

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2020.

Chadia Chahud Maestrello

**Produção de celulasas e xilanases pelo fungo *Aspergillus labruscus* ITAL
22.223 cultivado em Fermentação em Estado Sólido utilizando resíduos
agroindustriais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara/SP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Araraquara/SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Maestrello, Chadia Chahud
M186p Produção de celulasas e xilanases pelo fungo *Aspergillus*
laibrusci ITAL 22.223 cultivado em fermentação em estado
sólido utilizando resíduos agroindustriais / Chadia Chahud
Maestrello. – Araraquara : [s.n.], 2018
93 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

1. *Aspergillus*. 2. Celulase. 3. Fermentação em estado
sólido. 4. Resíduos agrícolas. 5. Enzimas de fungos. I. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

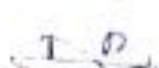
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Aspergillus fabryanus* ITAL 22 223 cultivado em Fermentação em Estado Sólido utilizando resíduos agroindustriais"

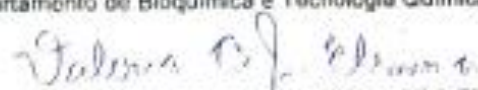
AUTORA: CHADIA CHAHUD MAESTRELLO

ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto


Prof. Dr. DANIELA ALONSO BOCCHINI
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profa. Dra. VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 23 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Chadia Chahud Maestrello

Nome em citações bibliográficas: MAESTRELLO, C. C.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP. Avenida Bandeirantes, 3900, Vila Monte Alegre, 14040-901 – Ribeirão Preto/SP – Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2016 – 2018 – Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título “Produção de celulasas e xilanases pelo fungo *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 cultivado em Fermentação em Estado Sólido utilizando resíduos agroindustriais”. Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães.

2010 – 2014 – Graduação em Engenharia de Energias Renováveis e Ambiente, modalidade Bacharelado. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Brasil. Título: Produção de Biogás a partir de cama de frango e dejetos bovinos. Orientador: Prof. Dr. João Antônio Galbiatti.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015 – Água em curso (Carga horária: 12h)
Agência Nacional de Água, ANA, Brasil.

2015 – Capacitação em Energia Renováveis – O Biogás (Carga horária: 16h)

Observatório de Energias Renováveis para a América Latina e Caribe, ONUDI, Uruguai.

2016 – Escrita Científica (Carga horária: 6h)

Universidade de São Paulo, USP, Brasil

2016 – Espectrometria de Massas – Avançado (Carga horária: 8h)

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA/ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2013 – 2015 – Membro Discente da Comissão Própria de Avaliação.

Universidade de Araraquara, UNIARA.

2015 – 2016 – Bolsista FAPESP, treinamento técnico TT3

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

2016 – 2018 – Projeto de Mestrado: Análise secretômica da linhagem *Aspergillus* sp. cultivado em fermentação em estado sólido (FES) contendo bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

CHAHUD, E.; MAESTRELLO, C. C.; CHAHUD, B.; NUNES BRANCO, L. A. M. Proposta de dimensionamento de peças de madeira submetida à tração paralelas às fibras*. Construindo, v. 9, p. 1-7, 2017.

Apresentação de Trabalhos

MAESTRELLO, C. C., JORGE, J. A., GUIMARÃES, L. H. S. Production of Enzymes of the Cellulolytic Complex by *Aspergillus labruscus* Under Solid State Using Agroindustrial by Products. 2017. (Apresentação de trabalho/Congresso).

MAESTRELLO, C. C., JORGE, J. A., GUIMARÃES, L. H. S. Produção de Enzimas do Complexo Celulolítico de *Aspergillus labruscus* Utilizando Produtos/Resíduos Agroindustriais em Fermentação em Estado Sólido (FES). 2017. (Apresentação de trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

5º Congresso Internacional de Bioenergia. Curitiba-PR, 10 a 13 de agosto de 2010. (Congresso).

6º Congresso Internacional de Bioenergia. Curitiba-PR, 16 a 19 de agosto de 2011. (Congresso).

Encontro Internacional Brasil-Moçambique: Perspectivas para os Biocombustíveis. Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto-SP, 16 de março de 2011. (Encontro).

Semana de Engenharia Bioenergética. Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, 23 a 27 de maio de 2011. (Encontro).

Semana da Engenharia Bioenergética: Inovações Tecnológicas em Energias Renováveis. Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, 01 a 04 de outubro de 2012. (Encontro).

XIV Feira de Cursos da UNIARA. Centro Universitário de Araraquara- UNIARA. 2013. (Feira)

46a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Águas de Lindóia-SP, 27 a 30 de julho de 2017. (Congresso).

2º Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial. Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto-SP, 03 a 06 de setembro de 2017. (Congresso).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, Gilberto (*in memoriam*), Marisa e Muriel, por todo amor, carinho, compreensão e união em todos os momentos desta e de muitas trajetórias.

Agradecimentos

A Deus, primeiramente, pela oportunidade da encarnação nesta Terra para minha própria evolução, me proporcionando luz, força, fé e amor no meu caminhar.

À minha mãe, Marisa Chahud, por todo amor dedicado ao longo de todos anos, desde a minha chegada. Amo você eternamente.

Ao meu pai, Gilberto Antonio Maestrello (*in memoriam*), por ter deixado seu legado de amor, que me acompanhará por todos os dias da minha vida. Amo você eternamente. Nos encontraremos em breve.

À minha irmã, Muriel Chahud Maestrello, pela paciência e compreensão durante todos esses 25 anos de convivência. Amo você.

Aos meus tios, Fernando Chahud e