de 125 U/mL sem adição de açúcar decaiu para 20 U/mL com adição de 4g de xilose). A produção de  $\beta$ -xilosidase foi estimulada, porém, quando baixos níveis de açúcares foram utilizados (1 g de xilose ou glicose/ 4 g de bagaço de cana).

A adição de maltose ao meio de cultivo levou a um aumento da atividade da enzima xilanase por Sater; Said (2001) com *T. harzianum* em SSF, sendo que a frutose e a lactose apresentaram repressão enzimática. De Souza et al. (2001), em cultivos de *A. tamarii* em farelo de trigo tiveram com maltose maior atividade. Peixoto et al. (2003), apesar de obterem maior biomassa de *R. microsporus* em meio contendo maltose não tiveram indução da enzima amilase por este fungo em meio adicionado deste açúcar. Sendo que Kheng; Ibrahim (2005) obtiveram resultados semelhantes em cultivos de *A. niger* USM A1 I. O mesmo efeito repressor da maltose foi relatado por Seyis; Aksoz (2005a), na síntese de xilanase por *T. harzianum*, sendo a maior atividade obtida nos cultivos sem adição de nenhuma outra fonte de carbono.

Shah; Madamwar (2005), nos cultivos de *A. foetidus* em substratos sólidos, avaliaram também a adição de vários açúcares ao meio e a maior atividade foi com 1% de xilano (59,0 U/mL). Todos os açúcares testados promoveram repressão catabólica (glicose, lactose, xilose). Ahmed et al. (2003) avaliando a produção de celulase e xilanase por *T. harzianum* constataram que quando a glicose foi usada como fonte de carbono, a produção destas enzimas foi inibida e quando xilano ou CMC foi usado, a produção destas enzimas aumentou significativamente. A indução de xilanases por xilano foi também relatada por Rouvinen (1992) com *Trichoderma reesei*, Bahkali et al. (1995) com *Verticillium tricorpus*, Singh et al. (1995) com *F. oxysporum*, MacCabe et al. (1996), em cultivos de *A. nidulans*; Gawande; Kamat (2000) com *Aspergillus* sp, Ahmed et al. (2003) com *T. harzianum* e Torronen; Rawashdeh et al. (2005) com *Streptomyces* sp. A lactose foi empregada com sucesso por Haltrich et al. (1996) para produção de xilanase por *S. commune* e por *T. reesei* Rut C-30.

O efeito repressor da CMC em cultivos para produção de xilanase é descrito por vários autores, tais como Bahkali et al. (1995) com *Verticillium tricorpus*, Ahmed et al. (2003) com *T. harzianum* e Rawashdeh et al. (2005) com *Streptomyces* sp. Segundo Ruiz-Arribas et al. (1997), a baixa produtividade de xilanase, quando CMC é adicionado ao meio talvez seja devido à possível produção de carbometilcelulase que pode hidrolisar a carbometilcelulose (CMC) a celobiose, que tem efeito repressor na síntese de xilanase.

### 2.3.3.3 - Tempo de cultivo

A produção de xilanases atinge o máximo de forma relativamente gradativa e decai de forma brusca sendo que o período de cultivo necessário para que o fungo atinja o máximo de sua produção varia com o microrganismo avaliado. Segundo Kulkarni; Shendye (1999), as xilanases se expressam geralmente no fim da fase exponencial e este tempo é correlacionado com o meio de cultivo e segundo Haq et al. (2004), a queda brusca da atividade enzimática pode ser devido ao rápido consumo do substrato na fase exponencial que resulta em falta do mesmo para manutenção da síntese enzimática.

Estão discriminados na tabela 9 os tempos de cultivo para produção máxima de xilanases descritos por diversos autores para diversos fungos.

**Tabela 9** - Tempos de cultivo para produção máxima de xilanases citadas por diversos autores para diversos fungos

Linhagem	Período de incubação (dias)	Referência
<i>P. janthinellum</i>	10	Adsul et al. (2004)
<i>A. terreus</i>	4	Ghanem et al. (2000)
<i>A. terreus</i>	2	Gawande; Kamat, (2000)
<i>A. niger</i>	3	Gawande; Kamat, (2000)
<i>A. niger</i>	2	Haq et al. (2004)
<i>A. niger</i>	2	Khan et al. (2003)
<i>A. awamorii</i>	4	Lemos; Pereira (2002)
<i>P. ostreatus</i>	7	Qinnghe et al. (2004)
<i>Streptomyces</i> sp	4	Rawashdeh et al. (2005)
<i>T. harzianum</i>	7	Seyis; Aksoz (2005a)
<i>T. harzianum</i>	8	Sater; Said (2001)

#### 2.3.3.4 - Temperatura

Os cultivos de fungos efetuados em alta temperatura afetam a germinação dos esporos, o crescimento celular e a formação de produtos, ao passo que temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento dos microrganismos e a outras reações bioquímicas, assim como a produção enzimática (HASAN et al., 1998).

Geralmente, a temperatura ótima para produção enzimática é a que corresponde à temperatura do habitat natural de onde o microrganismo foi isolado, entretanto, não constitui uma regra, pois nem sempre a melhor temperatura de crescimento de um fungo é a melhor para produção enzimática (KHENG; IBRAHIM, 2005), sendo que a melhor faixa de temperatura varia de 20° C a 30° C (RAHMAN et al., 2003). Na tabela 10 estão apresentadas temperaturas ótimas para produção de xilanases por diversos autores para diversos fungos:

**Tabela 10** - Temperaturas ótimas para produção de xilanases citadas por diversos autores para diversos fungos

Linagem	Temp. (°C)	Referências
<i>T. reesei</i>	25	Bradner et al. (1999)
<i>T. reesei</i>	37	Haltrich et al. (1996)
<i>A. niger</i>	30	Haq et al. (2004)
<i>A. sulphureus</i>	33°	Lu et al. (2003)
<i>T. harzianum</i>	35	Sater; Said (2001)
<i>A. foetidus</i>	30	Shah; Madamwar, (2005)
<i>T. reesei</i>	30	Suh et al. (1988)
<i>A. niger</i>	27	Yuan et al. (2005)

### 2.3.3.5 - Concentração de esporos

Uma concentração de esporos muito baixa pode acarretar uma menor produção de micélio levando a uma menor eficiência na assimilação das fontes de carbono e nitrogênio (MEYRATH; MACINTOSH, 1963) e uma concentração muita elevada pode acarretar uma diminuição na velocidade específica do consumo de oxigênio e com isto afetar a síntese enzimática (BROWN et al., 1978). Segundo Sikyta et al. (1983) a concentração de esporos, utilizada nos cultivos de fungos filamentosos para produção enzimática, deve ser suficiente para colonizar todas as partículas do substrato. Mas, quando em alta ou baixa concentração pode acarretar a inibição da germinação e desenvolvimento (GHANEM et al., 2000).

Segundo Qinnghé et al. (2004), a concentração de esporos ótima em cultivos de fungos para produção enzimática geralmente se encontra entre  $10^6$  a  $10^7$  esporos/mL. Na tabela 11 estão apresentadas concentrações de esporos com as quais diversos autores obtiveram a máxima produção de xilanase por diversos fungos.

**Tabela 11** - Concentrações de esporos citadas por diversos autores para produção máxima de xilanase por diversos fungos

Linhagem	Conc. Esporos /mL	Referências
<i>T. lanuginosus</i>	10 <sup>6</sup>	Damaso et al. (2000)
<i>Aspergillus</i> sp	1 x 10 <sup>6</sup>	Gawande; Kamat (2000)
<i>A. terreus</i>	1,2 x 10 <sup>4</sup>	Ghanem et al. (2000)
<i>Penicillium</i> sp	10 <sup>6</sup>	Jorgensen et al. (2005)
<i>F. oxysporum</i>	1,0 x 10 <sup>7</sup>	Kuhad et al. (1998)
<i>T. aurantiascus</i>	10 <sup>4</sup>	Palma (2003)
<i>T. lanuginosus</i>	10 <sup>7</sup>	Sonia et al. (2005)
<i>T. harzianum</i>	1,5 x 10 <sup>6</sup>	Seyis; Aksoz, (2005a)

### 2.3.3.6 - pH

Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido (PANDEY, 2003) o controle e monitoramento deste parâmetro, durante as SSF's, não é fácil de ser realizado. De acordo com Demain et al. (1986) a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH. Na maioria dos casos mede-se o pH após colocar, em suspensão, uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Este método permite medir o pH global, todavia não é totalmente representativo dos valores de pH nos micro ambientes localizados no filme aquoso, onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Sendo assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo (MITCHELL et al., 2000) ressaltam que, devido a este fato, é impossível realizar um controle fino do pH em SSF.

Segundo Wainwright et al. (1993), o pH do meio de cultura atua nas alterações eletrostáticas da superfície dos esporos, determinando sua dispersão e germinação, sendo que durante o curso da fermentação a fonte de nitrogênio pode afetar significativamente no PH no meio (HAAPALA et al, 1994). Mas geralmente pHs



levemente ácidos (5 a 6,5) favorecem a produção de xilanases por fungos (BAJPAI, 1997). Na tabela 12 estão apresentados pHs ótimos para produção de xilanases por diversos autores para diversos fungos:

**Tabela 12** - pHs ótimos para produção de xilanases por diversos fungos citados por diversos autores.

Linagem	pH	Referências
<i>T. harzianum</i>	5,5	Ahmed et al. (2003)
<i>P. ostreatus</i>	6,0	Burla et al. (1992)
<i>A. versicolor</i>	5,8	Carmona et al. (2005)
<i>A. terreus</i>	6,0	Ghanem et al. (2000)
<i>A. niger</i>	4,5	Haq et al. (2002)
<i>A. niger</i>	5,0	Khan et al. (2003)
<i>P. janthium</i>	5,5.	Milagres et al. (1993)
<i>P. ostreatus</i>	6,0	Qinnghe et al. (2004)
<i>T. harzianum</i>	5,0	Seyis; Aksoz (2005b)
<i>T harzianum</i>	5,0	Silveira et al. (1999)
<i>Thermogota spp</i>	5,0 - 5,5	Simpson (1991)

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - MICRORGANISMOS**

Foram utilizadas linhagens de fungos isoladas de solos em área de caatinga, especificamente da Floresta Nacional Contendas do Sincorá, BA, localizada na micro-região dentro da homogênea Chapada Diamantina Meridional, entre os paralelos 13°46' e 14°0'S e meridianos 41°03' e 10'W., clima estépico, semi-árido quente com precipitação média anual de 500 a 700 mm, com período chuvoso entre os meses de outubro e novembro e de março a abril e solos com predominância dos pedzólicos vermelho amarelo. A primeira coleta foi efetuada no fim do período chuvoso (novembro) e a segunda no início do período seco (março).

#### **3.2 - COLETA DE MATERIAL**

##### **3.2.1 - Procedimentos para a coleta**

As amostras compostas de solo foram obtidas através de coletas (com três repetições), retiradas de 0 a 15 cm de profundidade, eliminando-se previamente a

serrapilheira. A primeira coleta foi efetuada no início do período chuvoso (final de março) e a segunda no período seco (final de dezembro). A área foi pontuada aleatoriamente e sorteados três pontos para coleta. Cada amostra composta de solo foi constituída de três sob - amostras, coletadas de cada ponto sorteado, que foram misturadas para maior homogeneização e em seguida colocadas em saco de polietileno. Uma alíquota de cada uma das amostras compostas de solo foi acondicionada em lata de alumínio esterilizada a 105°C, por 24 horas e previamente tarada e selada com fita adesiva.

### **3.2.2 - Parâmetros determinados durante as coletas de solo**

#### **3.2.2.1 - Temperatura do ar (°C)**

Durante as coletas a temperatura do ar foi medida em cada estação de coleta com auxílio de termômetro de mercúrio.

#### **3.2.2.2 - Temperatura do solo até 15 cm de profundidade (°C)**

Em cada estação de coleta foi medida a temperatura do solo a 15 cm de profundidade com auxílio de termômetro de haste metálica. As medidas das temperaturas do solo foram realizadas utilizando-se termômetro de haste com proteção metálica, durante as coletas de amostras do solo.

#### **3.2.2.3 - Teor de umidade (%) do solo**

No laboratório, as latas foram imediatamente pesadas, para se obter o peso úmido das amostras. A seguir, foram colocadas em estufa a 105°C por 24 horas, quando então foram retiradas, colocadas em dessecador e imediatamente pesadas para se obter o peso constante. O teor de umidade do solo foi determinado segundo Mclean; Cook (1968), onde o teor de umidade é calculado pela diferença entre o peso seco e úmido, dada em porcentagem de água do solo, com base no valor percentual hídrico sobre o peso seco.

#### **3.2.2.4 - Determinação do pH, matéria orgânica e macronutrientes do solo.**

Parte da amostra padrão foi utilizada para análise e determinação de: matéria orgânica, pH, fósforo solúvel ( $\text{PO}_4^{-3}$ ); potássio ( $\text{K}^+$ ); cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ); magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ) e acidez potencial ( $\text{H}^+ + \text{Al}^{+3}$ ). A soma de bases (SB) foi obtida após a soma dos teores de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , sendo a capacidade de troca de cátions (CTC), calculada da SB e ( $\text{H}^+ + \text{Al}^{+3}$ ), e a saturação de bases, calculada da divisão da SB pela CTC x 100. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Solos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Vitória da Conquista, BA, pelo Manual de Métodos de análises de solo da Embrapa.

### **3.3 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DAS AMOSTRAS DE SOLO**

#### **3.3.1 - Procedimentos para o isolamento**

Parte da amostra de solo padrão foi usada para o cultivo, isolamento e identificação dos fungos filamentosos presentes. O processo de cultivo e isolamento foi feito pela técnica da diluição em série (CLARK, 1965).

Da amostra padrão foram retirados 200 gr de solo, colocados em cadinho de porcelana e triturados, sendo depois peneirados (peneira de 2 meshes) para outro cadinho, de onde foi retirado 1 g do solo e colocado em tubo de ensaio esterilizado e identificado, contendo 9 mL de solução salina 0,85%, constituindo-se a "solução mãe". Este tubo foi agitado (agitador elétrico) para que os fungos agregados ao solo fossem liberados para a solução. Foi retirado 1mL da solução mãe e adicionado em outro tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85%, obtendo-se uma diluição com concentração  $10^{-1}$  do inóculo; para se obter a diluição  $10^{-2}$ , 1 mL da suspensão diluída foi transferida para outro tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85%, e assim sucessivamente até se atingir a diluição  $10^{-8}$ .

Para inoculação, 0,1 mL de cada diluição foi transferido asépticamente e distribuído homogeneamente, sobre os meios de cultura sólidos, contidos em placas de

Petri, sendo o inóculo espalhado sobre a superfície do mesmo com alça de Drygalski estéril. As inoculações foram efetuadas com as diluições de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ , pois foram as mais desejáveis. Os meios de cultura utilizados foram: Agar Sabouraud; meio Extrato de Malte; meio de Martin; meio sintético para Mucor (Zigomycetos), meio Rosa Bengala e meio Agar Batata Dextrose, adicionados de 500 mg/L de Tetramed para inibição de contaminação bacteriana. Tais procedimentos foram realizados em triplicata, sendo os meios ajustados com pH 7 e 5. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, em temperaturas de 35°C e de 45°C, durante 5 dias.

### **3.3.2 - Quantificação do número total de colônias**

Após o tempo de incubação, as colônias que se desenvolveram sobre o meio de cultura, foram contadas pelo lado reverso das placas de Petri, marcando-se um ponto com caneta de retro projetor sobre cada unidade. O número de colônias contadas foi multiplicado pelo valor da diluição correspondente, obtendo-se assim, o número total de colônias por grama de solo.

### **3.3.3 - Identificação e manutenção dos fungos filamentosos isolados**

Após a contagem do número de colônias, as mesmas foram isoladas e purificadas, transferindo-se frações de cada tipo de colônia para um novo meio de cultura, meio de batata dextrose (DIFCO LABORATORIES, 1972), sendo as placas incubadas na temperatura mais desejável (35°C ou 45°C-conforme melhor temperatura indicada no isolamento inicial), por cinco dias. Após crescimento de colônias, as mesmas foram transferidas para tubos com agar extrato de malte, e novamente incubadas conforme descrito anteriormente. Das linhagens isoladas, 37 foram identificadas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Cavalcanti, da Universidade Federal de Pernambuco, 5 linhagens pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracema Helena Schoenlein-Crusius, do Instituto Botânico-SP, e outras 5 por André Rodrigues mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada) sendo a identificação efetuada através de métodos microscópicos e bioquímicos. Várias linhagens não foram identificadas por inexistência de chaves específicas para fungos de solo de área de clima tropical. A cada

dois meses foram efetuados repiques das linhagens isoladas, em tubos com Agar extrato de malte, sendo os mesmos conservados a 4°C.

### **3.4 - CULTIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

#### **3.4.1 - Seleção preliminar dos fungos produtores de xilanase**

Colônias dos fungos isolados foram repicadas individualmente em tubos de ensaio contendo meio de Vogel sólido (VOGEL, 1956) adicionado de xilano 1% (v/w), pH 5,0. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 35°C e 45°C, por cinco dias. As linhagens que apresentaram crescimento foram selecionadas como produtoras de xilanase.

#### **3.4.2 - Padronização do inóculo para cultura**

Solução de Tween 80 a 0,1% (T80) foi adicionada em tubos com colônias crescidas em meio de extrato de malte agar, durante 7 dias a 35°C, sendo a superfície do cultivo suavemente raspada com estilete estéril. Esta suspensão foi filtrada em gaze estéril, e uma alíquota foi colocada em câmara de Neubauer para contagem dos esporos ao microscópio óptico. A solução, se necessário, foi ajustada de modo que a contagem de esporos ficasse próxima do desejável, concentrando-a com mais inóculo ou diluindo-a com solução T80. Os meios de fermentação foram inoculados, com a suspensão de esporos na concentração desejada.

#### **3.4.3 - Avaliação de produção de biomassa de fungos filamentosos**

**3.4.3.1 - Cultivo de fungos filamentosos pelo Método Turbidimétrico Automatizado-Labsystems Bioscreem C, em diferentes fontes de carbono.**

O aparelho Bioscreen C consiste de um espectrofotômetro contendo duas câmaras (placas) estéreis, cada uma contendo 100 células de cultivo, onde os microcultivos são realizados, produzindo turbidez proporcional ao crescimento celular no meio de cultura. O aparelho permite que sejam pré-determinados os parâmetros cinéticos que se deseja no experimento: comprimento de onda para leitura das densidades ópticas (OD), tempo de cultivo, temperatura, tipo e frequência de agitação e frequência das leituras de absorvância das células. O software converte automaticamente as medidas da absorvância em curvas de crescimento que são analisadas em um computador acoplado.

O meio de cultura base utilizado foi extrato de malte líquido a 1%, distribuído em vidros penicilina e acrescidos individualmente das seguintes fontes de carbono a 1% (w/v): lactose, sacarose, maltose, glicose, glicerol, sorbitol, frutose, xilose e galactose. Os vidros foram selados, etiquetados e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos, como os demais instrumentos utilizados no processo.

Foram adicionados individualmente às células da câmara de cultivo, 40µl de uma suspensão de esporos na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos/mL do fungo analisado, 360 µL das referidas fontes de carbono, em quintuplicata. Nas células controles, foram adicionados 400 µL de cada fonte de carbono. As placas foram colocadas no Bioscreen C, que foi então calibrado para que operasse segundo os seguintes parâmetros: T° C de 35°C, leitura de absorvância a 540 nm (comprimento de onda previamente determinado), intervalo entre leituras de 4 horas, tempo total do experimento de 60 horas, agitação média das células 10 segundos antes de cada leitura. As leituras de OD automáticas foram enviadas para computador acoplado, no qual os resultados foram obtidos após as 60 horas, sendo então determinadas curvas de crescimento das linhagens de fungos nas referidas fontes de carbono.

#### **3.4.3.2 - Cultivo de *Aspergillus niger* e *Rhizopus microsporus* pelo Método Tradicional em diferentes fontes de carbono**

A produção de biomassa de *Aspergillus niger* e *Rhizopus microsporus* foi avaliada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de extrato de levedura 1 %, suplementados das mesmas fontes de carbono 1% utilizadas nos cultivos destes

fungos pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C) As fontes de carbono foram: lactose, sacarose, maltose, glicose, glicerol, sorbitol, frutose, xilose e galactose. Os vidros foram selados, etiquetados e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos, 1 atm, como os demais materiais utilizados no processo. Foram adicionados individualmente aos frascos 5,0 mL de solução de esporos na concentração  $1 \times 10^7$  esporos/mL em triplicata, pH 5,0.

Os frascos permaneceram sob agitação a 150 rpm, a 35°C, por cinco dias. As biomassas das linhagens foram separadas através de filtração a vácuo em papéis de filtro Whattman n.1, e colocadas em estufa a 80°C até obtenção do peso constante, determinado gravimetricamente em balança analítica.

#### **3.4.4 - Cultivo de fungos filamentosos para avaliação da atividade enzimática**

##### **3.4.4.1 - Cultivo dos fungos para produção de xilanase em meios sólidos**

Os substratos utilizados para fermentação sólida foram os meios de farelo de trigo (MFT) (YOSHIOKA et al., 1981) e de farelo de soja (MFS). Para o preparo do meio farelo de trigo foram adicionados 5 gr de farelo de trigo e 5 mL de água destilada em frascos Erlenmeyers de 250 mL (triplicata), e para o preparo do meio farelo de soja foram utilizados 10 gr de farelo de soja triturado e 5 mL de água destilada. O pH dos meios foi ajustado em 5,0. Os meios foram homogeneizados, sendo os frascos tamponados e esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos. A partir de colônias crescidas em meio agar extrato de malte, durante 7 dias a 35°C, foram preparadas soluções de aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporos por mL em solução de Tween 80 a 0,1% (T80). Alíquotas de 1mL (YOSHIOKA et al., 1981; RODRIGUES, 1987) foram utilizadas para inocular os frascos Erlenmeyers contendo MFT e MFS, em triplicata. Os frascos permaneceram incubados a 25°C e 35°C, por 5 dias.

##### **3.4.4.2 - Cultivo dos fungos para produção de xilanase em meio sólido e líquido acrescidos de outras fontes de carbono**



Frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo individualmente 5 g de farelo de trigo e 10 g de farelo de soja foram acrescidos individualmente de 5 mL de solução a 1% da melhor fonte de carbono para crescimento determinado pelo Bioscreen-C, 5 mL de solução de xilano e 5 mL de solução de carbometilcelulose 1% (v/w), pH 5,0,0. Frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio de Vogel (VOGEL, 1956) receberam o mesmo tratamento. A partir de colônias crescidas em meio Agar extrato de malte, durante 7 dias a 35°C, foram preparadas soluções de aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporos por mL em solução de Tween 80 a 0,1% (T80). Alíquotas de 1mL (YOHIOKA et al. 1981; RODRIGUES, 1987) foram utilizadas para inocular os frascos Erlenmeyers contendo MFT e MFS, em triplicata. Os frascos com meio sólido permaneceram incubados a 25°C e 35°C por 5 dias e os frascos contendo meio líquido receberam o mesmo tratamento permanecendo sob agitação a 125 rpm,

#### **3.4.4.3 - Cultivo de *Aspergillus japonicus* e *Trichoderma viride* em Meio Farelo de Trigo em diferentes temperaturas**

Frascos Erlenmeyers (triplicata) contendo MFT, pH 5,0, 0, foram inoculados individualmente com solução de esporos na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos/mL de *Aspergillus japonicus* e incubados a 20; 25; 35 e 40°C, por 120 horas. Os mesmos procedimentos foram realizados com esporos de *Trichoderma viride*, adicionando-se ao meio sorbitol 1%.

#### **3.4.4.4 - Cultivo de *Aspergillus japonicus* e *Trichoderma viride* em Meio Farelo de Trigo em diferentes períodos de incubação**

Frascos Erlenmeyers (triplicata), contendo MFT, pH 5,0, 0, foram inoculados individualmente com solução de esporos na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos/mL de *Aspergillus japonicus* e incubados a 25°C por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Os mesmos procedimentos foram realizados com esporos de *Trichoderma viride*, adicionando-se ao meio sorbitol 1%.

#### **3.4.4.5 - Cultivo de *Aspergillus japonicus* e *Trichoderma viride* em Meio Farelo de Trigo com diferentes concentrações de inóculo**

Frascos Erlenmeyers (triplicata) contendo MFT, pH 5,0, 0, foram inoculados com solução de esporos de *Aspergillus japonicus* nas concentrações de  $2 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  e  $4 \times 10^7$  esporos/ mL e incubados a 25°C, por 120 horas. Os mesmos procedimentos foram realizados com esporos de *Trichoderma viride*, adicionando-se ao meio sorbitol 1%, incubando-se por 144 horas.

### **3.5 - OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO**

Após o período de incubação, foram adicionados aos frascos de cultura em meio colido, 30mL de água destilada a 4°C. A suspensão foi homogeneizada com uma espátula e após 3h a 4°C o extrato foi separado através de filtração a vácuo com papel de filtro Wattman- 1, permanecendo congelado até o momento da análise em frascos de vidro tampados e previamente rotulados (YOHIOKA et al., 1981; RODRIGUES, 1987). Os cultivos em meio líquidos também foram filtrados a vácuo e os filtrados das culturas foram designados como fonte bruta de enzimas extracelulares.

### **3.6 - DETERMINAÇÃO DAS CURVAS PADRÃO DE XILOSE**

Em tubos de ensaio, foram adicionados na seqüência, em duplicata, os respectivos volumes de solução tampão acetato de sódio 0,05M, solução estoque de xilose e ácido 3,5 dinitro salicílico (ADNS), de acordo com a tabela 13:

**Tabela 13** - Volumes das soluções utilizadas para determinação das atividades enzimáticas por tubo de reação.

Tubos	Volume (mL)		
	Solução tampão	Solução de açúcar	ADNS
0	1,0	0,0	1,0
1	0,9	0,1	1,0
2	0,8	0,2	1,0
3	0,7	0,3	1,0
4	0,6	0,4	1,0
5	0,5	0,5	1,0
6	0,4	0,6	1,0
7	0,3	0,7	1,0
8	0,2	0,8	1,0
9	0,1	0,9	1,0
10	0,0	1,0	1,0

Legenda: solução tampão acetato de sódio 0,05 M; Sol. de açúcar = 0,1% de xilose; ADNS = ácido 3,5 dinitrosalicílico.

Os tubos foram agitados, aquecidos durante 5 min em Banho-Maria a 100°C, rapidamente resfriados em água corrente e adicionados de 10 mL de água destilada. Após homogeneização, as leituras das respectivas absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro, modelo Cintra 20, da GBC, em  $\lambda$  de 540nm, tendo o tubo 0 como referência. As curvas padrões de xilose foram traçadas tomando micro moles ( $\mu\text{mols}$ ) nas abscissas e a média das leituras de absorbância (540 nm), nas ordenadas.

### 3.7 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE XILANASE

A atividade de xilanase foi determinada pelo método de Miller (1959) através da quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilano “birchwood” (Sigma), conforme descrito por Bailey et al. (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo

método do ácido 3,5 dinitro-salicílico, também chamado Reagente de Summer (MARTINELLI; PANEK, 1968).

A solução de xilano foi preparada a partir de 1 g de xilano (“birchwood” - Sigma) diluída com 80 mL de tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0,0. Em seguida, a solução foi fervida, com agitação ocasional, e o volume acertado para 100 mL, com o mesmo tampão.

A uma bateria de 4 tubos (em duplicata) rotulados sequencialmente com os indicativos R (tubo reação), To (tempo 0), T5 (tempo 5 min.) e T10 (tempo 10 min), foram adicionados 250  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0,0 e 750  $\mu$ L de solução de xilano 1%, permanecendo os tubos R em banho-maria a 50°C por 5 min para equilíbrio térmico.

Após este tempo foram adicionados aos tubos R, 250  $\mu$ L do extrato enzimático bruto da cultura a ser analisada perfazendo um volume final de 1,25 mL. Após homogeneização, foi transferida uma alíquota de 250  $\mu$ L para o tubo To contendo 250  $\mu$ L de ADNS

Os tubos R foram sendo agitados a cada 2 minutos e novas amostras de 250  $\mu$ L foram sendo retiradas após 5 min. (T5) e 10 min. (T10) min, procedendo de modo idêntico ao To. Todos os tubos, após desenvolverem a cor em banho-maria de água fervente por 5 min, foram rapidamente resfriados em banho de água fria e adicionados de 2,5 mL de água destilada. Os tubos foram homogeneizados e as leituras de absorbância foram determinadas em  $\lambda$  de 540nm contra o branco (To) (RODRIGUES, 1987; CARMONA, 1995).

O resultado da atividade enzimática deve estar em concordância com a reta traçada da curva padrão de xilose. Caso isto não ocorra, deve-se adequar o volume de extrato enzimático na reação adequando-se também o volume de solução tampão, de modo à sempre se obter um volume de 500  $\mu$ L.

### **3.8 - UNIDADE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um  $\mu$ mol de xilose por mL por min nas condições de

ensaio. A seguinte fórmula foi usada para calcular as unidades de atividade enzimática em  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ :

$$U = Abs_{\text{média}} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{V_i} \times 10^3 \times V_f$$

Onde:

*Abs*: absorvância média

$\epsilon$ : absortividade da xilose: a (coeficiente obtido da reta padrão da xilose) x M (massa molecular da xilose)

t: tempo de reação em minutos (5 min. e 10 min)

$V_i$ : volume usado do extrato enzimático bruto

$10^3$ : conversão de mg para  $\mu\text{gr}$

$V_f$ : volume final da reação

### 3.9 - DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se soro albumina bovina como padrão, em triplicata, usando-se brancos apropriados.

## **4- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 - COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLO DE ÁREA DE CAATINGA E ANALISE DE ALGUNS PARÂMETROS AMBIENTAIS.**

O clima constitui a característica mais marcante do semi-árido brasileiro, principalmente devido a ocorrências das secas estacionais e periódicas. O regime pluviométrico delimita duas estações: uma estação chuvosa que vai de janeiro a maio, e uma longa estação seca que vai de junho a dezembro.

Entretanto, especificamente na região da unidade de conservação “Floresta Nacional Contendas do Sincorá” (Chapada Diamantina), tradicionalmente existem as chamadas “chuvas das águas”, que ocorrem por volta do mês de março e mês de novembro. Desta forma, foram realizadas duas coletas de solo, sendo a primeira no final do período seco (início de março) e a segunda em novembro (final do período chuvoso).

Durante as coletas, foram efetuadas as medidas de temperatura do ar e do solo, sendo determinado posteriormente, em laboratório, o pH e o teor percentual da umidade das amostras (Tabela 14). No Laboratório de Solos (UESB, BA, Brasil) foi efetuada a análise quantitativa da matéria orgânica e macros nutrientes (Tabela 15).

**Tabela 14** - Temperatura do ar, solo e percentual de umidade

Coleta	Temp. ar-°C	Temp. solo-°C	Teor umidade- %	pH
Março	38	35	2,4	5,0
Novembro	32	28	10,32	5,0

**Tabela 15** - Análise química do solo

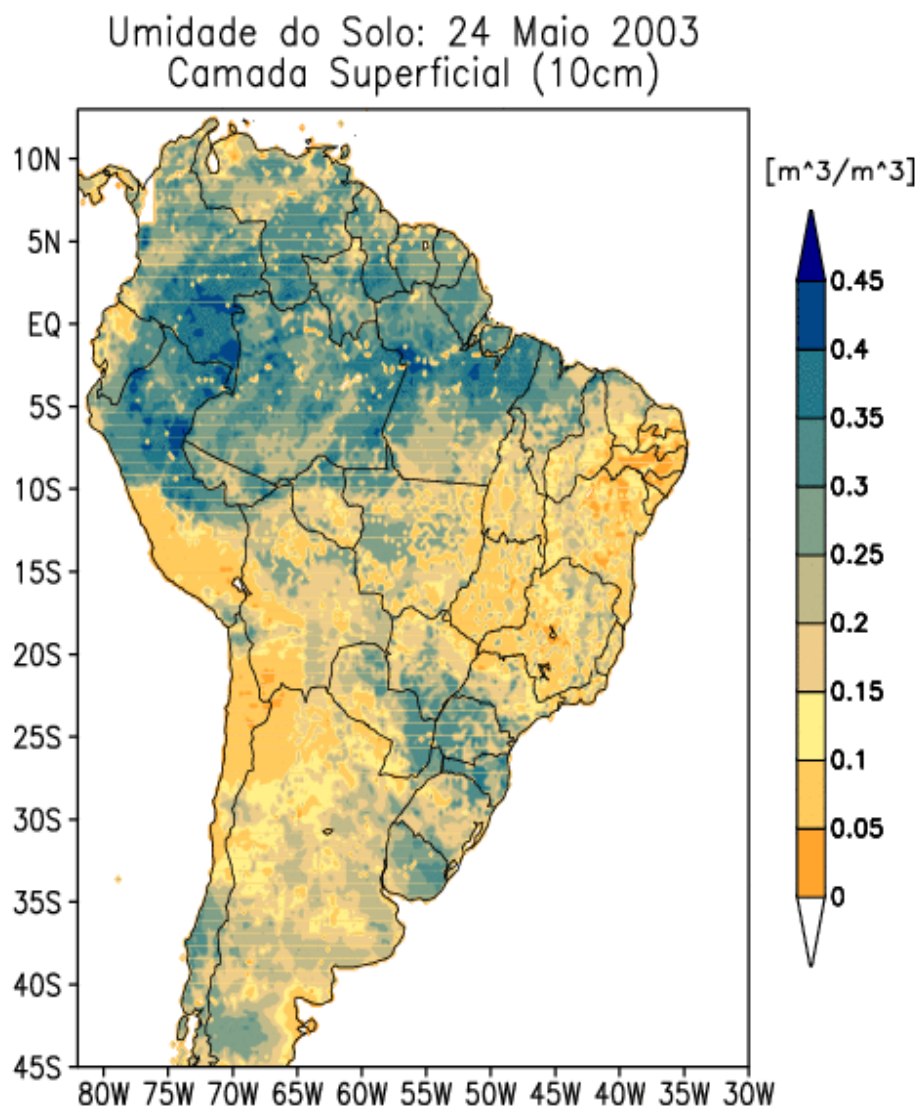
	pH (H <sub>2</sub> O)	P mg/dm <sup>3</sup>	Cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> de solo									% g /dm <sup>3</sup>			
			K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	S.B	t	T	V	m	PST	MO
Am 1	5,1	18	0,66	9,6	3,0	0,0	2,4	-	13,3	13,3	15,7	85	0	-	39
Am 2	4,7	1	0,20	2,7	1,3	0,1	2,8	-	4,2	4,3	7,1	59	2	-	24

\*Análise efetuada pelo Laboratório de Análises de Solos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Vitória da Conquista, BA, pelo Manual de Métodos de análises de solo da Embrapa.

A umidade do solo, embora seja um conceito físico simples, apresenta dificuldades na sua determinação, de forma a se obter um valor representativo devido à inerente variabilidade espacial e temporal das características físicas do solo. Existem várias maneiras de se medir a umidade de um solo, segundo métodos diretos ou indiretos, cada qual apresentando determinada precisão, tempo de resposta e custo do equipamento envolvido.

Através do método gravimétrico, foram realizadas as medidas de umidade gravimétrica das amostras, sendo que o valor obtido na primeira coleta de 2,4% reflete o período seco da estação quando comparado ao valor encontrado no solo coletado na estação chuvosa (10,32%) (Tabela 14).

Em solos de outros biomas brasileiros encontramos umidade média variáveis, como demonstrada na figura 13, onde observamos que na área representativa da caatinga os solos podem apresentar umidade variando de 0 a 15%, sendo que em algumas áreas da região centro-oeste, a umidade pode chegar a quase 50%.



**Figura 13** - Umidade do solo no Brasil na camada superficial de 10 cm de espessura

Observa-se, portanto, que os dados de umidade do solo nas amostras coletadas neste presente estudo, revelam no período seco uma umidade do solo extremamente baixa e seria de se esperar encontrar, uma biodiversidade muito baixa de microrganismos.

Com o objetivo de se obter a maior diversidade possível de fungos, a amostra padrão de solo foi cultivada em diferentes meios de cultura, incubando-se os cultivos à 35° e 45°C, em pH 5,0 e 7,0 para se avaliar as melhores condições de crescimento, procedendo-se então a contagem de UFCs (unidades formadoras de colônias) (Tabela



16). Os relatos dos valores do pH em solos do semi-árido são bastante variáveis. O pH médio, levemente ácido (Tabelas 14 e 15) encontrado nas amostras coletadas neste trabalho, constitui um valor propício para o estabelecimento e desenvolvimento de fungos filamentosos (AHMED et al., 2003; SILVEIRA et al., 1999; MILAGRES et al., 1993; entre outros). Independente dos dados obtidos quanto ao pH, que estão de acordo com o pH ótimo encontrado na literatura, os cultivos foram conduzidos em dois pHs (5,0 e 7,0), para se avaliar “in vitro” os efeitos dos mesmos no crescimento dos fungos do solo. A quantidade de UFCs resultantes dos cultivos da primeira coleta (período seco) nos diferentes meios, temperaturas e pH, foi maior que as obtidas dos cultivos de solo coletado no período chuvoso (segunda coleta) (Tabela 16).

Dados semelhantes foram obtidos por Da Silva (1997), estudando a população de microrganismos em área de caatinga, onde observaram as maiores ocorrências dos microrganismos analisados (fungos, bactérias e algas) na estação seca, comprovando que as comunidades de microrganismos existentes no ecossistema caatinga também se adaptam as condições de baixa umidade. Em pesquisa sobre o número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no estado da Bahia, Silva et al. (2001), observaram também maior quantidade de esporos na estação seca.

**Tabela 16** - Média das UFCs obtidas em cultivos de solo em diferentes meios, a 35°C e 45°C, em pH 5,0,0 e pH 7,0.

Meios	Media das UFCs								
	Dil.*	Primeira Coleta				Segunda Coleta			
		35°C		45°C		35°C		45°C	
		pH							
	5,0	7,0	5,0	7,0	5,0	7,0	5,0	7,0	
Mucor	-2	38	0	0	0	22	0	0	0
	-3	19	0	0	0	15	0	0	0
	-4	10	0	0	0	8	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	R. Bengala	-2	45	15	8	15	31	7	4
-3		6	7,6	6	8	4	1	3	2
-4		4,3	3,6	1	1	3	1	1	1
-5		1	1	0	1	1	0	0	0
-6		1	1	0	0	1	0	0	0
Saboraud		-2	15	2	0	0	9	2	0
	-3	12	1	0	0	7	1	0	0
	-4	4	0	0	0	2	0	0	0
	-5	1	0	0	0	0	0	0	0
	-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	Malte	-2	27	3	1	2	16	3	2
-3		11	1	0	1	9	1	0	0
-4		2	1	0	0	2	0	0	0
-5		1	0	0	0	1	0	0	0
-6		1	0	0	0	0	0	0	0
Martin		-2	32	5,3	0	0	17	4	0
	-3	18	0,6	0	0	7	1	0	0
	-4	7,3	0	0	0	4	0	0	0
	-5	1,3	0	0	0	1,3	0	0	0
	-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	Agar Batata	-2	29	0	20	10	20	0	8
-3		18	0	7	1	13	0	5	1
-4		6	0	1	1	2	0	1	0
-5		0	0	0	0	0	0	0	0
-6		0	0	0	0	0	0	0	0

Dil.\*: diluição

Segundo Souto et al. (2005), pesquisando as populações microbianas no semi-árido Paraibano, o aumento da umidade do solo em abril (início do período chuvoso) promoveu uma sensível queda na população fúngica, onde um suprimento hídrico maior pode ter contribuído para a redução no fornecimento de oxigênio, favorecendo a redução desses organismos, refletindo na formação de UFC. g<sup>-1</sup> de solo. Segundo Garcia et al. (1994), o baixo teor de matéria orgânica é a principal causa da pouca atividade microbiana em solos de regiões semi-áridas.

Observa-se assim, que as populações de microrganismos são maiores nos meses de menor pluviosidade e que um regime hídrico baixo do solo nessa região exerce pouco efeito na incidência desses organismos, demonstrando que estes são adaptados a essas condições. Não só se observou maior número de colônias obtidas nas amostras coletadas na estação seca, como também na diversidade de gêneros, que estão apresentados na tabela 17.

Observa-se na tabela 17 que nos cultivos da primeiracoleta, foram recuperados do solo 10 gêneros (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Hiphomyceto*, *Fusarium*, *Clamidosporium*, *Humícola*, *Emericellopsis*), sendo que na secundacoleta foram sete (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Actinomycceto*, *Nigrospora* e *Epicocum*). Os gêneros presentes nas duas coletas, entretanto, são diferentes, demonstrando a adaptação das espécies conforme as condições ambientais.

**Tabela 17** - Linhagens de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga nos períodos seco (primeiracoleta) e chuvoso (segundacoleta).

Linhagens - primeira coleta	Linhagens – segunda coleta
<i>Aspergillus aculeatus</i> 4	<i>Actinomiceto</i> 2.14
<i>Aspergillus fumigatus</i> 3	<i>Aspergillus flavus</i> 2.3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 20	<i>Aspergillus flavus</i> 2.12
<i>Aspergillus fumigatus</i> 25	<i>Aspergillus flavus</i> 2.20
<i>Aspergillus fumigatus</i> 27	<i>Aspergillus tamarii</i> 2.19
<i>Aspergillus japonicus</i> 8	<i>Aspergillus</i> sp 2.18
<i>Aspergillus niger</i> 1	<i>Aspergillus</i> sp 2.25
<i>Aspergillus niger</i> 5	<i>Cladosporum</i> sp 2.16
<i>Aspergillus niger</i> 9	<i>Epicoccum</i> sp 2.24
<i>Aspergillus niger</i> 11	<i>Nigrospora</i> sp 2.15
<i>Cladosporum cladosporioides</i> 18	<i>Penicillium lividum</i> 2.6
<i>Emericellopsis minima</i> 22	<i>Penicilium lividum</i> 2.9
<i>Emericellopsis minima</i> 24	<i>P. verruculosum</i> 2.1
<i>Emericellopsis minima</i> 26	<i>P. raciborskii</i> 2.4
<i>Fusarium oxysporum</i> 17	<i>P. brevicompactum</i> 2.8
<i>Humicola</i> sp 19	<i>P. janthinellum</i> 2.10
<i>Hyphomyceto</i> 14	<i>Trichoderma</i> sp 2.2
<i>Mucor circinelloides</i> 7	
<i>Mucor circinelloides</i> 31	
<i>Penicillium implicatum</i> 2	
<i>Penicillium commune</i> 6	
<i>Penicillium</i> sp 15	
<i>R. microsporus</i> 12	
<i>Trichoderma viride</i> 13	

Nas amostras de solo analisadas, foram identificadas as linhagens descritas, de acordo com a época de coleta e as condições de cultivo. Apesar de terem sido usados diversos meios de cultura e condições de cultivo, não se pode esperar refletir em laboratório, as mesmas condições encontradas no ambiente natural dos microrganismos (PALLERONI, 1996), se constituindo geralmente em fator contribuinte para a falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais.

Segundo estudos efetuados pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA (Secretaria de Biodiversidade e Florestas – SBF, Diretoria de Conservação da Biodiversidade – DCBio) sobre o estado atual de conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil, estima-se que a diversidade taxonômica de gêneros/espécies de microrganismos no Brasil é muito limitada e apesar do volume de informações disponíveis na literatura ser abrangente, este grupo de microrganismos apresenta uma grande diversidade de espécies e diversidade genética ainda por ser estudada.

Apesar de existirem coleções de culturas nacionais, poucas possuem os dados informatizados e/ou disponíveis na Internet. A ausência de dados sobre a diversidade de microrganismos no Brasil é marcante e revela o descaso e a falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana, tanto por falta de pesquisadores como pelo desconhecimento de sua importância por parte dos órgãos governamentais (CANHOS; VAZOLER, 2004). O número de linhagens de solo de área de caatinga é bem menor, entretanto, quando comparado às ocorrências de fungos filamentosos descritas no Vale Rio do Rio Mogi, estado de São Paulo (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2001). Os gêneros presentes com maior frequência nas duas coletas, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, são também descritos como os mais frequentes durante a sucessão fúngica no processo de decomposição de folhas (SCHOENLEIN-CRUSIUS, 1993).

#### **4.2 - SELEÇÃO PRELIMINAR DOS FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLO PRODUTORES DE XILANASE**

Este experimento foi desenvolvido para selecionar linhagens potencialmente produtoras de xilanase. Os resultados encontrados encontram-se na tabela 18, onde se observa que dos fungos da coleta no período seco, poucos não apresentaram atividade xilanolítica, sendo este número maior nos fungos da coleta do período chuvoso.

Souto et al. (2005), pesquisaram populações microbianas no semi-árido Paraibano, e constataram que o aumento da umidade do solo no período chuvoso promoveu uma sensível queda na população fúngica, onde um suprimento hídrico maior pode ter contribuído para a redução no fornecimento de oxigênio, favorecendo conseqüentemente a redução desses organismos. Tal fato está de acordo com os dados obtidos neste presente trabalho, onde a quantidade de UFCs e a biodiversidade de fungos obtida nos cultivos efetuados com solo coletado no período seco de março foi bem maior que a encontrada nos cultivos efetuados com solo coletado no período chuvoso de novembro (Tabelas 16 e 17), podendo a atividade metabólica dos fungos ser afetada no período chuvoso, uma vez que não estão adaptados a estas condições.

Das 24 linhagens obtidas do isolamento efetuado na primeira coleta, 8 não apresentaram atividade xilanolítica. Das 17 linhagens obtidas da segunda coleta 10 não apresentaram atividade xilanolítica. Optou-se por esta triagem para se minimizar custos, devido ao número de linhagens que seriam avaliadas. Os que não apresentassem crescimento seriam descartados. Entretanto, não foram e se decidiu apenas avaliar se este método poderia ser fidedigno para trabalhos futuros. Mas, os fungos que realmente não apresentaram crescimento em meio de Vogel com xilano 1% não apresentaram também atividade de xilanase nos cultivos posteriores em MFT, e se apresentaram foi muito baixa. Concluiu-se, portanto ser um bom procedimento de triagem com o objetivo de redução de trabalho e custos.

**Tabela 18** - Seleção preliminar dos fungos produtores de xilanase cultivados em meio sólido de Vogel acrescido de xilano 1%, a 25° C e 35° C, pH 5,0, por 5 dias.

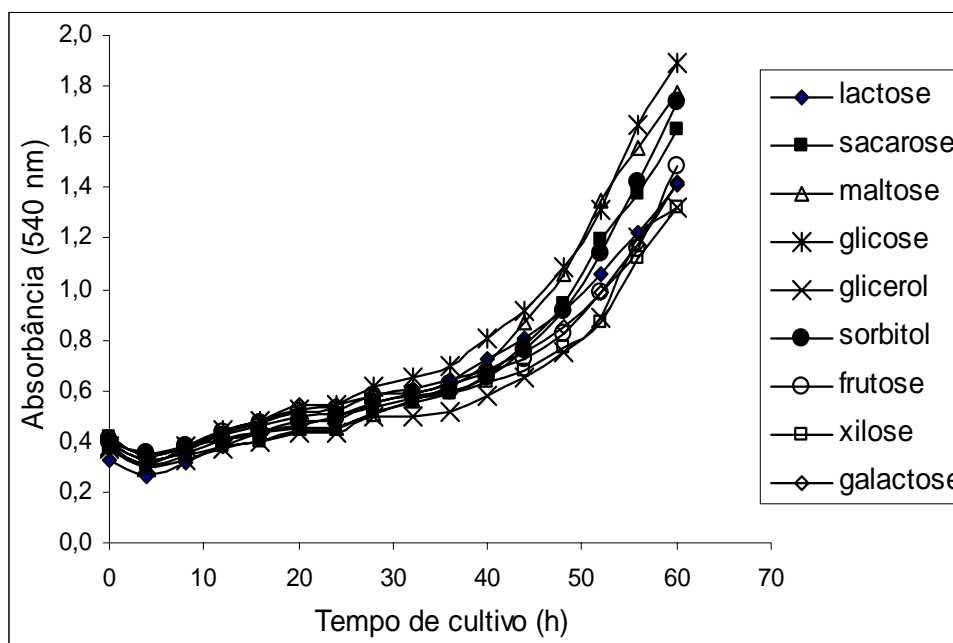
Linhagens – Primeira coleta	Atividade		Linhagens – Segunda coleta	Atividade	
	25° C	35°		25° C	35°
<i>Aspergillus aculeatus</i> 4	P	P	<i>Actinomiceto</i> 2.14	A*	A*
<i>Aspergillus fumigatus</i> 3	A*	P*	<i>Aspergillus flavus</i> 2.3	P*	P*
<i>Aspergillus fumigatus</i> 20	P*	A*	<i>Aspergillus flavus</i> 2.12	P*	P*
<i>Aspergillus fumigatus</i> 25	P*	P*	<i>Aspergillus flavus</i> 2.20	P*	A*
<i>Aspergillus fumigatus</i> 27	A*	P*	<i>Aspergillus tamarii</i> 2.19	P*	A*
<i>Aspergillus japonicus</i> 8	P*	P*	<i>Aspergillus</i> sp 2.18	A*	P*
<i>Aspergillus niger</i> 1	P*	P*	<i>Aspergillus</i> sp 2.25	P*	P*
<i>Aspergillus niger</i> 5	P*	P*	<i>Cladosporium</i> sp 2.16	A*	A*
<i>Aspergillus niger</i> 9	P*	P*	<i>Epicoccum</i> sp 2.24	A*	A*
<i>Aspergillus niger</i> 11	P*	P*	<i>Nigrospora</i> sp 2.15	A*	A*
<i>C. cladosporioides</i> 18	A*	A*	<i>Penicillium lividum</i> 2.6	P*	P*
<i>Emericellopsis minima</i> 22	A*	P*	<i>Penicillium lividum</i> 2.9	P*	P*
<i>Emericellopsis minima</i> 24	A*	P*	<i>P. verruculosum</i> 2.1	P*	P*
<i>Emericellopsis minima</i> 26	A*	P*	<i>P. raciborskii</i> 2.4	P*	P*
<i>Fusarium oxysporum</i> 17	P*	P*	<i>P. brevicompactum</i> 2.8	A*	A*
<i>Hyphomyceto</i> 14	P*	P*	<i>P. janthinellum</i> 2.10	P	A*
<i>Humicola</i> sp 19	A*	A*	<i>Trichoderma</i> sp 2.2	A*	A*
<i>Mucor circinelloides</i> 7	P*	P*			
<i>Mucor circinelloides</i> 31	P*	P*			
<i>Penicillium implicatum</i> 2	P*	P*			
<i>Penicillium commune</i> 6	P*	P*			
<i>Penicillium</i> sp 15	P*	P*			
<i>R. microsporus</i> 12	P*	P*			
<i>Trichoderma viride</i> 13	P*	P*			

P\*: atividade de xilanase presente, A\*: atividade de xilanase ausente.

### 4.3 - CULTIVOS PARA DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

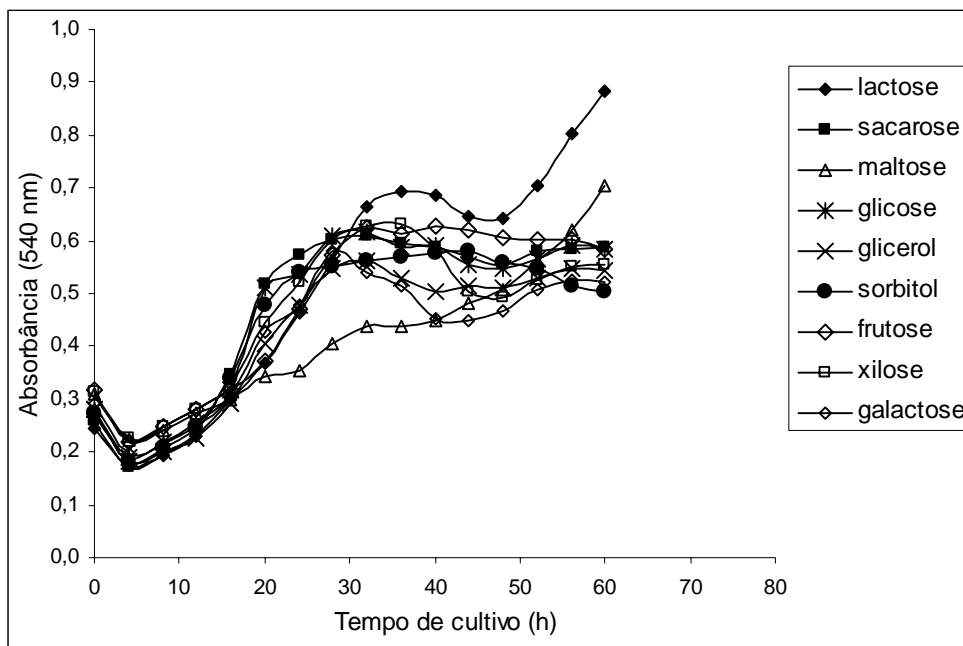
#### 4.3.1 - Determinação da melhor fonte de carbono para crescimento dos fungos filamentosos, através do Método Turbidimétrico Automatizado – Labsystems Bioscreen C

As curvas de crescimento dos fungos foram estão apresentadas nas figuras 14 a 36, sendo um resumo da melhor fonte para produção de biomassa descrita na tabela 19, que se segue:

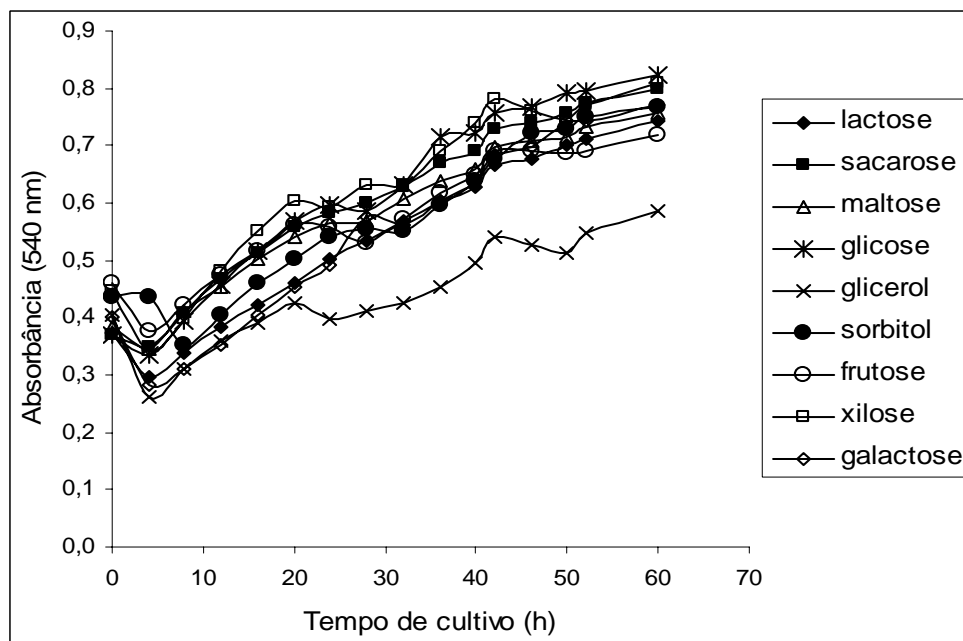


**Figura 14** - Curvas de crescimento de *Aspergillus niger* 1 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)

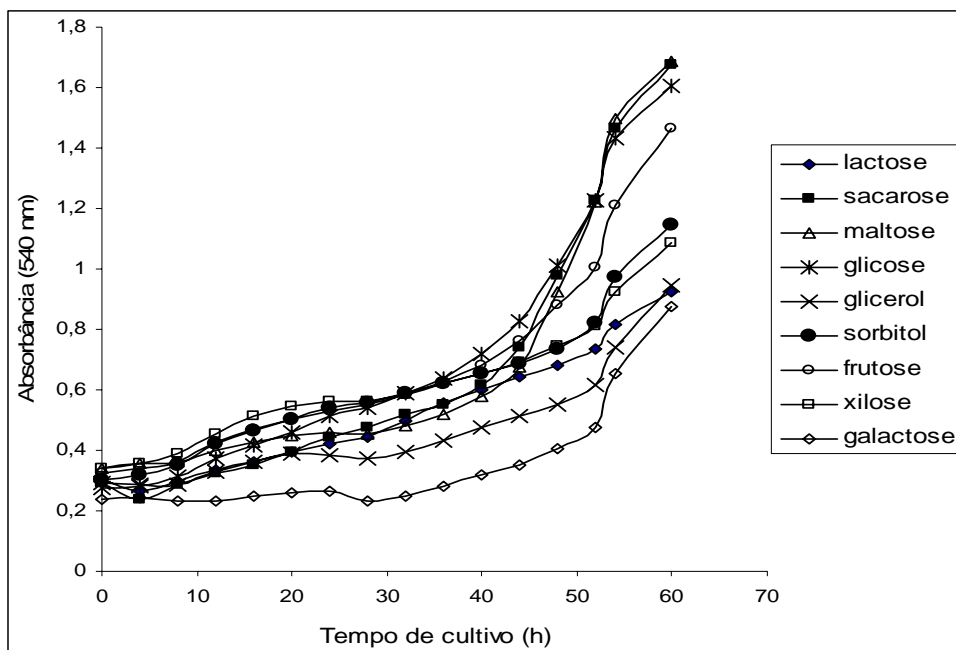




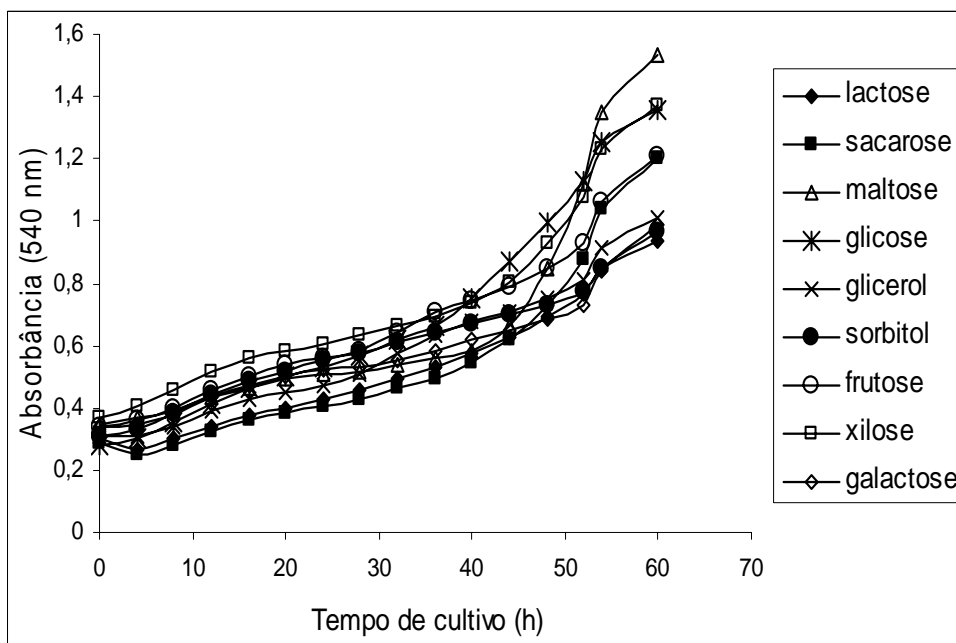
**Figura 15** - Curvas de crescimento de *Penicillium implicatum* 2 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



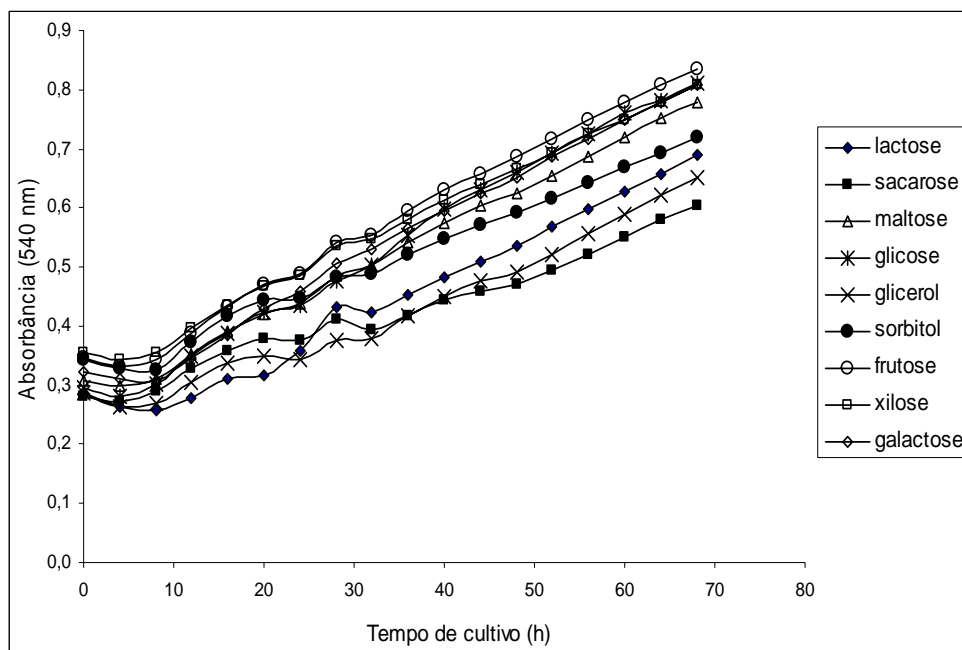
**Figura 16** - Curvas de crescimento de *Aspergillus fumigatus* 3 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



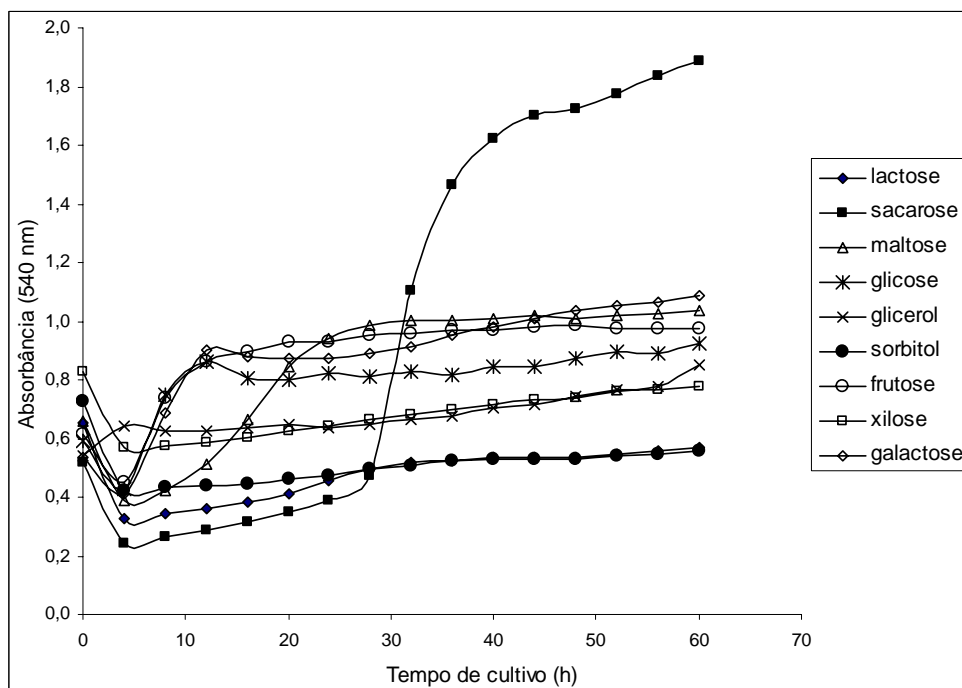
**Figura 17** - Curvas de crescimento de *Aspergillus aculeatus* 4 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



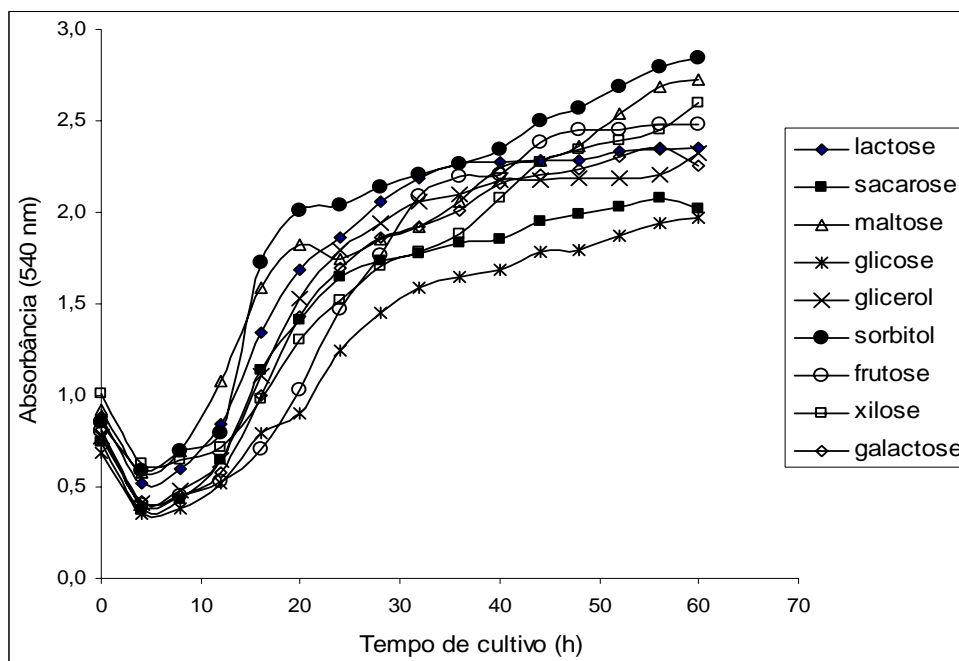
**Figura 18** - Curvas de crescimento de *Aspergillus niger* 5 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



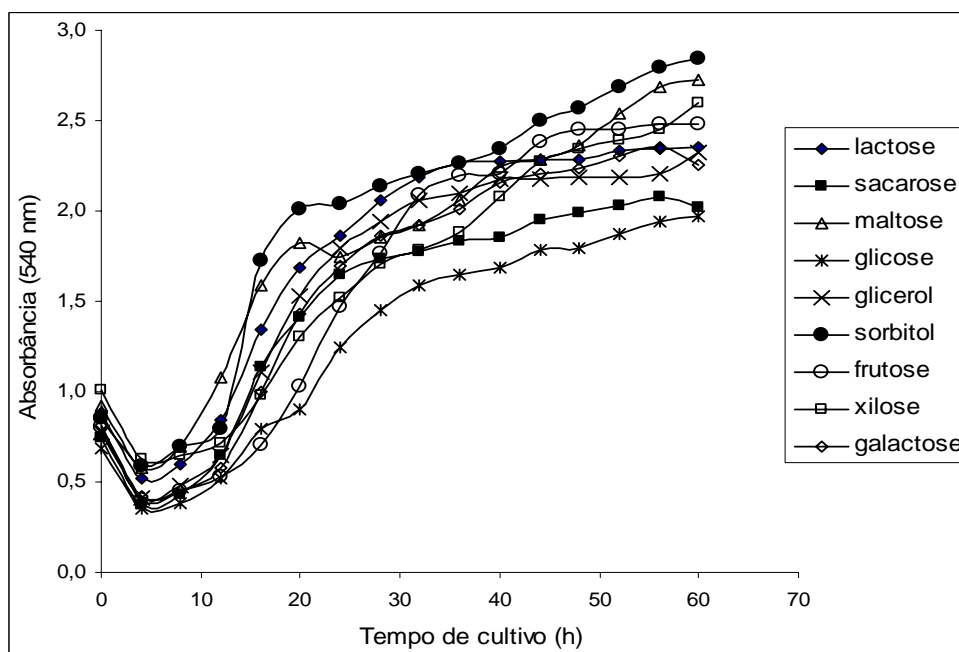
**Figura 19** - Curvas de crescimento de *Penicillium commune* 6 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



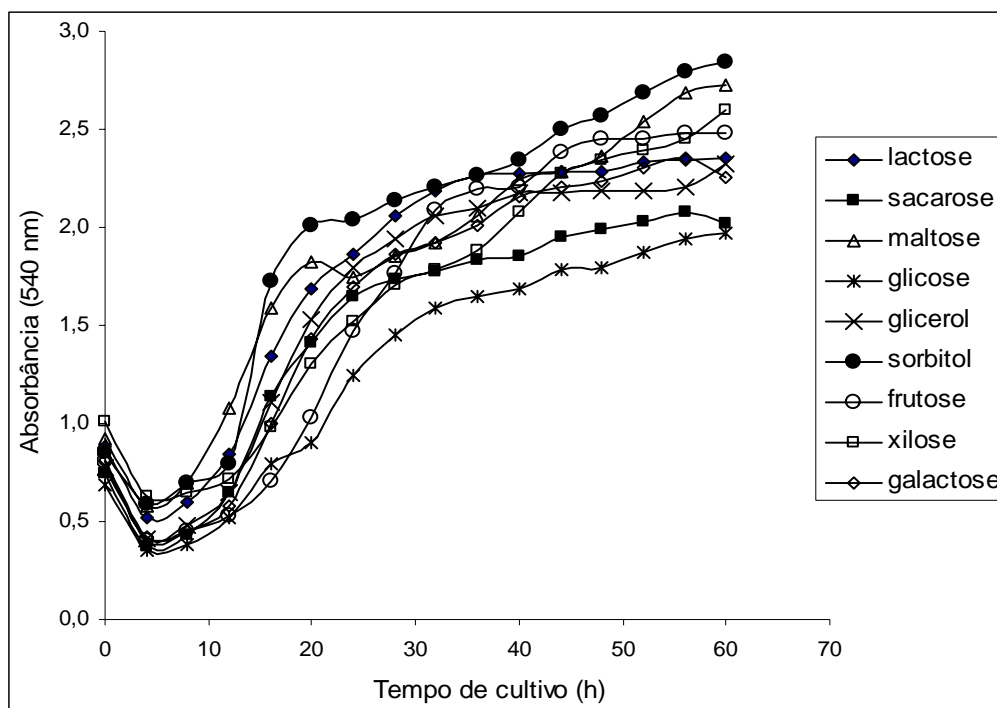
**Figura 20** - Curvas de crescimento *Mucor circinelloides* 7 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



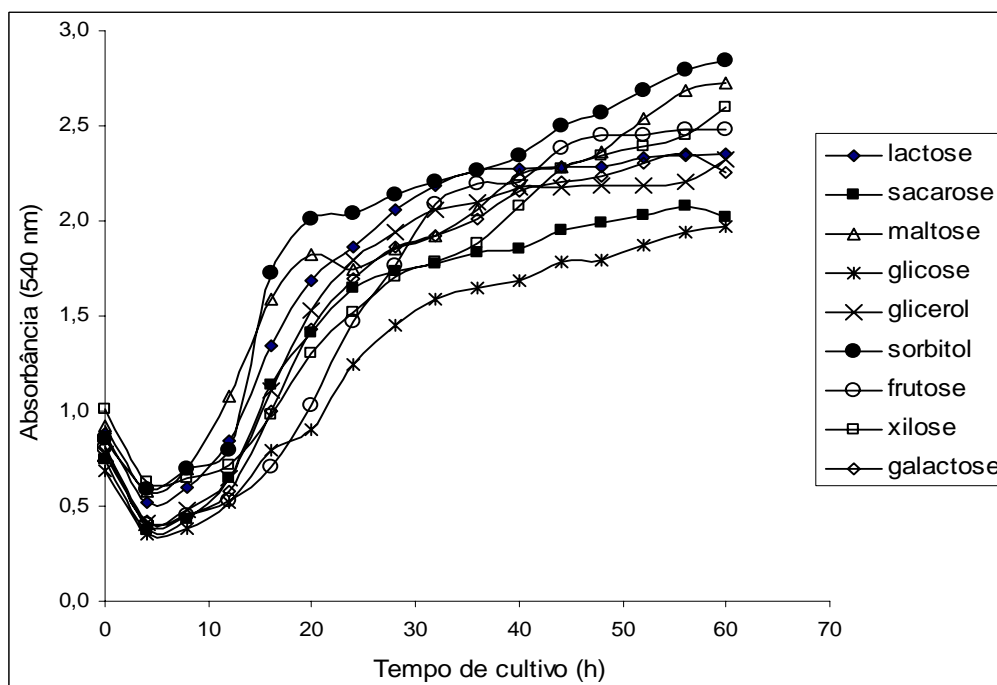
**Figura 21** - Curvas de crescimento de *Aspergillus japonicus* 8 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



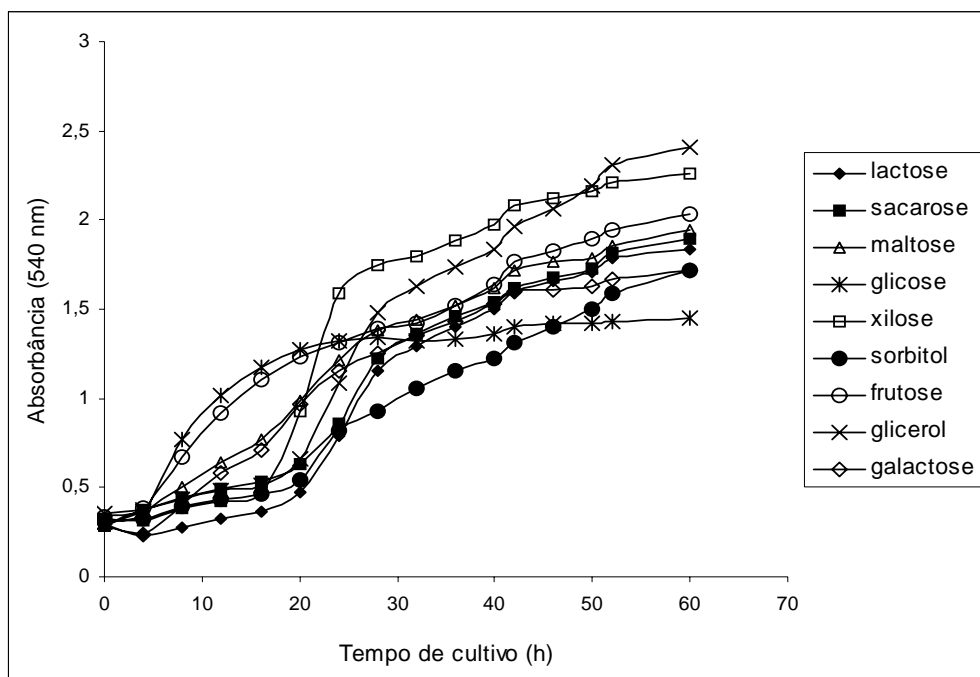
**Figura 22** - Curvas de crescimento de *Aspergillus niger* 9 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



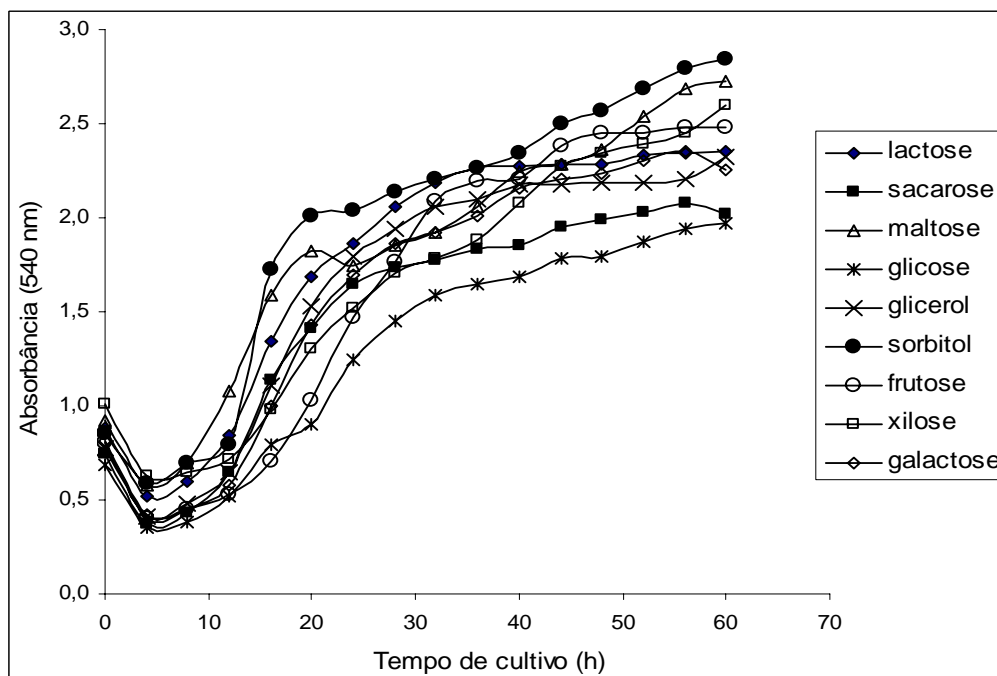
**Figura 23** - Curvas de crescimento de *Aspergillus niger* 10 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



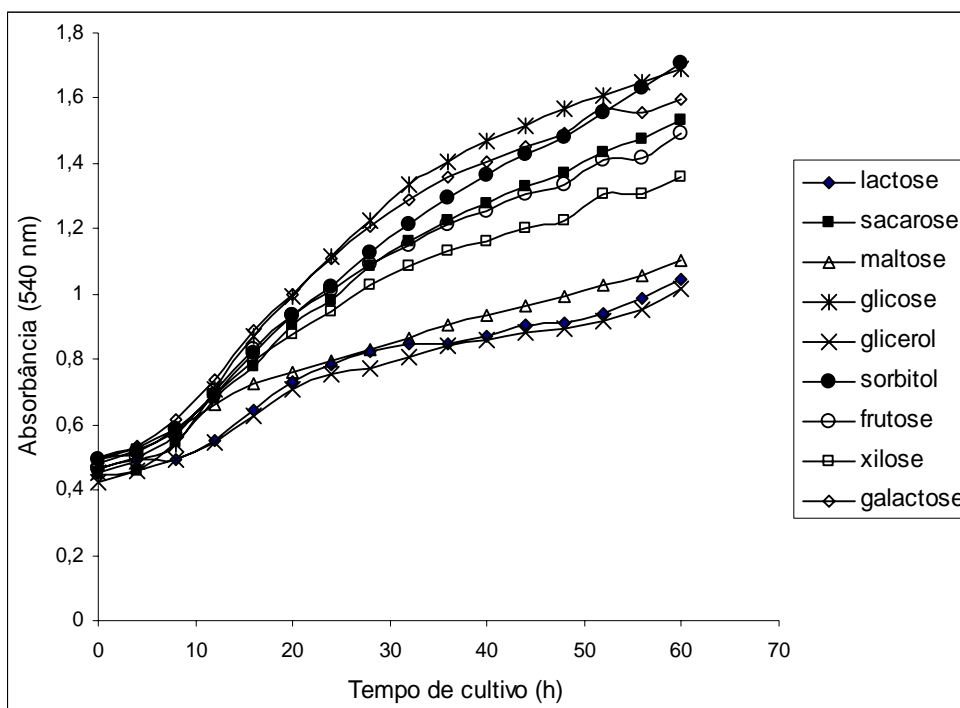
**Figura 24** - Curvas de crescimento de *Aspergillus niger* 11 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



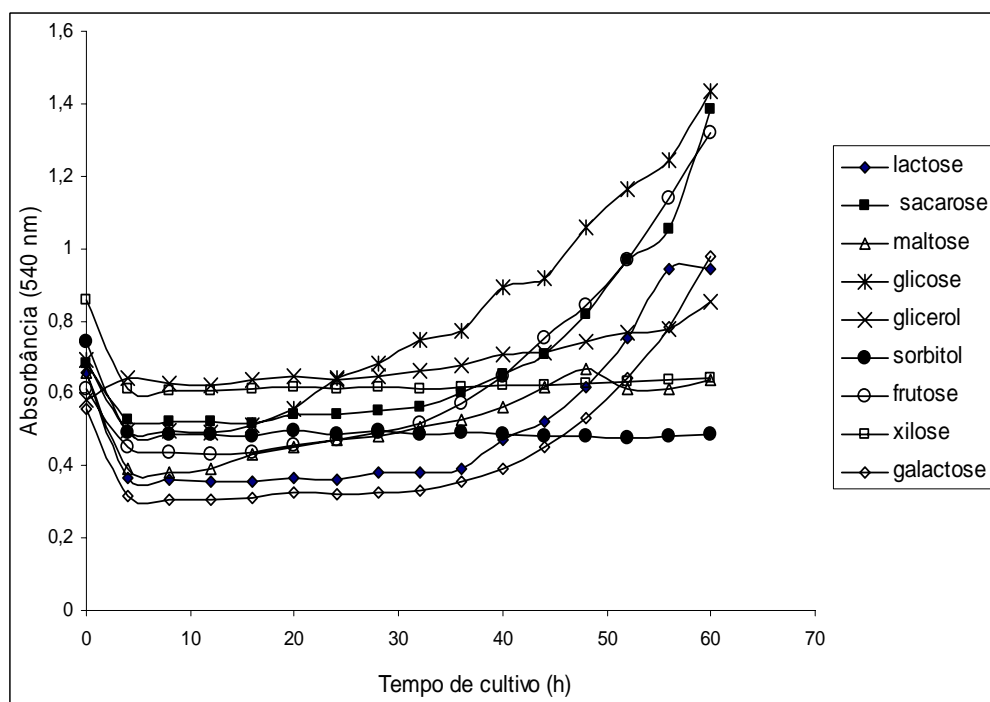
**Figura 25** - Curvas de crescimento de *Rhizopus microsporus* 12 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



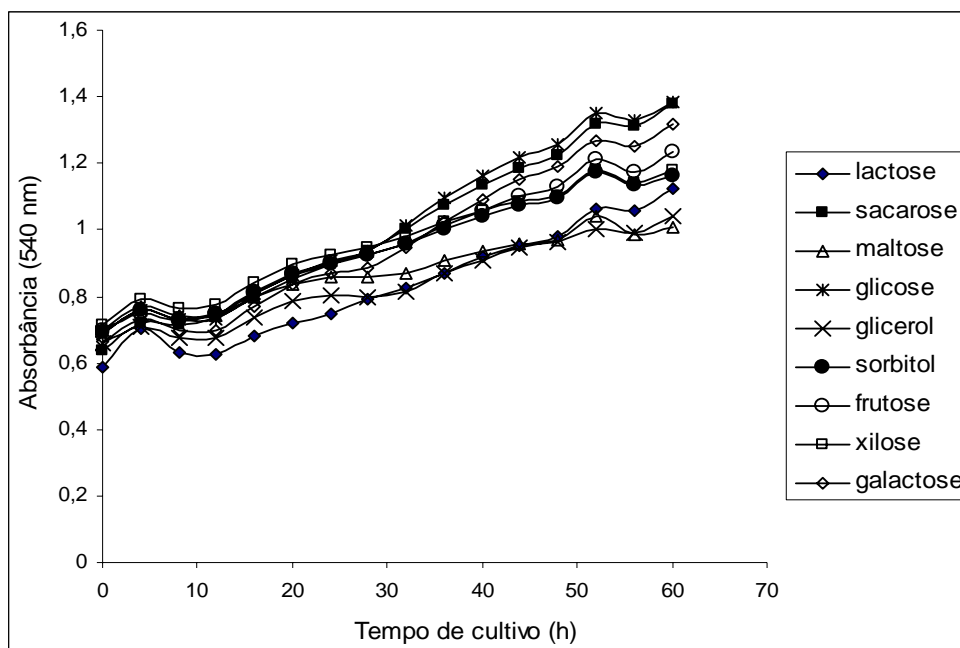
**Figura 26** - Curvas de crescimento de *Trichoderma viride* 13 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



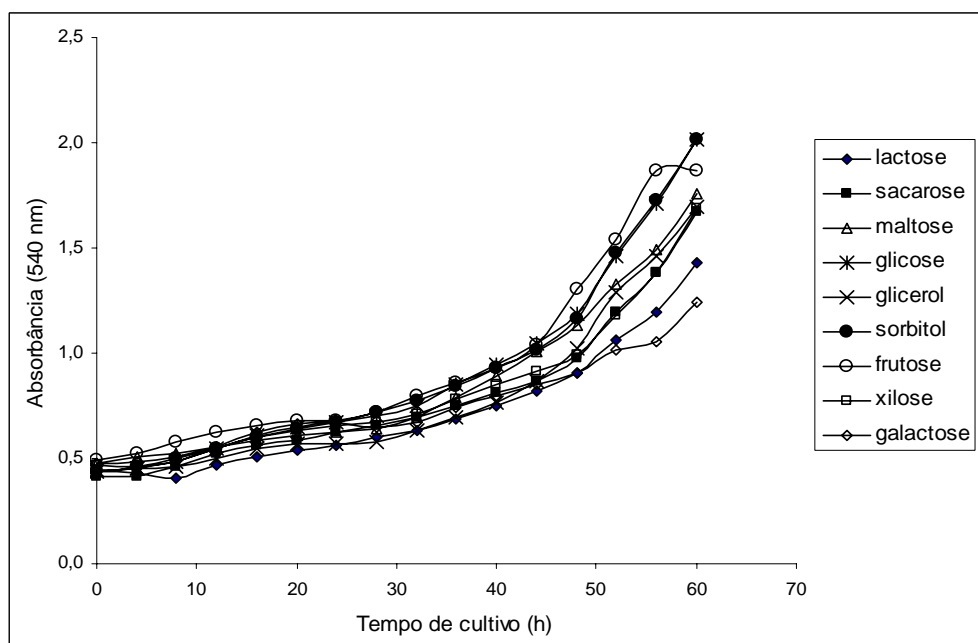
**Figura 27** - Curvas de crescimento de *Hyphomyceto sp 14* com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



**Figura 28** - Curvas de crescimento de *Penicillium sp 15* com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)

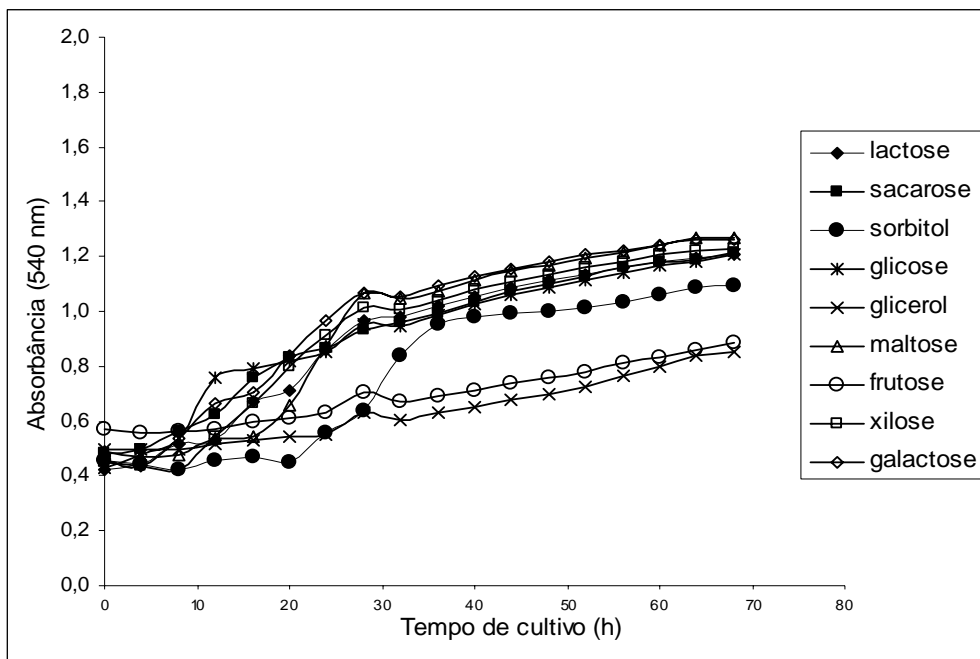


**Figura 29** - Curvas de crescimento de *Fusarium oxysporum* 17 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)

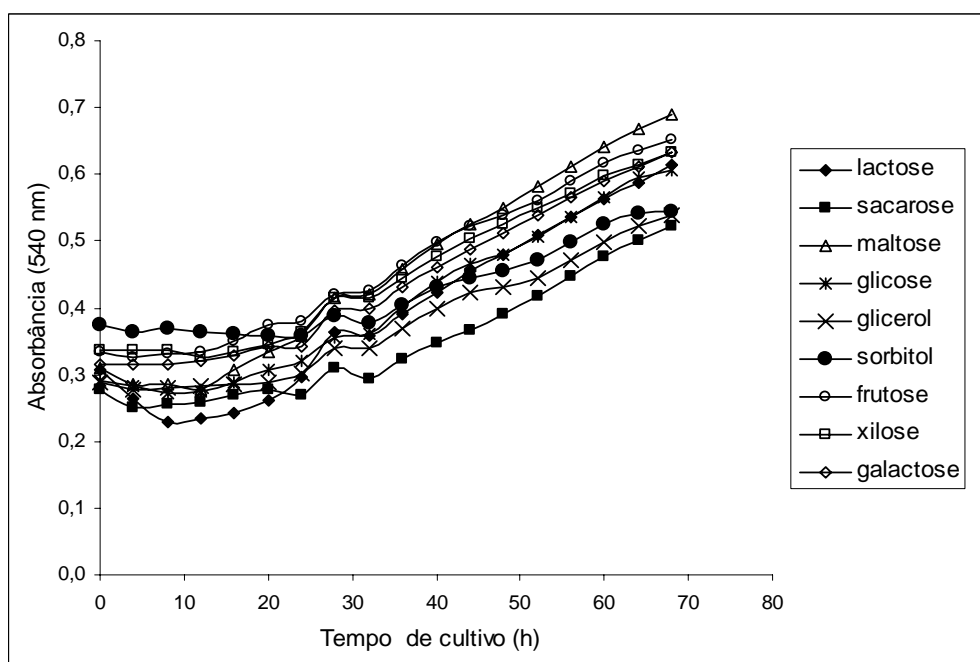


**Figura 30** - Curvas de crescimento e *Cladosporium cladosporioides* 18 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)

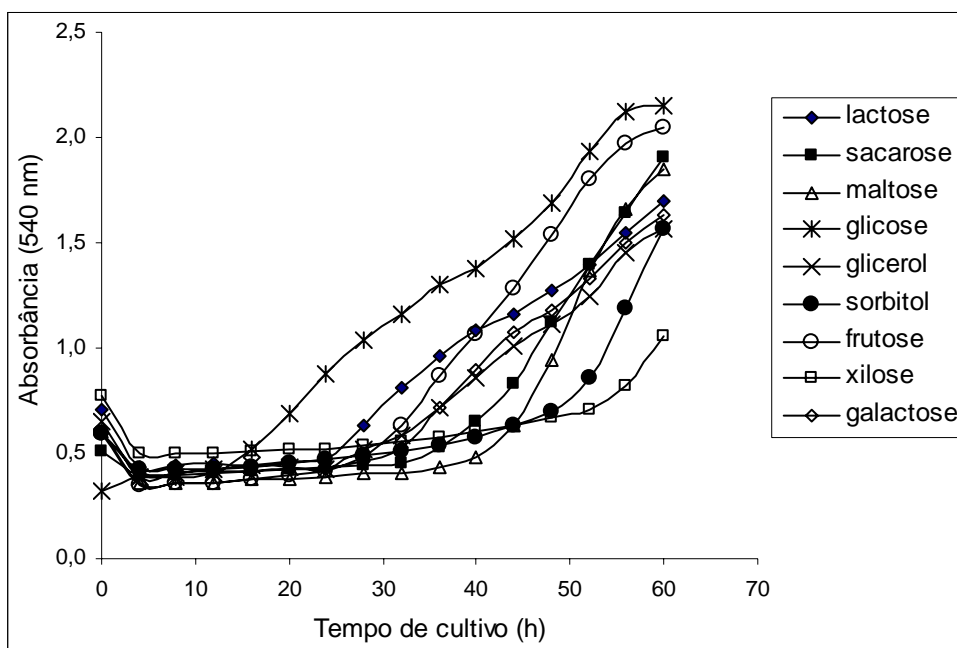




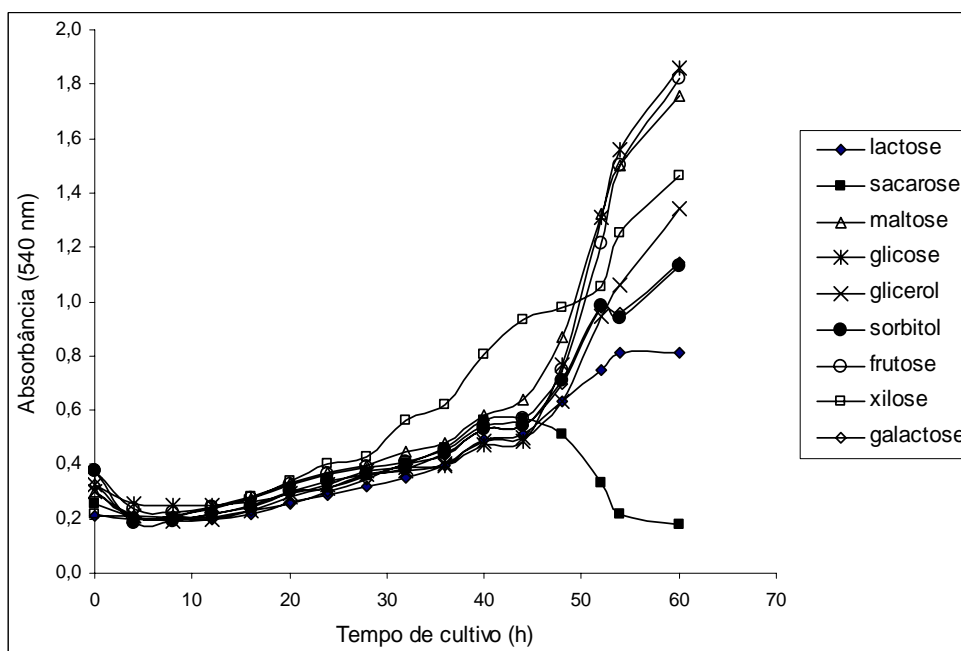
**Figura 31** - Curvas de crescimento de *Humicola* sp 19 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C).



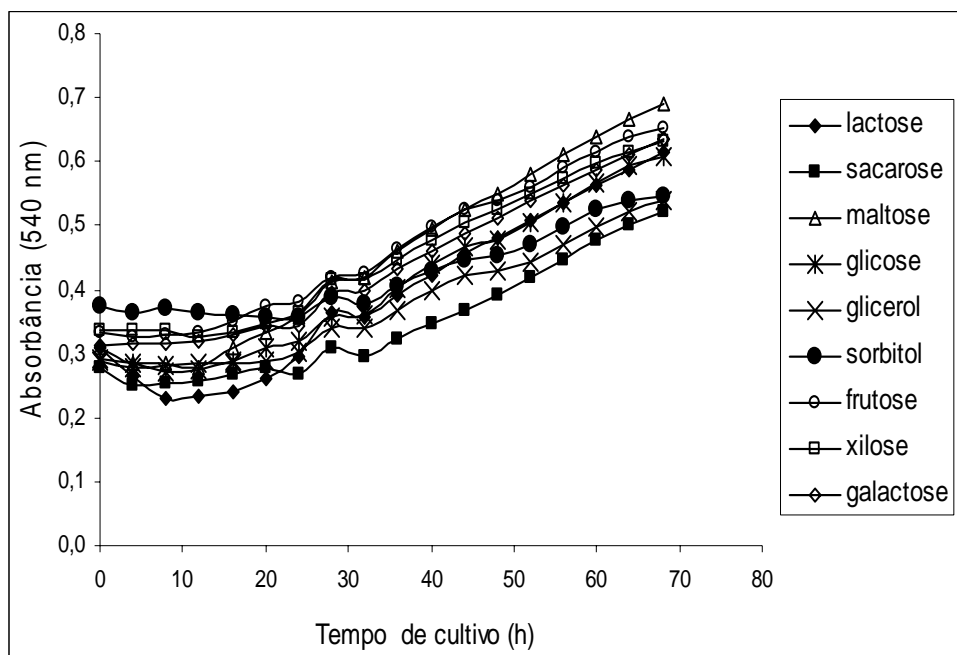
**Figura 32** - Curvas de crescimento de *Aspergillus fumigatus* 20 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



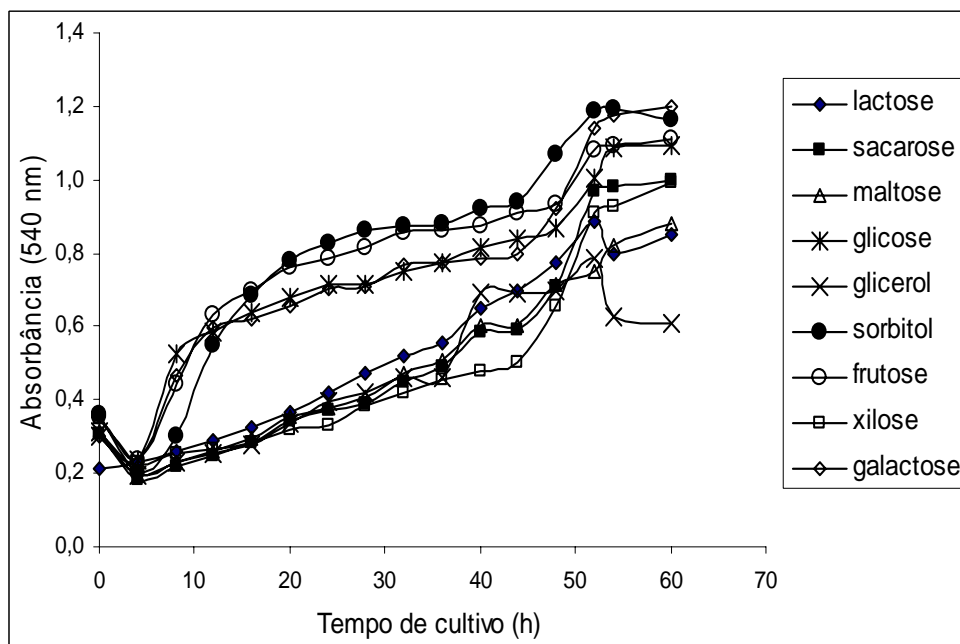
**Figura 33** - Curvas de crescimento de *Emericellopsis mínima* 22 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



**Figura 34** - Curvas de crescimento de *Emericellopsis mínima* 26 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



**Figura 35** - Curvas de crescimento de *Aspergillus fumigatus* 27 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)



**Figura 36** – Curvas de crescimento de *Mucor circinelloides f. janssenii* (Lendner) Schipper 31 com diferentes fontes de carbono pelo método turbidimétrico automatizado (Bioscreen C)

**Tabela 19** - Resumo da melhor fonte de carbono para crescimento dos fungos isolados, determinados pelo Bioscreen-C.

Linagem	Fonte de carbono
<i>Aspergillus aculeatus</i> 4	Maltose
<i>Aspergillus fumigatus</i> 3	Glicose
<i>Aspergillus fumigatus</i> 20	Maltose
<i>Aspergillus fumigatus</i> 27	Lactose
<i>Aspergillus japonicus</i> 8	Sorbitol
<i>Aspergillus niger</i> 1	Glicose
<i>Aspergillus niger</i> 5	Maltose
<i>Aspergillus niger</i> 9	Maltose
<i>Aspergillus niger</i> 10	Maltose
<i>Aspergillus niger</i> 11	Maltose
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 18	Sorbitol
<i>Emericellopsis mínima</i> 22	Glicose
<i>Emericellopsis mínima</i> 26	Glicose
<i>Fusarium oxysporum</i> 17	Glicose
<i>Humicola</i> sp 19	Maltose
<i>Hyphomyceto</i> sp 14	Sorbitol
<i>Mucor circinelloides</i> 7	Sacarose
<i>Mucor circinelloides</i> 31	Galactose
<i>Penicillium commune</i> 6	Frutose
<i>Penicillium implicatum</i> 2	Lactose
<i>Penicillium</i> sp 15	Glicose
<i>Rhizopus microsporus</i> 12	Glicerol
<i>Trichoderma viride</i> 13	Sorbitol

A maltose foi o melhor indutor de crescimento de biomassa para as linhagens de *Aspergillus niger* 5 (Figura 18), *Aspergillus niger* 9 (Figura 22), *Aspergillus niger* 11 (Figura 24), *A. aculeatus* 4 (Figura 17), *A. fumigatus* 20 (Figura 32) e *Humicola* sp 19 (Figura 31), sendo também considerada como melhor fonte de carbono para crescimento de fungos filamentosos por diversos autores. Peixoto et al. (2003), em cultivos de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformes* e Moreira et al. (1999) em cultivos de *A. tamaritii* para a produção de amilases, obtiveram com a adição de maltose ao meio de cultivo, aumento na produção de biomassa. Ramachandran et al. (2004), observaram aumento na produção da biomassa por *A. oryzae*, em meio enriquecido com maltose e lactose na produção de  $\alpha$ -amilases. A suplementação do meio de cultura com maltose aumentou também a produção de biomassa por *A. niger*, em cultivo para produção de celulases e glucosidases (FADEL, 2000).

Para os fungos *A. japonicus* 8 (Figura 21), *T. viride* 13 (Figura 26), *Hyphomyceto* sp 14 (Figura 27) e *Cladosporium cladosporioides* 18 (Figura 30), sorbitol foi o açúcar que promoveu maior crescimento. Poucos relatos sobre a ação indutora de biomassa por este açúcar foram encontrados. A adição de sorbitol ao meio foi favorável à produção de biomassa e exopolissacarídeos em cultivos de *Phoma herbarum* (SELBMANN et al., 2002) e em cultivos de diversas linhagens de *Mucor hiemalis* para produção de ácido gama linolênico (TAUK et al., 2005).

A maior produção de biomassa de *Penicillium implicatum* 2 (Figura 15) e *A. fumigatus* 27 (Figura 35) se deu em meio adicionado de lactose. Este açúcar também promoveu maior crescimento de *T. reesei* Rut C-30 em cultivos efetuados por Haltrich et al. (1996), para produção de xilanase. A frutose foi o melhor açúcar para crescimento de *Penicillium commune* 6 (Figura 19). Vahidi et al. (2004), entre outros açúcares avaliados, teve com a frutose maior biomassa em cultivos de *Mycena leptcephala*.

A maior biomassa de *Aspergillus niger* 1 (Figura 14), *Aspergillus fumigatus* 3 (Figura 16), *Penicillium* sp 15 (Figura 28), *Fusarium oxysporum* 17 (Figura 29) e *Emericellopsis mínima* 22 e 26 (Figuras 33 e 34), foi obtida com o meio suplementado de glicose. A glicose é citada como um bom açúcar na produção de biomassa por muitos autores por ser uma fonte de carbono facilmente metabolizável, entre eles Andrade et al. (2002), em cultivos para o crescimento de *M. circinelloides* (em

concentração adequada) e Margolles-Clark et al. (1997) em cultivos de *T. reesei*, não induzindo, entretanto a atividade enzimática.

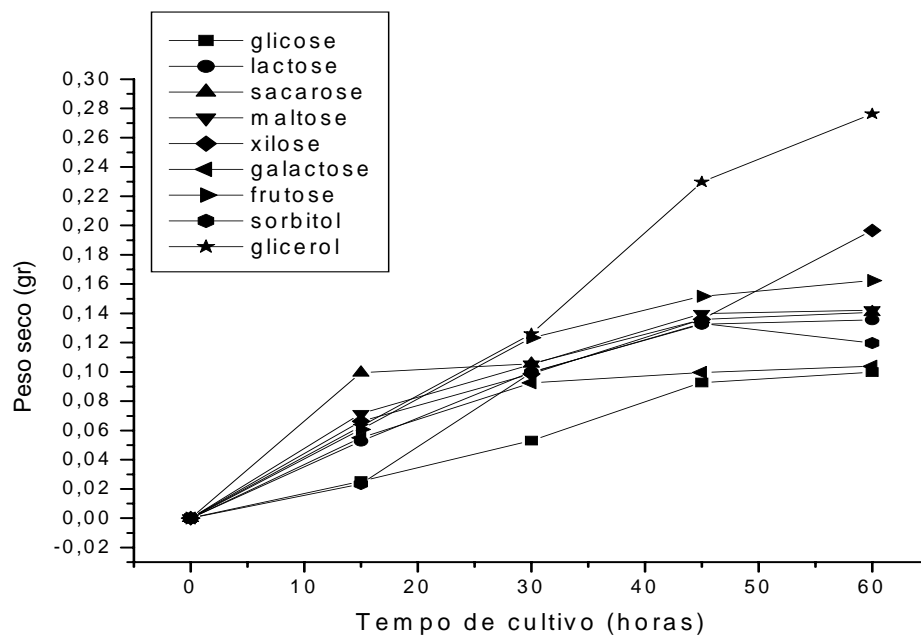
O fungo *Rhizopus microsporus var. microsporus* van Tieghen 12 (Figura 25), produziu biomassa abundante em meio suplementado de glicerol. Vários açúcares foram avaliados por Bajpai et al. (1991), objetivando a otimização da síntese de ácido aracdônico por *Mortierella alpina*, sendo glicerol e frutose os melhores indutores de biomassa (15,6 e 12,8 g/L).

Os fungos *A. japonicus* 8 e *T. viride* 13 (Figuras 21 e 26) foram os que produziram biomassa mais abundante, com leituras de densidade ótica (OD) elevadas, quando comparadas às OD observadas nas curvas de crescimento dos outros fungos. Em experimentos posteriores, constata-se que *A. japonicus* e *T. viride*, se revelaram os melhores produtores da enzima xilanase, sendo demonstrada nas condições utilizadas neste presente experimento, a relação da produção de biomassa e atividade enzimática.

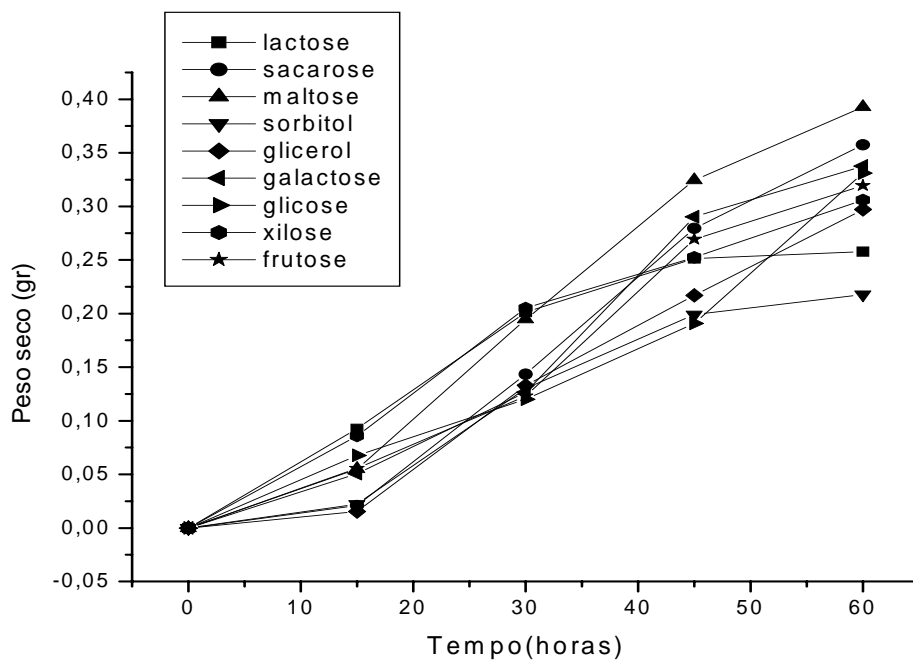
#### **4.3.2 - Cultivo de *Aspergillus niger* 9 e *Rhizopus microsporus* 12 em diferentes fontes de carbono pelo Método Turbidimétrico Automatizado (Bioscreen-C) e Método Tradicional (meio líquido sob agitação).**

Alguns fungos utilizados neste presente trabalho foram cultivados em meio líquido para produção de biomassa, mantendo-se as mesmas condições de cultivo utilizadas no método turbidimétrico, para se comprovar os resultados encontrados pelo Bioscreen C, uma vez que se trata de um método pouco usual, entretanto atraente.

As curvas de crescimento de *Rhizopus microsporus* 12 pelo Bioscreen-C já foi anteriormente apresentada na figura 25 e de *A. niger* 9 na de figura 22. As curvas de crescimento destas linhagens, obtidas pelo método tradicional (meio líquido) estão abaixo apresentadas (Figuras 37 e 38):



**Figura 37** – Curvas de crescimento de *Rhizopus microsporus* 12 com diferentes fontes de carbono por método tradicional.



**Figura 38** - Curvas de crescimento de *Aspergillus niger* 9 com diferentes fontes de carbono por método tradicional.

O fungo *Rhizopus microsporus*12, pelo método turbidimétrico (Figura 25) teve o glicerol como melhor fonte de carbono para crescimento, sendo este também o açúcar determinado como melhor pelo método tradicional (Figura 37), estando de acordo os resultados obtidos pelos dois métodos. Nas curvas de crescimento obtidas através do método turbidimétrico automatizado de *Aspergillus niger* 9 (Figura 22) a melhor fonte de carbono para o crescimento desta linhagem foi a maltose sendo este açúcar também obtido como o melhor pelo método tradicional (Figura 38).

Horakova et al. (2003), em trabalho comparativo do método tradicional e método turbidimétrico automatizado no estudo das características de crescimento de *Listeria monocytogenes*, também concluiu que os dois métodos foram similares, e que o método automatizado utilizou menor quantidade de reagentes e menor tempo de análise.

#### **4.3.3 - Atividade de xilanase dos fungos filamentosos em meios sólidos sem a adição de outras fontes de carbono, a 25°C e 35°C, pH 5,0, por cinco dias.**

##### **4.3.3.1 - Atividade xilanolítica dos fungos filamentosos isolados nas duas coletas avaliadas em cultivos em MFT.**

Os resultados da atividade de xilanase nos cultivos em MFT dos fungos isolados nas duas coletas estão apresentados nas tabelas (20 e 21). Os que não apresentaram atividade xilanolítica na triagem (Tabela 18) também não tiveram atividade detectada nos cultivos em MFT e quando apresentaram atividade, a mesma foi baixa. A maioria das linhagens da primeiracoleta apresentou atividades de xilanase a 35°C, temperatura próxima à do habitat de onde foram isolados (38°C), enquanto os melhores resultados obtidos das linhagens da secundacoleta se deram a 25°C, sendo esta temperatura, próxima à temperatura ambiental encontrada no período de coleta.



**Tabela 20** – Atividade de xilanase dos fungos da 1ª coleta em MFT a 25°C e 35°C, pH 5, 0, inóculo  $1 \times 10^7$  esporos/ mL, por cinco dias.

Linhagens	Atividade da xilanase			
	Temperatura 25°C		Temperatura 35°C	
	U/mL	U/30 mL	U/mL	U/30 mL
<i>Aspergillus aculeatus</i> 4	18,9	567,0	16,3	489,0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 3	A*	A*	9,9	297,0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 20	17,3	519,0	23,1	693,0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 25	2,4	72,0	5,9	177,0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 27	A*	A*	10,6	318,0
<i>Aspergillus japonicus</i> 8	143,9	4317,0	22,9	687,0
<i>Aspergillus niger</i> 1	23,2	696,0	28,1	843,0
<i>Aspergillus niger</i> 5	18,9	567,0	22,3	669,0
<i>Aspergillus niger</i> 9	7,2	216,0	13,5	405,0
<i>Aspergillus niger</i> 10	16,6	498,0	3,3	99,0
<i>Aspergillus niger</i> 11	23,4	702,0	33,4	1002,0
<i>C. cladosporioides</i> 18	A*	A*	A*	A*
<i>Emericellopsis minima</i> 22	1,9	57,0	11,9	357,0
<i>Emericellopsis minima</i> 24	A*	A*	16,6	498,0
<i>Emericellopsis minima</i> 26	A*	A*	8,4	252,0
<i>Fusarium oxysporum</i> 17	16,2	486,0	6,3	189,0
<i>Humicola</i> sp 19	A*	A*	A*	A*
<i>Hyphomiceto</i> 14	4,5	135,0	6,0	180,0
<i>Mucor circinelloides</i> 7	16,2	486,0	6,3	189,0
<i>Mucor circinelloides</i> 31	16,9	507,0	18,9	567,0
<i>Penicillium implicatum</i> 2	27,4	822,0	25,7	771,0
<i>Penicillium commune</i> 6	14,5	435,0	32,7	981,0
<i>Penicillium</i> sp 15	11,5	345,0	53,0	1590,0
<i>Rhizopus microsporus</i> 12	17,6	528,0	36,6	1098,0
<i>Trichoderma viride</i> 13	93,5	2805,0	34,1	1023,0

A\* : atividade não detectada

**Tabela 21** - Atividade de xilanase dos fungos da 2ª coleta em MFT a 25°C e 35°C, pH 5, 0, inóculo  $1 \times 10^7$  esporos/ mL, por cinco dias.

Linhagem	Atividade xilanase			
	Temperatura 25°C		Temperatura 35°C	
	U/mL	Total U/30 mL	U/mL	Total U/30 mL
<i>Actinomiceto 2.14</i>	A*	A*	A*	A*
<i>Aspergillus flavus 2.3</i>	11,7	351,0	2,1	63,0
<i>Aspergillus flavus 2.12</i>	11,6	348,0	0,9	27,0
<i>Aspergillus flavus 2.20</i>	11,2	336,0	0,3	9,0
<i>Aspergillus sp 2.18</i>	8,9	267,9	9,2	276,0
<i>Aspergillus tamarii 2.19</i>	10,8	324,0	1,4	42,0
<i>Aspergillus sp 2.25</i>	10,6	318,0	12,5	375,0
<i>Cladosporium sp 2.16</i>	A*	A*	A*	A*
<i>Epicocum sp 2.24</i>	A*	A*	A*	A*
<i>Nigrospora sp 2.15</i>	A*	A*	A*	A*
<i>P. brevicompactum 2.8</i>	A*	A*	A*	A*
<i>P. janthinellum 2.10</i>	8,4	252,0	3,3	99,0
<i>Penicillium lividum 2.6</i>	5,4	162,0	4,0	120,
<i>Penicilium lividum 2.9</i>	6,1	183,0	4,6	138,0
<i>Penicilium raciborskii 2.4</i>	12,6	378,0	1,7	51,0
<i>P. verruculosum 2.1</i>	5,4	163,0	1,4	42,0
<i>Trichoderma sp 2.2</i>	A*	A*	A*	A*

\* A : atividade não detectada

As linhagens da primeira coleta que mais se destacaram a 35°C foram: *Aspergillus niger* 1 (28,1 U/mL); *Aspergillus niger* 5 (22,3 U/mL); *Aspergillus niger* 11 (33,4 U/mL); *Penicillium commune* 6 (32,7 U/mL); *Penicillium* sp 15 (53,0 U/mL) e *Rhizopus microsporus* 12 (36,6 U/mL). As atividades mais expressivas, entretanto, ocorreram a 25°C com as linhagens *Aspergillus japonicus* 8 (143,9 U/mL) e *Trichoderma viride* (93,5 U/mL) (Tabela 20). Segundo Kheng; Ibrahim (2005), a temperatura ótima de produção enzimática geralmente é a mesma do habitat natural de onde o microrganismo foi isolado, não constituindo, entretanto uma regra.

A produção de xilanase dos fungos isolados na segunda coleta de solo (Tabela 21), não apresentou resultados expressivos, quando comparados aos obtidos na primeira coleta, tendo destaque para os fungos: *Aspergillus flavus* 2.3 (11,7 U/mL), *Aspergillus flavus* 2.12 (11,6 U/mL), *Aspergillus flavus* 2.20 (11,2 U/mL), *Aspergillus tamarisii* 2.19 (10,8 U/mL) e *Penicillium raciborskii* 2.4 (12,6 U/mL).

A menor atividade xilanolítica apresentada pelas linhagens obtidas na coleta no período chuvoso comparada às obtidas com as linhagens isoladas no período seco, pode ser devido à falta de adaptação da microbiota do semi-árido com o alto teor hídrico da estação, que não só pode promover uma queda da população como também afetar a atividade metabólica dos microrganismos (SOUTO et al., 2005).

Segundo diversos autores, os fungos que despontam como melhores produtores de xilanases são: *Aspergillus* sp (FERREIRA et al., 1999; GHANEM et al., 2000; De SOUZA et al., 2001; LU et al., 2003), *Penicillium* sp (PALMA et al., 1996; CONSIDINE et al., 1988), *Trichoderma* sp (SUH et al., 1988; SEYIS; AKSOZ, 2004; ROYER; NAKAS, 1989; CHEN et al., 1997; DESGRANGES; DURAND, 1990), e *Rhizopus* sp (BAKIR et al., 2001), estando de acordo com os melhores produtores deste presente trabalho.

#### 4.3.3.2 - Atividade xilanolítica dos fungos cultivados em meio farelo de soja (MFS)

Foram avaliados em MFS, apenas os fungos que apresentaram atividade mais expressiva em MFT, nas temperaturas em que as atividades se deram, estando os resultados apresentados na tabela 22, sendo os resultados em MFS significativamente inferiores aos encontrados nos cultivos em MFT. O uso do farelo de trigo tem sido descrito como vantajoso na produção de xilanases e outras enzimas quando comparado a outros resíduos sólidos, devido à sua composição rica em proteínas e hemicelulose, sendo usadas pelos microrganismos como energia e fonte de carbono. Vários autores relatam a maior atividade de xilanase e outras enzimas por diversos fungos com o uso de farelo de trigo como substrato. Alguns exemplos estão apresentados na tabela 23.

**Tabela 22** - Atividade de xilanase dos fungos em MFS, pH 5, 0, inóculo  $1 \times 10^7$  esporos/ mL, por cinco dias

Linhagem	Atividade Xilanase			
	Temp. 25° C		Temp. 35° C	
	U/mL	U/30 mL	U/mL	U/30 mL
<i>Aspergillus fumigatus</i> 20	NA*	NA*	A*	A*
<i>Aspergillus japonicus</i> 8	9,7	291,0	NA*	NA*
<i>Aspergillus niger</i> 1	NA*	NA*	2,1	63,0
<i>Aspergillus niger</i> 5	NA*	NA*	19,4	582,0
<i>Aspergillus niger</i> 11	NA*	NA*	12,4	372,0
<i>Penicillium commune</i> 6	NA*	NA*	8,7	261,0
<i>Penicillium implicatum</i> 2	A*	A*	NA*	NA*
<i>Penicillium</i> sp 15	NA*	NA*	12,1	363,0
<i>Rhizopus microsporus</i> 12	NA*	NA*	1,9	57,0
<i>Trichoderma viride</i> 13	A*	A*	NA*	NA*

A\*: atividade não detectada; NA\*: atividade não avaliada nesta temperatura.

Gutierrez-Correa; Tengerdy (1998) utilizaram o farelo de soja não como substrato para crescimento e produção de enzimas, mas como fonte de nitrogênio orgânico no meio. O efeito da adição deste resíduo ao meio aumentou sete vezes a produção de xilanases, em um cultivo misto utilizando *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis*, quando se comparou com o processo suplementado com nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio).

Bakir et al. (2001), também fizeram uso de farelo de soja como fonte de nitrogênio na produção de endo-xilanase por *Rhizopus oryzae* e observaram que, um aumento na concentração deste composto de 1 para 2% no meio de cultivo, aumentou em 26% a produção de xilanase. Esses autores, no entanto, ressaltaram que este valor é pequeno quando comparado com o efeito causado pelo aumento da concentração da fonte de carbono (sabugo de milho), de 1 para 3%, que levou ao acréscimo de 80% na produção de xilanase. He et al. (2003), pesquisando elastase de *Bacillus* sp, obteve melhor resultado enzimático em farelo de trigo, tendo o farelo de soja efeito negativo na atividade de xilanase.

São necessários mais estudos a respeito do uso de farelo de soja como substrato para produção de biomassa e macromoléculas, talvez quanto à sua combinação com farelo de trigo ou outro resíduo, quanto à concentração de água no meio e tamanho da partícula, que possui características diferentes quanto a estes aspectos em relação ao farelo de trigo.

**Tabela 23** - Produção de diversas enzimas por fungos filamentosos utilizando farelo de trigo como substrato.

Produto	Microrganismo	Referência
Pectinases	<i>A.niger</i>	Castilho et al. (2000)
Celulase	<i>A. niger</i>	Couri et al. (2000)
Xilanase	<i>A. terreus</i>	Gawande; Kamat (2000)
Endoglucanase	<i>A. niger</i>	Jecu (2000)
Amilase	<i>A. niger</i>	Nandakumar et al. (1999)
Xilanase	<i>Pleurotus ostreaus</i>	Qinnghe et al. (2004)
Xilanase	<i>F.oxysporum</i>	Ramesh et al. (1998)
Xilanase	<i>T. aurantiacus</i>	Souza et al. (1999)

#### **4.3.4 - Atividade xilanólítica dos fungos filamentosos cultivados em MFT e Meio líquido de Vogel, adicionados individualmente de outras fontes de carbono, em temperaturas apropriadas.**

Segundo Bajpai et al. (1997), a síntese de xilanases por fungos pode ser induzida ou reprimida, pois sua produção está relacionada com o tipo e concentração da fonte de carbono no meio (FADEL, 2000). Assim este experimento objetivou se alcançar uma maior produção de xilanase com a adição de outras fontes de carbono. As atividades enzimáticas dos fungos avaliadas nos cultivos utilizando-se MFT e Meio de Vogel adicionados de outras fontes de carbono estão apresentadas nas tabelas 24 e 25.

Observa-se na tabela 24, que a adição de carbometilcelulose 1% (CMC) ao MFT, causou repressão catabólica na síntese de xilanase em todas as linhagens avaliadas quando comparamos com os resultados obtidos nos cultivos em MFT puro (Tabela 20). Segundo Ruiz-Arribas et al. (1997), a adição de CMC não é favorável à produção de xilanase porque pode haver durante a fermentação, produção de carbometilcelulase, que hidrolisa CMC a celobiose, que tem ação repressora na produção de xilanase. Tal fato também foi constatado em outros trabalhos que avaliaram o efeito da adição de CMC ao meio de cultivo para produção de xilanases: *T. harzianum* (AHMED et al., 2003), *Verticillium tricorpus* (BAHKALI et al., 1995-1996), *Aspergillus tamaris* (FERREIRA et al., 1999), *Streptomyces* sp (RAWASHDEH et al., 2005), *Trichoderma harzianum* (SEYIS; AKSOZ, 2005-b), entre outros.

A adição de xilano 1% ao MFT também reprimiu a expressão das xilanases pela maioria dos fungos avaliados (Tabela 24), uma vez que apresentaram maior atividade de xilanase em MFT puro (Tabela 20). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Kheng; Ibrahim (2005), estudando a produção de xilanase por *Aspergillus niger* e Sater; Said (2001) com *T. harzianum*, que também relatam repressão enzimática com adição de xilano ao meio sólido.

Para *Trichoderma viride* que em MFT puro (Tabela 20) apresentou atividade xilanólítica de 93,5 U/ml, com a adição de xilano passou a produzir 143,0 U/mL, mostrando ser para esta linhagem, um indutor desta enzima (Tabela 24). O efeito indutor do xilano na síntese da xilanase é citado por muitos autores e para diversos

fungos, tais como: *S. Actuosus* (WANG et al., 2003), *T. lanuginosus* (HOQ et al., 1994) e *T. harzianum* (AHMED et al., 2003).

A glicose, que foi a melhor fonte de carbono para produção de biomassa de *A. niger* 1 não foi utilizada, sendo a segunda fonte (maltose) avaliada na produção enzimática (Tabela 24). Isto porque vários trabalhos de pesquisa citam a ação repressora da glicose na expressão de diversas enzimas. Haltrich et al. (1996), em cultivos de *T. reesei* observaram que a glicose foi efetiva na produção de biomassa, mas repressora na atividade da xilanase. Estes dados também são reportados por outros pesquisadores que avaliaram os efeitos da adição de glicose ao substrato na produção de xilanase por outros fungos (GAWANDE; KAMAT, 2000; HAQ et al., 2002; RAMESH e MANCHANDA, 1998; PEIXOTO et al., 2003; MARGOLLES-CLARK et al., 1997).

Para as linhagens *Aspergillus niger* 1, 5 e 11, a adição individual de maltose 1%, não induziu maior atividade da xilanase (Tabela 24), pois em MFT puro estas linhagens apresentaram melhores resultados.

**Tabela 24** - Atividade da xilanase dos fungos em MFT acrescidos individualmente da melhor fonte de carbono determinada pelo Bioscreen C, de xilano e carbometilcelulose 1% (v/w), pH 5, 0, por cinco dias, inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/ mL.

Linhagem	Fonte	Atividade Xilanase	
		25°C	35°C
<i>Aspergillus japonicus</i> 8	Xilano	104,1	NA*
	CMC	102,5	NA*
	Sorbitol	43,7	NA*
<i>Aspergillus niger</i> 1	Xilano	NA*	17,9
	CMC	NA*	17,9
	Maltose	NA*	17,8
<i>Aspergillus niger</i> 5	Xilano	NA*	17,6
	CMC	NA*	12,6
	Maltose	NA*	21,6
<i>Aspergillus niger</i> 11	Xilano	NA*	9,5
	CMC	NA*	16,8
	Maltose	NA*	17,6
<i>Penicillium commune</i> 6	Xilano	NA*	21,7
	CMC	NA*	2,2
	Frutose	NA*	6,4
<i>Penicillium implicatum</i> 2	Xilano	16,9	NA*
	CMC	3,6	NA*
	Lactose	19,5	NA*
<i>Rhizopus microsporus</i> 12	Xilano	NA*	11,4
	CMC	NA*	22,5
	Glicerol	NA*	A*
<i>Trichoderma viride</i> 13	Xilano	143,0	NA*
	CMC	87,5	NA*
	Sorbitol	169,0	NA*

A\* : atividade não detectada; NA\* : não avaliado nesta temperatura.



A ação repressora de diversos açúcares é relatada para a produção de outras enzimas. Moreira et al. (2001) relatam o efeito repressor da glicose e maltose na síntese de  $\alpha$ -amilases por *A. flavus*, *A. tamarii* e *A. fumigatus* cultivados em SMF. Peixoto et al. (2003), avaliando a produção e amilases com *R. microsporus* também obtiveram ação repressora na atividade da enzima com adição individual de açúcares.

A adição de lactose nos cultivos em MFT de *P. implicatum* 2, de frutose nos cultivos de *P. commune* 6, de sorbitol nos cultivos de *A. japonicus* 8 e de glicerol nos cultivos de *R. microsporus* 12, também apresentou repressão na atividade de xilanase. Vários trabalhos citam melhor atividade enzimática sem adição de outra fonte de carbono ao meio. Shah; Madamwar (2005), com a adição de açúcares ao meio de cultivo, observaram repressão catabólica na síntese de xilanase por *Aspergillus foeditus*. Em seu trabalho com *T. harzianum*, Seyis; Aksoz (2005b) tiveram melhor produção sem a adição de nenhuma fonte de carbono (103,2 U/mL), seguido de 96,7 U/mL com a adição de xilose e 96,7 U/mL com a adição de lactose. Ainda com *T. harzianum* (SEYIS; AKSOZ, 2005a), a melhor produção (796,1 U/mL) da atividade da xilanase ocorreu sem adição de nenhuma fonte de carbono, seguida de 786,7 U/mL com a adição de sacarose e 767,4 U/mL com a adição de lactose. Haq et al. (2002), obtiveram com amido, produção mais elevada de xilanase por *Aspergillus niger*, comparado aos resultados obtidos com a adição de xilose, sacarose, lactose, maltose e dextrose ao meio.

Constatou-se, portanto, que uma substância que se apresenta indutora enzimática para uma espécie pode ser inibidora da mesma atividade para outra espécie (HRMOVA et al., 1989). A adição de açúcares facilmente metabolizáveis, que foram os melhores na produção de biomassa determinada pelo Bioscreen-C, também não tiveram efeitos positivos para a maioria das linhagens.

Os resultados obtidos nos cultivos em SSF utilizando o MFT como substrato (Tabelas 20 e 24), foram extremamente superiores aos apresentados pelos cultivos em Meio de Vogel (Tabela 25) adicionado de outras fontes de carbono, com exceção de *A. niger* 11 que apresentou em MFT puro atividade de 33,4 U/mL e em meio líquido suplementado de xilano 1% de 57,1 U/mL.

A adição do sorbitol ao meio de Vogel não levou aos mesmos resultados demonstrados nos cultivos de *T. viride* quando o mesmo foi adicionado ao meio farelo

de trigo, mostrando que o sorbitol isoladamente não é um bom indutor da atividade da xilanase, nas condições aqui utilizadas.

Segundo De Souza et al. (2001), o farelo de trigo pode apresentar ausência de repressão catabólica, o que não acontece quando outros substratos lignocelulósicos são utilizados. Avaliando o efeito de vários açúcares facilmente metabolizáveis como glicose, xilose, frutose, maltose, celobiose e lactose, na indução de xilanase por *Aspergillus tamaritii*, os autores observaram que a adição de 1% destes açúcares nos meios de cultivo, constituídos à base de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, causou uma severa repressão catabólica no sistema. Verificou-se, no entanto, que os cultivos conduzidos em meios à base de farelo de trigo foram resistentes à presença dos açúcares, não se detectando efeitos de repressão catabólica com a adição de até 10% de glicose.

A resistência à repressão catabólica pelo farelo de trigo a açúcares mais facilmente metabolizáveis foi constatada neste presente trabalho, pois *Trichoderma viride* apresentou uma atividade xilanolítica de 93,5 U/mL em cultivos efetuados em MFT puro (Tabela 20) e passou a produzir 169,0 U/mL (Tabela 24) quando o meio foi adicionado de sorbitol 1%, tendo, portanto este açúcar induzido maior biossíntese de xilanase por este fungo. Não foram encontrados na literatura relatos de indução enzimática com o uso deste açúcar.

Dados atuais mostram que a produção de enzimas em SSF leva à obtenção de níveis de atividade superiores as obtidas pelo cultivo submerso, além de se obter enzimas com propriedades funcionais mais adequadas às aplicações industriais (NIGAN; SINGH, 1994; MITCHELL et al., 2000). Muitas enzimas, produzidas por cultivo em estado sólido, têm apresentado propriedades diferentes daquelas que foram obtidas por SMF, como maior termoestabilidade e resistência ao pH (ZHENG; SHETTY, 2000).

Shah; Madamwar (2005) obtiveram com *Aspergillus foetidus* a atividade máxima de 210 U/mL em SSF, sendo a atividade de xilanase por *A. fumigatus* nos cultivos efetuados por Anthony et al., (2003) em fermentação sólida, 6 vezes maior que em fermentação líquida. Estes resultados são similares aos obtidos por outros autores para a enzima xilanase em SSF para outros fungos (JAIN, 1998; KAMRA; SATYANARAYANA, 2004).

A produção de diversas outras enzimas em sistemas sólidos é relatada como superior aos efetuados em fermentação líquida: poligalacturonase por *Bacillus* sp (SOARES et al., 1999),  $\alpha$ -amilases por *Bacillus licheniformis* M27 (RAMESH; LONSANE, 1991; LONSANE; RAMESH, 1992) e endoglucanases e  $\beta$ -glicosidades (GRAJEK et al., 1987), e pectinases produzidas por *A. niger* (ACUNÃ-ARQUELLES et al., 1995) e por *Bacillus* sp (SOARES et al., 1999).

Não existem ainda, métodos eficazes para a comparação entre níveis de produtividade obtidos em SSF e SMF. O fato dos cultivos em SSF aproximarem-se muito do ambiente natural de crescimento dos microrganismos explica, em parte, as diferenças constatadas, mas a exata razão para o aumento dos níveis de atividade enzimática nos cultivos em meio sólido não é totalmente conhecida.

Observa-se, portanto, que os mecanismos de controle da síntese enzimática variam consideravelmente entre os diferentes microrganismos devido a sua natureza não específica (DE VRIES et al., 2000). Estudos adicionais são necessários, entretanto para explicar porque os cultivos com farelo de trigo podem apresentar habilidade em reprimir a repressão catabólica pela glicose e outros açúcares facilmente metabolizáveis na produção de xilanases (PANDEY, 2003).

Os melhores resultados até aqui obtidos foram com *Aspergillus japonicus* cultivado em MFT puro e *Trichoderma viride* em MFT adicionado de sorbitol 1%, ambos a 25°C, por cinco dias, com inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/ mL.

**Tabela 25** - Atividade de xilanase dos fungos em meio de Vogel acrescido individualmente da melhor fonte de carbono, de xilano e carbometilcelulose a 1%, em temperaturas apropriadas, pH 5, 0, inóculo  $1 \times 10^7$  esporos/ mL, por cinco dias.

Linhagem	Fonte de Carbono	Ativ. Xilanase - U/mL	
		25°C	35°C
<i>Aspergillus japonicus</i> 8	Xilano	20,2	NA*
	CMC	19,4	NA*
	Sorbitol	A*	NA*
<i>Aspergillus niger</i> 1	Xilano	NA*	13,1
	CMC	NA*	1,7
	Maltose	NA*	0,2
<i>Aspergillus niger</i> 5	Xilano	NA*	A*
	CMC	NA*	A*
	Maltose	NA*	A*
<i>Aspergillus niger</i> 11	Xilano	NA*	57,1
	CMC	NA*	A*
	Maltose	NA*	A*
<i>Penicillium commune</i> 6	Xilano	NA*	25,0
	CMC	NA*	1,6
	Frutose	NA*	2,1
<i>Penicillium implicatum</i> 2	Xilano	A*	NA*
	CMC	A*	NA*
	Lactose	A*	NA*
<i>Rhizopus microsporus</i> 12	Xilano	NA*	32,7
	CMC	NA*	A*
	Glicerol	NA*	A*
<i>Trichoderma viride</i> 13	Xilano	21,7	NA*
	CMC	2,2	NA*
	Sorbitol	6,4	NA*

A\* : atividade não detectada; NA\*: não avaliado nesta temperatura.

Os fungos *Penicillium implicatum* 2 e *Aspergillus fumigatus* 20 não produziram esporos.

#### 4.4 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE DE *Aspergillus japonicus* e *Trichoderma viride*.

##### 4.4.1 - Influência da Temperatura

As atividades de xilanase de *A. japonicus* e *T. viride* cultivados em diferentes temperaturas estão apresentados nas tabelas 26 e 27:

**Tabela 26** - Atividade de xilanase de *Aspergillus japonicus* em MFT, pH 5,0 por 120 h, inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/ mL, em diferentes temperaturas.

Temperatura	Atividade da xilanase			
	U/mL	U/30mL	Produtividade U/mL/hora	U/mg proteína
20° C	60,8	1824,0	15,2	6,10
25° C	143,9	4317,0	36,0	31,5
35° C	22,9	687,0	5,7	4,9
40° C	12,5	375,0	3,1	4,3

**Tabela 27** - Atividade de xilanase de *Trichoderma viride* em MFT, pH 5,0 por 120 h, inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/ mL, em diferentes temperaturas.

Temp. °C	Atividade da xilanase			
	U/mL	U/30mL	Produtividade U/mL/hora	U/mg proteína
20° C	77,9	2337,0	19,5	10,8
25° C	93,5	2805,0	23,4	14,6
35° C	45,9	1377,0	11,5	12,4
40° C	32,9	987,0	8,2	6,2

Geralmente, segundo Kheng; Ibrahim (2005), a temperatura ótima para produção enzimática se situa em torno da temperatura do habitat natural de onde o microrganismo foi isolado, não se constituindo, entretanto, tal fato em regra, como demonstrado na tabela 20, em que as linhagens tiveram atividade xilanolítica mais expressiva a 25°C e não a 35°C (mais próxima do habitat natural). Além disso, a melhor temperatura de crescimento do fungo nem sempre é a melhor para produção de enzimas (KHENG; IBRAHIM, 2005). Como a temperatura de incubação constitui fator crítico na produtividade enzimática (SEYIS; AKSOZ, 2003), a produção de xilanases por estes fungos foi estudada neste trabalho, em quatro diferentes temperaturas, 20°C, 25°C, 35°C e 40°C.

A melhor produção de xilanase por *A. japonicus* (Tabela 26) e *Trichoderma viride* (Tabela 27) ocorreram a 25°C, sendo que acima ou abaixo desta temperatura, ocorre um decréscimo da atividade enzimática. A melhor temperatura de produção enzimática foi, portanto, a mesma temperatura encontrada como a melhor para o crescimento destes fungos. Kheng; Ibrahim (2005), utilizando *Aspergillus niger* verificaram que as temperaturas ótimas para a atividade da enzima e crescimento do fungo foram similares, em concordância com resultados obtidos por Biswas et al. (1988). Segundo Rahman et al. (2003), o grande decréscimo de atividade enzimática em temperaturas muito baixas ou muito altas é devido ao fato de que nestas temperaturas o crescimento do fungo é inibido, acarretando um decréscimo na síntese de enzimas. As temperaturas ótimas para a produção de xilanase por fungos variam entre 20°C e 38°C (LENARTOVICZ et al., 2003; RAHMAN et al., 2003), como pode ser observado na tabela 28.

Diferentes microrganismos apresentam diferentes temperaturas ótimas de cultivo para produção de xilanase e até o presente, não está bem claro se tal fato seria devido ao fato dos microrganismos produzirem xilanases diferentes, ou se determinada temperatura de cultivo pode afetar a termoestabilidade de algumas proteínas (HALTRICH, 1996), ou afetar o crescimento do microrganismo e com isto a produção enzimática (HAQ et al., 2004).

**Tabela 28** - Temperaturas ótimas para produção de xilanase sp por fungos filamentosos citadas por diversos autores.

Linhagem	Temp. °C	Referência
<i>T. reesei</i>	25°C	Bradner et al. (1999)
<i>A. nidulans</i>	37°C	Carmona et al. (1997)
<i>T. reesei</i>	30°C	Chahal (1982)
<i>T. reesei</i>	27°C	Considine et al. (1988)
<i>A. terreus</i> e <i>A. niger</i>	35°C	Gawande; Kamat (1999)
<i>A. niger</i> GCBCX-20	30°C	Haq et al. (2004)
<i>A. niger</i> USM A1	27°C ± 3	Kheng; Ibrahim (2005)
<i>A. sulphureus</i>	33°C	Lu et al. (2003)
<i>T. viride</i>	28°C	Nevalainen et al. (1978)
<i>A. japonicus</i>	25°C	Presente trabalho
<i>T. viride</i>	25°C	Presente trabalho
<i>T. harzianum</i>	35°C	Sater; Said (2001)
<i>Trichoderma</i> sp	30°C.	Seyis; Aksoz (2004)
<i>A. foetidus</i> ,	30°C	Shah; Madamwar (2005)
<i>T. reesei</i>	30°C	Suh et al. (1988)
<i>A. niger</i>	27°C,	Yuan et al. (2005)

#### **4.4.2 - Efeito do tempo de cultivo na atividade enzimática**

Os fungos *A. japonicus* e *T. viride* foram cultivados em diferentes períodos de incubação e os resultados estão representados nas tabelas 29 e 30:

**Tabela 29** - Atividade de xilanase de por *Aspergillus japonicus* em MFT, pH 5,0, a 25°C, inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/ mL, em diferentes períodos de incubação.

Incubação (horas)	Atividade de xilanase		
	U/mL	U/30mL	Produtividade U/mL/hora
0	0	0	0
24	0,7	21,0	0,9
48	11,3	339,0	7,0
72	60,3	1809,0	25,1
96	102,1	3063,0	31,9
120	104,1	3123,0	26,0
144	79,7	2391,0	16,6

A atividade de xilanase por *A. japonicus* (104,1 U/mL) foi crescente até 120 h de cultivo (cinco dias), sendo que no sexto dia houve decréscimo acentuado da mesma (Tabela 29). A produção máxima de xilanase por *T. viride* ocorreu em 144 h de cultivo (6 dias), atingindo um pico máximo de 139,82 U/mL, decaindo para 97,34 U/mL nas 24 h seguintes (Tabela 30).



**Tabela 30** - Atividade de xilanase de *Trichoderma viride* em MFT adicionado de sorbitol 1%, pH 5,0, a 25°C, inóculo  $1 \times 10^7$  esporos/ mL, em diferentes períodos de incubação.

Incubação (horas)	Atividade de xilanase		
	U/mL	U/30mL	Produtividade U/mL/hora
0	0	0	0
24	0,6	18,0	0,7
48	9,2	276,0	5,7
72	65,9	1977,0	27,4
96	112,2	3366,0	35,0
120	135,6	4068,0	33,9
144	139,8	4194,0	29,1
168	97,5	2925,0	17,4

Tais resultados estão de acordo com diversos outros estudos, nos quais o tempo de cultivo foi um fator determinante, pois a produção atinge o máximo de forma relativamente gradativa e decai de forma brusca. Dos Reis et al. (2003) obtiveram a produção máxima de 220 U/mL de xilanase com *A. nidulans* em farelo de milho, por 6 dias. Shah; Madamwar (2005), com *Aspergillus foetidus*, tiveram atividade máxima no quarto dia (80,5 U/mL), observando também um decréscimo no sexto dia. *Aspergillus terreus* (GHANEM et al., 2000) mostrou atividade máxima (22,0 U/mL) no quarto dia de cultivo e após este período, foi observado decréscimo na produção enzimática. Outras enzimas também mostram melhor atividade em tempos semelhantes, como pectinase e celulase, produzidas por fungos quando cultivados em SSF (DESGRANGES; DURAND, 1990). O tempo ótimo de cultivo varia, mas a maioria dos trabalhos com produção de xilanase por este gênero, reporta dados semelhantes.

O tempo ótimo de produção para Sater; Said (2001) com *Trichoderma harzianum*, foi no 8º dia; Seyis; Aksoz (2005 a-b) obtiveram com *Trichoderma*

*harzianum*, atividade máxima em 7º dia e segundo Chen et al. (1997) com *Trichoderma longibrachiatum*, o tempo foi de 5 dias.

Outros tempos são relatados para outros fungos na produção de xilanase. A atividade máxima encontrada por Qinnghe et al., (2004) com *Pleurotus ostreatus* foi em 156 horas (seis dias e meio) de cultivo; Shah; Madamwar (2005) obtiveram produção máxima com *Aspergillus foetidus* no 4º dia, Ghanem et al. (2000) no 4º dia houve melhor atividade por *Aspergillus terreus*, tendo após deste tempo declínio na produção.

#### **4.4.3 - Efeito da concentração do inóculo**

Diferentes concentrações de inóculo foram também estudadas nos cultivos de *A. japonicus* e *T. viride* e os resultados encontrados estão representados nas tabelas 31 e 32.

**Tabela 31** - Atividade de xilanase de *Aspergillus japonicus* em MFT, pH 5,0, por 120 h, a 25°C, com diferentes concentrações de esporos.

Inóculo	Atividade da xilanase			
	U/mL	U/30 mL	Produtividade U/mL/hora	U/ mg proteína
$2 \times 10^6$	78,2	2346,0	19,5	19,9
$1 \times 10^7$	177,9	5337,0	44,5	40,2
$2 \times 10^7$	143,9	4317,0	35,9	39,7
$4 \times 10^7$	122,6	3678,0	30,6	28,6

**Tabela 32** - Atividade de xilanase de *Trichoderma viride* em MFT adicionado de sorbitol 1% , pH 5,0, por 144 h, a 25°C, com diferentes concentrações de esporos.

Inóculo	Atividade da xilanase			
	U/mL	U/30 mL	Produtividade U/mL/hora	U/ mg proteína
$2 \times 10^6$	234,5	7035,0	48,8	21,3
$1 \times 10^7$	220,8	6624,0	46,0	17,9
$2 \times 10^7$	213,9	6417,0	44,5	21,8
$4 \times 10^7$	93,5	2805,0	19,5	14,6

Neste presente estudo, os cultivos de *A. japonicus* com inóculo na concentração  $1 \times 10^7$  esporos/mL, contribuíram para a máxima atividade da xilanase (177,9 U/mL), observando um decréscimo da atividade quando a concentração de esporos foi diminuída ou aumentada (Tabela 31). A melhor atividade de xilanase por *T. viride* ocorreu com inóculo na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/mL (234,5 U/mL) (Tabela 32), sendo que em concentrações superiores de esporos ocorreu uma drástica queda na atividade enzimática.

Segundo Sikyta (1983), a concentração de esporos no cultivo de fungos para produção de enzimas deve ser suficientemente grande para colonizar todas as partículas do substrato. Entretanto, uma concentração de esporos muito baixa leva a uma menor produção de micélio e com isto uma menor eficiência na assimilação das fontes de carbono e nitrogênio (MEYRATH; MACINTOSH, 1963). Por outro lado quando a concentração de esporos é muito alta pode segundo Brown et al. (1978), ocorrer uma diminuição na velocidade específica do consumo de oxigênio. Em ambos os casos o metabolismo do fungo é afetado e com isto a atividade enzimática.

De modo geral, a concentração ótima de esporos para inóculo situa-se entre  $10^6$  a  $10^7$  esporos/mL, sendo que fora deste intervalo ocorre em decréscimo da atividade da xilanase (QINNGHE et al., 2004).

Seyis; Aksoz (2004) com *Trichoderma* sp e Gawande; Kamat (2000) com *Aspergillus* sp, observaram melhor atividade da xilanase com inóculos de  $1,5 \times 10^6$

esporos/mL e  $1 \times 10^6$  esporos/mL, respectivamente. Kuhad et al (1998), verificaram atividade máxima da xilanase por *Fusarium oxysporum* com inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/mL, sendo que o inóculo com  $2 \times 10^7$  de esporos possibilitou a mesma atividade e aquele contendo maiores concentrações acarretou decréscimo da atividade.

## 5 - CONCLUSÕES

- A biodiversidade, quantidade e a atividade metabólica de fungos em solo de área de caatinga são maiores nos períodos secos do ano.
- O método de triagem de fungos produtores de xilanase em cultivos contendo xilano, como única fonte de carbono, demonstrou ser válido uma vez que os resultados foram condizentes aos apresentados pelo método quantitativo e geraram diminuição de tempo e custos no processo.
- A utilização do Sistema Turbidimétrico Automatizado - Bioscreen C foi valioso na avaliação da melhor fonte de carbono para crescimento de fungos filamentosos, representando uma diminuição de custos e tempo gastos neste processo.
- A melhor fonte de carbono para produção de biomassa de fungos filamentosos nem sempre se apresenta como a melhor para indução da atividade de xilanase.
- A adição de outras fontes de carbono ao substrato utilizado pode induzir ou reprimir a atividade de xilanase.
- A fonte de carbono que induz a atividade de xilanase de um fungo pode não ser a mesma para outro fungo.

- Os cultivos efetuados em SSF com MFT demonstraram resultados superiores aos efetuados com MFS e em meio líquido de Vogel (suplementado de outras fontes de carbono).
- A atividade xilanólítica dos fungos filamentosos é afetada pela temperatura, concentração do inóculo e tempo de incubação dos cultivos.
- As melhores condições de cultivo para *A. japonicus* (177,9 U/mL) foram em cultivos efetuados em MFT, a 25°C, por 120 horas, pH 5,0, com inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos/mL
- As melhores condições de cultivo para *T. viride* (234,5 U/mL) se deram em cultivo em MFT adicionado de sorbitol 1%, a 25°C, por 144 horas, pH 5,0, com inóculo de  $2 \times 10^6$  esporos/mL.
- Mais estudos são necessários visando a otimização de xilanase por fungos filamentosos, principalmente quanto ao substrato, tipo e concentração de fonte de carbono e nitrogênio utilizada, assim como o tamanho das partículas do substrato sólido e a idade da cultura utilizada na preparação do inóculo e a sua concentração.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, Z. A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochem.**, 38, p.115-122, 2002.

ACUNÃ-ARGUELLES, M. E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 43, p. 808-814, 1995.

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydr. Polym.**, 57, p. 67-72, 2004.

AGUILAR, G.; HUITRO, N. C. Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. **Enz. Microb. Technol.**, 8, p.541–545, 1986.

AHMED, S.; AIN, Q.; A. N.; NAEEM, S. A.; RAHMAN, S.; JAMIL, A. Induction of Xylanase and Cellulase Genes from *Trichoderma harzianum* with Different Carbon Sources. **Pakistan J. Biol. Sci.**, 6 (22), p. 912-1916, 2003.

ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. 2nd Ed. Jonh Wiley & Sons, Inc. New York, 467pp., 1977.

ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; ARROYO, J.; CANTON, R.; NOMBELA, C.; SANCHEZ-PÉREZ, M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clin. Microbiol. Rev**, 13, p.167-195, 2000.

ANDRADE, V. S.; SARUBBO, L. A.; FUKUSHIMA, K. Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D- glucose as carbon source / substrate. **Braz. J. Microbiol.**, 33(2), p.106, 2002.

ANGELO, R. S. **Modo de ação de xilanases de Aspergillus sp 2M1 em seqüências de branqueamento de polpas de Eucalyptus grandis totalmente livres de cloro.** 123p. Dissertação Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 1999.

ANTHONY, T.; RAJ, K. C.; RAJENDRAN, A.; GUNASEKARAN, P. Inhibition of proteases during fermentation improves xylanase production by alkali tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. **J. Biosc. Bioeg.**, 96(4), p.394-396, 2003.

ARCHANA, A.; SATYANARANA, T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. **Enz. Microb. Technol.**, 21, p.12-7, 1997.

BABU, K. R.; SATYANARAYANA, T.  $\alpha$  -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. **Process Biochem.**, 30, p.305-309, 1995.

BAHKALI, A. H. Influence of various carbohydrates on xylanase production in *Verticillium tricorpus*. **Bioresour. Technol.**, 57, p.256-268, 1996.

BAHKALI, A. H. Production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Verticillium tricorpus* on different substrates. **Bioresour. Technol.**, 51, p.171-174, 1995.



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

BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and application. **Adv. Appl. Microbiol.**, 43, p.141-94, 1997.

BAJPAI, P. K.; BAJPAI, P.; OWEN, P. Arachidonic acid production by fungi. **App. Environm. Microbiol**, p.1255-1258, 1991.

BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. N. An endo  $\beta$ -1, 4 - xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enz. Microb. Technol.**, 29, p.328-334, 2001.

BANDELIER, S.; RENAUD, R.; DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. **Process Biochem.**, 32(2), p.141-145, 1997.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World J. Microbiol. Biot.**, 8, p.353-368, 1992.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications. **Appl. Microbiol. Biot.**, 56, p.326-338, 2001.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnol.**, 3, p.286-295, 1985.

BIESEBEKE, R. T. E; RUIJTER, G.; RAHARDJO, Y. S. P. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yeast Res.**, 2, p.245-248, 2002.

BISWAS, S. R.; MISHRA, A. K. AND NANDA, G. Xylanase and  $\beta$  - xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. **Biotechnol. Bioeng.**, 31, p.612- 616, 1988.

BOFO, D.C. S.; CASTRO, H. F. de; MEDEIROS, M. B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S.*

*cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar. **Braz. J. Food Technol.**, p. 121-124, 2005.

BOLLIER, M.; GENENCO, C. V. At the forefront of white biotechnology, household and personal care today. Supplement to Chemical Oggi /Chemistry Today, p.32-36, 2005. Disponível em: <http://www.freedom.inf.br>. Acesso em 25/03/2006.

BORGES, L.; SCLiar, M.; ALMEIDA S. Biodiversidade brasileira e produtos industriais, universidade federal de minas gerais, departamento de biologia geral, Tópicos de Genética e Evolução big003, 2003. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br>. Acesso em: 01/12/2005.

BRADNER, J. R.; SIDHU, R. K.; GILLINGS, M.; NEVALAINEN, H. Hemicellulase activity of Antarctic micro fungi. **J. Appl. Microbiol.**, 87, p.366-370, 1999.

BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C. R.; CHRISTEN, P. REVAH, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in a solid cultures from agro-industrial wastes. **Rev. Microbiol.**, 28, p.208-212, 1998.

BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enz. Microb. Technol.**, 27, p.127-133, 2000.

BRICE, R. E.; MORRISON, I. M. The degradation of isolated hemicelluloses and lignin-hemicellulose complexes by cell-free, rumen hemicellulases. **Carbohydr. Res.**, 101, p.93-100, 1982.

BROWN, D. E.; ZAINUDEEN, M. A. Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. **Biotechnol. Bioeng.**, 20, p.1045-1061, 1978.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 64(3), p.573-606, 2000.

BURLA, G.; GARZILLO, A. M.; LUNA, M.; ERCOLI, C. L., SCHIESSER A. Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Bioresour. Technol.**, 42(2), p.89-94, 1992.

CANHOS, V. P.; VAZOLER, R. F. Recursos biológicos para biotecnologia. Em: *Biotecnologia e Recursos Genéticos: desafios e oportunidades para o Brasil* (Organizadores: Silveira, J. M. F.; Poz, M.E.D.; Assad, A.L.D., 2004. Disponível em: <http://www.mct.gov.br>. Acesso em: 15/09/2005.

CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, É. B.; COELHO, G. D.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Proc. Biochem**, 40, p.359-364, 2005.

CARMONA, E. C.; PIZZIRONI-KLEINER, A. A.; MONTEIRO, R. T. R.; JORGE, J. A. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **J. Basic Microbiol.**, 38(6), p.387-394, 1997.

CARMONA, E. C. **Produção e Caracterização de xilanase de *Aspergillus versicolor***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Microbiologia Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 111pp., 1995.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in lowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Jour.**, 3, p.1-30, 1993.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Biores. Technol.**, 71, p.45-50, 2000.

CASTRO, C. R.; REED, M. S.; OLSEN, A. VI Congresso de Ecologia do Brasil. Fortaleza, Ceará - CE. 2003. Disponível em: <http://www.acaatinga.org.br>. Acesso em: 01/02/2006.

CAUSAY, D.; JANZEN, D. H.; PETERSON, A. T.; VIEGLAIS, D.; KRISHTALKA, L.; BEACH, J. H.; WILEY, E. O. Museum collections and taxonomy. **Scien.**, 305, p.1105-1107, 2004.

CHAHAL, D. S.; MC GUIRE, S.; PIKOR, H.; NOBLE, G. Production of cellulase complex by *Trichoderma reesei* Rut -C30 on lignocellulose and its hydrolytic potential. **Biomass**, 2, p.127-138, 1982.

CHEILAS, T.; STOUPIS, T.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Hemicellulolytic activity of *Fusarium oxysporum* grown on sugar beet pulp. Production of extracellular arabinase. **Proc. Biochem.**, 35, p.557-561, 2000.

CHEN, H.; XU, F.; LI, Z. Solid-state production of biopulp by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded wheat straw as substrate. **Bioresour. Technol.**, 81, p. 261-263, 2002.

CHEN, C.; CHEN, J. L.; LIN, T. Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. **Enz. Microbiol. Technol.**, 21, p.91-96, 1997.

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., 1460-1466 pp, 1965.

CONSIDINE, P. J., O'RORKE, A., HACKETT, T. J. AND COUGHLAN, M. P. Hydrolysis of beet pulp polysaccharides by extracts of solid state culture of *Penicillium capsulatum*. **Biotechnol. Bioeng.**, 31, p.433, 1988.

COSCROVE, D. J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Phys. Biochem.**, 38, p.109-124, 2000.

COURI, S. ; TERZI, S. C. ; PINTO, G.A.S. ; FREITAS, S.P. ; COSTA, C.A. da Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Proc. Biochem.**, 36, p.255-61, 2000.

DA SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Bol. SBCTA**, 31(2), p.249-260, 1997.

DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA, J. R., N. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **App. Biochem. Biotechnol.**, 84(86), p.821-835, 2000.

DE GRAAFF, L. H.; VAN DEN BROECK, H. C.; VAN OOIJEN, A. J. J.; VISSER, J. Regulation of the xylanase encoding xlnA gene of *Aspergillus tubigenesis*. **Mol. Microbiol.**, 12, p.479-490, 1994.

DE SOUZA, D. F.; DE SOUZA, C .G. M.; PERALTA, R. M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaritii* in solid-state fermentation. **Process Biochem.**, 36, p.835 -838, 2001.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microb. Mol. Biol. Rev.**, 65, p.497-522, 2001

DE VRIES, R. P.; KESTER, H. C. M.; POULSEN, C. H.; BENEN, G. A. E.; VISSER, J. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, 327, p.401- 410, 2000.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J.; DE GRAAF, L. H. CreA modulates the XlnRinduced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. **Res. Microbiol.**, 150, p.281-285, 1999.

DECRETO N° 1.298, 1994) de 27 de outubro de 1994. DECRETO DE 21 DE SETEMBRO DE 1999. ECORREGIÕES PROPOSTAS PARA O BIOMA CAATINGA Disponível em: <http://www.plantasdonordeste.org>. Acesso em: 01/02/2006.

DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N.A. (Eds.) **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. American Society for Microbiology, Washington D.C., 466p, p.66-83, 1986

DESGRANGES, C.; DURAND, A. Effect of pCO<sub>2</sub> on growth conidiation and enzyme production in solid state culture by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. **Enz. Microb. Tech.**,12, p.546 -551, 1990.

DOS REIS, S.; COSTA, M. A. F.; PERALTA, R. M. Xylanase production by a wild strain of *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum: Biol. Sci.**, 25(1), p.221-225, 2003.

DRUMOND, M. A.; KIILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F.; NASCIMENTO, C. E. S.; ALBUQUERQUE, S. G.; OLIVEIRA, V. R. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da Caatinga**. In: M. Tabarelli. (Org.). Biodiversidade da Caatinga: áreas prioritárias para conservação. Brasília, 341-346pp, 2000.

EATON, R. A.; HALE, M. D. C. **Wood: decay, pests and protection**. London, Chapman and Hall, London, 546 p.,1993.

ECORREGIÕES PROPOSTAS PARA O BIOMA CAATINGA. Seminário de planejamento ecorregional da caatinga. 28 a 30 de Novembro de 2001 - Aldeia, PE. Disponível em: <http://www.plantasdonordeste.org>. Acesso em: 18/01/2006.

FADEL, M. Production Physiology of cellulases and  $\beta$ -glycosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid-state fermentation conditions. **J. Biol. Sci.**, 1(5), p.401-411, 2000.

FENG, K. C.; LIU, B. L.; TZENG, Y. M. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid -state fermentations. **Biopro. Engin.**, 23, p.25-29, 2000.

FENICE, M.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid -state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater -based media. **J. Biotechnol.**, 100, p.77-85, 2003.

FERREIRA-FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, 27, p.1093-1109, 1994.

FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaritii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiol. Lett.**, 173, p.335-339, 1999.

FINELL, J.; JOKELA, J.; LEISOLA, M.; RIEKKOLA, M. L. Total hydrolysis of xylofuranose and xylobiose by soluble and cross-linked crystalline xylanase II from *Trichoderma reesei*. **Biocatal. Biotransfor.**, 20, p.281-290, 2002.

FREDERICK, M. M.; KIANG, C.H.; FREDERICK, J. R.; REILLY, P. J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger* I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. **Biotechnol. Bioeng.**, 27, p.525-532, 1985.

.GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; COSTA, F. Microbial activity soils under Mediterranean environmental conditions. **Soil Biol. Biochem.**, 26, p.1185 -1191, 1994.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of xylanases by immobilized *Aspergillus* sp using lignocellulosic waste. **World J. Microb. Biot.**, 16, p.111-112, 2000.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **J. Appl. Microbiol.**, 87, p.511-519, 1999.

GESSESSE, A.; MAMO, G. High-level xylanase production by na alkaliphilic *Bacillus* sp By using solid-state fermentation. **Enz. Microbial. Technol.**, 25, p.68-72, 1999.

GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **Bioresour. Technol.**, 73, p.113-121, 2000.

GHILDYAL, N. P.; GOWTHAMAN, M. K.; RAO, R. K. S. M. S.; KARANTH, N. G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. **Enz. Microb. Technol.**, 16, p.253-257, 1994.

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Studies on the Mechanism of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substances. **Biotechnol. Bioeng.**, 21, p.131-146, 1979.

GHOSE, T. K. Cellulase Biosynthesis and Hydrolysis of Cellulosic Substances. **Adv. Biochem. Eng.**, 6, p.39-74, 1977.

GOHEEN, D. W. Chemicals from wood and other biomass. Part I: Future supply of organic chemicals. **J. Chem. Educ.**, 58, p.465-468, 1981

GOMES, D. J.; GOMES, J.; STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. **J. Biotechnol.**, 33, p.87-94, 1994.

GÓMEZ - GÓMEZ, E.; RUÍZ - ROLDAN, M. C; RONCERO, M. I. G, DI PIETRO, A.; HERA, C. Fungal. **Genet. Biol.**, 35, p.213-222, 2002.

GRAJEK, W. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 26, p.126-129, 1987.

GRANDI, R.A.P. Diversidade no Reino Fungi: Deuteromycota. In: Canhos, V.P. and Vazoller, R.F. (Eds). *Microrganismos e Vírus. (Série: Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. Joly, C.A. & Bicudo, C.E.M. (Orgs). Editora da FAPESP, São Paulo, 1, p.45-50, 1999.*

GRISI, B. M.; GRAY, T. R. G. Comparação dos métodos de fumigação, taxa de respiração em resposta à adição de glicose e conteúdo de ATP, para estimar a biomassa microbiana dos solos. **Rev. Brasil. Ciênc.Solo**, Campinas, 10, p.109-115, 1986.

GUPTA, S.; KUHAD, R. C.; BHUSHAN, B.; HOONDAL, G. S. Improved xylanase production from a haloalkalophilic *Staphylococcus* sp SG-13 using inexpensive agricultural residues. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 17, p.5-8, 2001.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnol. Lett.**, 20(1), p.45-47, 1998.

HAAPALA, R.; LINKO, S.; PARKKINEN, E.; SUOMINEN, P. Production of endo-1,4- $\beta$ -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane form. **Biotechnol. Techn.**, 8, p.401-406, 1994.

HADDADIN, M. S.; ABDULRAHIM, S. M.; AL-KHAWALDEH, G. Y.; ROBINSON, R. K. Solid state fermentation of waste pomace from olive processing. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 74, p.613-618, 1999.



HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresour. Technol.**, 58, p.137-161, 1996.

HAMMOND, P. M.; HAWKSWORTH, D. L.; KALIN-ARROYO, M. T. Chapter 3. **Magnitude and distribution of biodiversity**: 3.1. The current magnitude of biodiversity. In: Heywood VH (ed). Global biodiversity assessment. Cambridge UK: Cambridge Univ Pr., p.113–138, 1995.

HAN, Y. W. Oxygen Requirerment for Growth of *Candida utilis* on semisolid straw substrate. **Biotech. Bioeng.**, 30, p.672-674, 1987.

HAN, Y. W. Microbial Utilization of Straw (a review). **Adv. Appl. Microbiol.**, 23, p.1179-153, 1978.

HAQ, I.; TASNEEM, M.; RAANA, K.; KHAN, A.; MUKHTAR, H.; JAVED, M. Optimization of Cultural Conditions for the Production of Xylanase by Chemically Mutated Strain of *Aspergillus niger* GCBCX-20. **Intern. J. Agric. & Biol.**, 6, p.1115-1118, 2004.

HAQ, I.; KHAN, A.; BUTT, W. A.; ALI, S.; QADEER, M. A. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Xylanase Production by Mutant Strain of *Aspergillus niger* GCBMX-45. **Online J. Biol. Sci.**, 2(2), p.143-144, 2002.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnol. Techn.**, 12(10), p.787-791, 1998.

HAWKSWORTH, L. D. The critical role of fungi in the conservation of biodiversity. In: VI Congreso Nacional de Micología (memorias). IX Jornadas Científicas. UNACH-Sociedad Mexicana de Micología Tapachula, Chiapas, p.5-6, 1997.

HAWKSWORTH, D. L., P. M. KIRK, B. C. SUTTON; PEGLER, D. N. **Dictionary of the Fungi** (8th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom, 616p, 1995.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycolog. Res.*, 95, p.641-655, 1991.

HE, G. Q.; CHEN, Q. H.; ZHANG, L.; LIU, X. J. Influence of medium components on elastase production using crude sources by *Bacillus* sp EL31410. *J. Zhejiang Univ. Science*, 4(2), p.142-151, 2003.

HOQ, M. M.; HEMPEL, C.; DECKWER, W. D. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of agitation, aeration, and medium components on production. *J. Biotechnol.*, 37, p.49-58, 1994.

HORAKOVA, K.; GREIFOVA, M.; SEEMANNOVA, Z.; GONDOVA, B.; WYATT, G. M. A. Comparison of the traditional method of counting viable cells and a quick microplate method for monitoring the growth characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38, p.181-184, 2003.

HOURS, R. A.; SAKAI, T. Protopectinase production in solid state culture of *Aspergillus awamori*. *Biotechnol. Lett.*, 16(7), p.721-726, 1994.

HRMOVA, M.; PETRAKOVA, E.; BIELY, P. Induction of cellulose and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo and hetero-disaccharides composed of glucose and xylose. *J. Gen. Microbiol.*, 137, p.541-547, 1991.

HRMOVA, M.; BIELY, P.; VRSANKA, M. Cellulose and xylan degrading enzymes by *Aspergillus terreus*. *Enz. Microb. Tech.*, 11, p.610-616, 1989.

HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEM, A. G. J. Glucuronoarabinoxylan from maize kernel cell walls are more complex than those from Sorghum kernel cell walls. *Carbohydr. Polym.*, 43, p.269-279, 2000.

JAIN, A.; GARG, S. K; JOHRI, B. N. Properties of a Thermostable Xylanase Produced by *Melanocarpus albomyces* IIS-68 in Solid State Fermentation. *Bioresour. Technol.*, 64, p.225-228, 1998.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Ind. Crops Prod.*, 11, p.1-5, 2000.

JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, p.337-342, 1996.

JOHNSTON, M. D. A simple and rapid test for quality control of liquid media, using the bioscreen microbiological growth analyzer. **J. Microbiol. Methods**, 32, p.37-43, 1998.

JORGENSEN, H.; MORKEBERG, A.; KROGH, K. B. R., OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microb Technol.**, 36, p.42-48, 2005.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isoenzymes. **J. Biotechnol.**, 60, p.155-163, 1998.

KAMRA, P.; SATYANARAYANA, T. Xylanase Production by the Thermophilic Mold *Humicola lanuginosus* in Solid-State Fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 119(2), p.145-158, 2004.

KHAN, A.; HAQ, IKRAM-UL; BUTT, W.A.; ALI, S. Isolation and Screening of *Aspergillus niger* Isolates for Xylanase Biosynthesis. **Biotechnol**, 2(3), p.185-190, 2003.

KHENG, P. P; IBRAHIM, C. O. Xylanase production via solid-state fermentation. Songklanakarin, **J. Sci. Technol.**, 27(2), p.332, 2005.

KIRK, P. M., CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th Ed., Wallingford, CAB International, UK, 2001.

KOHLI, U.; NIGAM, P.; SINGH, D.; CHAUDHARY, K. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. **Enz. Microbial. Technol.**, 28, p.606-610, 2001.

KOSARIC, N.; WIECZOREK, A.; COSENTINO, G.; MAGEE, R.; PRENOSIL, J. E. In "Biotechnology". Edited by Dellweg, Weinheim-Deerfield Beach, Florida. Badel Verlag Chemie, 3, p.315, 1983.

KRENGEL, U; DIJKSTRA, B. W. Three dimensional structure of endo-1, 4-  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum. **J. Mol. Biol.**, 263, p.70-78, 1996.

KUHAD, R. C; MANCHANDA, M; SINGH, A. Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. **Process Biochem.**, 33, p.641-647, 1998.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol.**, 23, p.411- 456, 1999.

LAMPEN, J. G.; KUO, S. C.; CANO, F. R. Control of synthesis and secretion of exo enzymes by yeast protoplast. In: Yeast, Mould and Plant Protoplasts (Villanueva, J.R., Acha, J.R., Gaskon, I.G. and Uruburu, F., Eds., Academic Press, London, p.143-156, 1972.

LEMOS, J. L. S.; PEREIRA, J. R. N. Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, 45(4), p.431-437, 2002.

LENARTOVICZ, V.; SOUZA, M. C. G. ; MOREIRA, F. G. ; PERALTA, R. M. Temperature and carbon source effect on the production and secretion of a thermostable beta-xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem.**, 38, p.1775-1780, 2003.

LERAYER, A. Biotecnologia na Indústria de Alimentos. Pesquisadora do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Laticínios, Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas e Conselheira do CIB. Apresentação Técnica, Conselho de informações sobre biotecnologia. Disponível em: <http://www.cib.org.br>. Acesso em 01/01/2006.

LIAB, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, S.; ERKSSON, K. E. Relationships between activities of xylanases and xilan structures. **Enzyme and Microb. Technol.**, 27(1-2), p.89-94, 2000.

LISOWSKA, K.; PALEXZ, B.; DLUGONSKI, J. Microcalorimetry as a possible tool for phenanthrene toxicity evaluation to eukaryotic cells. **Thermochim. Acta**, 411, p.181-186, 2004.

LONSANE, B. K.; RAMESH, M. V. Production of bacterial thermoestable enzymes by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production. **Adv. Appl. Microbiol.**, 15, p.1-48, 1992.

LOWRY, C. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193, p.265-275, 1951.

LU, W.; LI, D.; WU, Y. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme Microb. Technol.**, 32, p.305-311, 2003.

MACCABE, A. P.; ESPINAR, M. T. F.; DE-GRAFF, L. H.; VISSER, J.; RAMON, D. Identification, isolation and sequence of the *Aspergillus nidulans* xlnC gene encoding the 34-Kda xylanase 1, **Gene**, 175, p.29-33. 1996.

MADAMWAR, D.; PATEL, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 8(2), p.183-186, 1992.

MARGOLLES-CLARK, E.; IHNEN, M.; PENTTILÄ, M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon source. **J. Biotechnol.**, 57, p.167-179, 1997.

MARTINELLI, H. L.; PANEK, A. D. Bioquímica experimental. Rio de Janeiro: ao Livro Técnico, 112 p., 1968.

MATTILA, T.; O'BOYLE, D.; FROST, A. J. The growth of compact and diffuse variants of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic and normal whey. **Microbiol. Immunol.**, p.667-673, 1988.

MCCANN, M. C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form (CW Lloyd ed), **Academic Press**, p.109-129, 1991.

MCLEAN, R. C.; COOK, W. R. I. Practical field ecology: a guide for the Botany Department of Universities, Colleges and Schools. London: George Allen & Unncig, 215p, 1968.

MEYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 93(7), p.2764-2769, 1996.

MEYRATH, J; MACINTOSH, A. F. Size of inoculum and carbon metabolism in some *Aspergillus* species. **J. Gen. Microbiol.**, 33, p.47-56, 1963.

MILAGRES, A. M. F.; LACIS, L. S.; PRADE, R. A. Characterization of xylanase production by local isolate of *Pencillium ganthinellum*. **J. Enzyme Microb. Technol.**, 15, p.248-252, 1993.

MILLER, G. H., Use a dinitro-salicílico acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31, p.426-429, 1959.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of solid State Bioprocessing. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, 68, p.131-138, 2000.

MOREIRA, F. G.; LENARTOVICZ, V.; DE SOUZA, C. G. M.; RAMOS, E. P.; PERALTA, R. M. The use of  $\beta$ - methyl-D-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus* sp in solid state and submerged fermentations. **Braz. J. Microbiol.**, 32, p.15-19, 2001.

MOREIRA, F. G.; DE LIMA, F. A.; PEDRINHO, S. R. F.; LENARTOVICZ, V.; DE SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus tamaritii*. **Rev. Microbiol.**, 30, p.157-162, 1999.

NANDAKUMAR, M. P.; THAKUR, M. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; GHILDYAL, N. P. Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. **Lett. Appl. Microbiol.**, 29, p.380-384, 1999.

NEVALAINEN, K. M. H.; PALVA, E. T. Production of Extracellular Enzymes in Mutants Isolated from *Trichoderma viride* Unable to Hydrolyze Cellulose. **Appl. Environm. Microbiol.**, 35(1), p.11-16, 1978.

NIGAN, P.; SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **J. Basic Microbiol.**, 6, p.405-423, 1994.

NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S. ; STEVENS, W. F. ; MAW, T. ; TAN, T. K.; KHOR, E. ; WONG, S. M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. **Carbohydr. Polym.**, 49(2), p.235-237, 2002.

ORIOLE, E.; SCHETTINO, B.; VINEGRA-GONZALES, G.; RAIMBAULT, M. Solid-state Culture of *Aspergillus niger* on Support. **J. Ferment. Technol.**, 66(1), p.57-62, 1988.

PALLERONI, N. J. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72(1), p.3-19, 1997.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurianticus* em cultivo em estado sólido.** Tese Doutorado, 159p Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2003.

PALMA, M. B.; FURIGO JÚNIOR, A.; SEARA, F.; MARIOTTO, J. R. Utilização de reatores de coluna para produção de endo B -1,4 xilanases por cultivo em meio sólido. In: XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2002, Natal - RN. Anais do XIV COBEQ. Natal: UFRN, 2002.

PALMA, M. B. ; PINTO, A. L. ; GOMBERT, A. K. ; SEITZ, K. H.; KIVATINITIZ, S. C. ; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **App. Biochem. Biotechnol.**, 84 (86), p.1137-1145, 2000.

PALMA, M. B. ; MILAGRES, A. M. F. ; PRATA, A. M. R. ; MANCILHA, I. M. Influence of Aeration and Agitation Rate on the Xylanase Activity from *Penicillium janthinellum*. **Process. Biochem.**, 31(2), p.141-145, 1996

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Engin. J.**, 13(2), p.81-84, 2003.

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

PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **Int. Microbiol.**, 6, p.269-273, 2003.

PHILIPP, P.; D'ALMEIDA, M. L. O. Celulose e papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica. 2. ed. São Paulo: IPT, 964 p, 1988.

PRADE, R. A Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotech. Genet. Eng. Ver.**, p.267-285, 1995.

PURKARTHOFFER, H; STEINER, W. Induction of endo- $\beta$ -xylanase in the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microb. Technol.**, 17, p.114-118, 1995.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by White-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochem.**, 39, p.1561-1566, 2004.

RAHMAN, A. K.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase, alpha -arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. **Can. J. Microbio.**, 49, p.58-64, 2003.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, S. K.; NANPOTHIRIL, K. M.; CHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY. A. Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. **Braz. Archives Biol. Technol.**, 47(2), p.309-317, 2004.

RAMESH, K. D. C.; MANCHANDA, M. Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. **Process Biochem.**, 33(6), p.641-647, 1998.

RAMESH, M. V.; LONSANE, B. K. Ability of a solid-state fermentation technique to a significantly minimize catabolic repression of a-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. **Appl. Microbio. Biotechnol.**, 35, p.591-593, 1991.



RAWASHDEH, R.; SAADOUN, I.; MAHASNEH, A. Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. **African J. Biotechnol.**, 4(3), p.251-255, 2005.

REILLY, P. J. Xylanases: structure and function. **Basic Life Sci.**, 18, p.111 -129, 1981.

RIDDER, E. R.; NOKES, S.E.; KNUTSON, B. L. Optimization of Solid-State fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. **Am. Society Agr. Eng.**, 42(6), p.1785-1790, 1999.

RODRIGUES, E. C. **Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 152p, 1987.

RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P; GARCÍA, J.; DE BLAS, Y. C. Avances en nutrición y alimentación animal fibra soluble y su implicación en nutrición animal: enzimas y probióticos. Curso de especialización avances en nutrición y alimentación animal. Anais... Madrid: FEDNA, 22, p.134-157, 1996.

ROLAND, J. C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. **Tissue Cell**, 24, p.335-345, 1992.

RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Review Trends Genet.**, 1(1), p.12-7, 1995.

ROUKAS, T. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. **N. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 25, p.298-304, 2000.

ROYER, J. C.; NAKAS, J. P. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. **Enzyme Microb. Technol.**, 11, p.405-410, 1989.

RUIZ – ARRIBAS, A.; SANCHES, P.; CAVLETE, J. J.; RAIDÁ, M.; FERNANDEZ-ABALOS, J. M.; SANTAMARIA, R. I. Analysis of axis, a gene from *Streptomyces halstedii* JM8 that encodes a 45-kilodalton modular xylanase, xys1. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63, p.2983- 2988, 1997.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian caatinga. In seasonally dry tropical forests. (S.H. Bullock, A.M. Harold & E. Medina, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p.35-63, 1995.

SATER, M. A. A.; SAID, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **Internat. Biodet. Biodegrad.**, 47, p.15-21, 2001.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.), *Biotechnol. Ind.*, Edgard Blücher Ltda., 2, p.179-190, 2001

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; TRUFEM, S. F. B.; GRANDI, R. A. P.; MILANEZ, A. I.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. Airborne fungi in the region of Cubatão, São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, 32, p.61-65. 2001.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. **Sucessão fúngica em folhas de Alchornea triplinervia (Spreng.) M. Arg. em ambientes aquático e terrestre, na mata atlântica, Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP.** Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1993.

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum*. **Res. Microbiol.**, 153(9), p.585 -92, 2002.

SELVENDRAN, R. R. Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. **J. Cell. Sci. Suppl.**, 2, p.51-88, 1985.

SEMACE – Diagnóstico sócio-ambiental, macrozoneamento costeiro e uso projetado do solo da costa leste do Estado do Ceará. Fortaleza, 1997.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Xylanase Production from *Trichoderma harzianum*. **Food Technol. Biotechnol.** 43(1), p.37- 40, 2005a.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3, **Intern. Biodeter. Biodegr.**, 55, p.115-119, 2005b.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Production of Lactase by *Trichoderma* sp. **Food Technol. Biotechnol.**, 42(2), p.21-124, 2004.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Determination of some physiological factors affecting xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3, **Microbiol.**, 26, p.89-95, 2003.

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

SHOJAOSADATI, S. A.; BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochem.**, 37, p.909-914, 2002.

SIKYTA, B. Development of microbial process. In: **Method Ind. Microbiol.**, p.250-274, 1983.

SILVA, G. A.; MAIA, L. C.; SILVA, F. S. B. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, **Brasil. Ver. Bras. Bot.**, 24(2), p.135-143, 2001.

SILVEIRA, D. P. F. Q.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A.; MILAGRES, A. M.; DE - MEDEIROS, C. L.; FILHO, E. X. A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. **J. Ind. Microb. Biotechnol.**, 23, p.682 -685, 1999.

SIMPSON, H. E.; HAUFLER, U. R.; DANIEL, R. M. An extremely thermostable xylanase from the Thermophilic *Eubacterium Thermotoga*. **J. Biochem. J.**, 277, p.413-418, 1991.

SINGH, S.; PILLAY, B., ORIOR, A. Thermal stability of  $\beta$ -xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme Microb. Technol.**, 26, p.502-508, 2000.

SINGH, A.; KUHAD, R. C.; KUMAR, M. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. **Enz. Microb. Technol.**, 17, p.551-553, 1995.

SKOWRONEK, M.; FIEDUREK, J. Optimization of Inulinase Production by *A. niger*. **Food Technol. Biotechnol.**, 42(3), p.141-146, 2004.

SKUJINS, J.; ALLEN, M. F. Use of mycorrhizae for land rehabilitation. **Mircen J.**, 2, p.161-176, 1986.

SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochem.**, 35, p.857- 861, 2000.

SOARES, M. C. N.; SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp **Rev. Microbiol.**, 30(4), p.299-303, 1999.

SOLIS-PEREYRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; GUTIERREZ- ROJAS, M.; ROUSSOS, S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, P.; GUNASEKARAN, P.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 12, p.257-260, 1996.

SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation **Bior.Technol.**, 96(14), p.1561-1569, 2005.

SOUTO, P. C.; SOUTO, J. S.; SANTOS, R. V.; ARAÚJO, G. T.; SOUTO, L. S. Decomposição de esterco dispostos em diferentes profundidades em área degradada no semi-árido da Paraíba, **R. Brás. Ci. Solo**, 29, p.125-130, 2005.

SOUZA, M. C. O.; ROBERTO, I. C.; MILAGRES, A. M. F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 52, p.768-772, 1999.

SRIVASTAVA, R.; SRIVASTAVA, A. K. Characterization of a bacterial xylanase resistant to repression by glucose and xylose. **Biotechnol. Lett.**, 15, p.847-852, 1993.

STALEY, J. 1998. Microbial Diversity and the Biosphere. Disponível em: <http://www.bdt.org.br>. Acesso em: 28/03/2006.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology on microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 22, p.33-64, 2002.

SUH, D. H.; BECKER, T. C.; SANDS, J. A.; MONTENECOURT, B. S. Effects of temperature on xylanase secretion by *Trichoderma reesei*. **Biotechnol. Bioeng.**, 32, p.821-825, 1988.

TAKENISHI, S.; TSUJISAKA, Y. On the modes of action of three xylanases produced by a strain of *Aspergillus niger* van Tieghen. **Agric. Bio. Chem.**, 39, p.2315-2323, 1975.

TAUK- TORNISIELO, S. M.; GARLIPP, A. B.; RUEGGER, M. J. S.; ATTILI, D. S.; MALAGUTTI, E. N. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **J. Basic Microbiol.**, Alemanha, 45(1), p.72-82, 2005.

TAUK, S. M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Rev. Bras. Geoc.**, 20(1-4), p.299-301, 1990.

TEUNISSEN, M. J.; CAMP, H. J. M. O. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antony van Leeuwenhoek*, 63, p.63-76, 1993.

TONUKARI, N. J.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D. Influence of carbon source on the expression of *Cochliobolus carbonum* xylan-degrading enzyme genes. **African J. Biotechnol.**, 1(2), p.64-66, 2002.

TORRONEN, A.; ROUVINEN, J. Structural and functional properties of low molecular weight endo- 1, 4-  $\beta$ -xylanases. **J. Biotechnol.**, 57, p.137-149, 1997.

TORRONEN, A.; MACH, R. L.; MESSNER, R.; GONZALEZ, R.; KALKKINEN, N.; HARKKI, A.; KUBICEK, C. P. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. **Biotechnol.**, 10, p.1461-1465, 1992.

VAHIDI, H. K.; OBARFARD, F.; NAMJOYAN, F. Effect of cultivation conditions on growth and antifungal activity of *Mycena leptocephala*. **African J. Biotechnol.**, 3(11), p.606-609, 2004.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bior. Technol.**, 74, p.175-178, 2000.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bull**, 13, p.42-43, 1956.

WAINWRIGHT, M. P.; TRINCE, A. P. J.; MOORE, D. Aggregation of spores and biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in liquid culture and the effect of anionic polymers on this process. **Mycol. Research**, 97(7), p.801-806, 1993.

WANG, S.; YEN, Y.; SHIH, I.; CHANG, A. C.; CHANG, W.; WU, W.; CHAI, Y. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A -151. **Enz. Microb. Technol.**, 33, p.917-925, 2003.

WILKIE, K. C. B. The hemicelluloses of grasses and cereals. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 36, p.215-264, 1979.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, 52, p.305-317, 1988.

WONG, K. K.Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Functional interactions among three xylanases from *Trichoderma harzianum*. **Enz. Microb. Technol.**, 8, p.617-622, 1986.

WU, L. C.; HANG, Y. D. Acid protease production from *Neosartorya fischeri* Lebensm.-Wiss. **Technol.**, 33, p.44-47, 2000.

XIONG, H., VON WEYMARN, N.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochem.**, 39, p.729-733, 2004.

YANG, X.; CHEN, H.; GAO, H.; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bior. Technol.**, 78, p.277-80, 2001.

YOSHIOKA, H.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N., NAYASHIDA. S. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. *Agric. Biol. Chem.*, 45, p.579-86, 1981.

YUAN, Q.; WANG, J.; ZHANG, H.; QIAN, Z. Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger*. **Process Biochem.**, 40(10), p.3255-3257, 2005.

ZEILINGER, S.; MACH, R. L.; SCHINDLER, M.; HERZOG, P.; KUBICEK, C. P. Different inducibility of expression of the two xylanase genes xyn1 and xyn2 in *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.**, 271, p.25624-25629, 1996.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edoddes* using fruit processing wastes. **Process Biochem.**, 35, p.825-830, 2000.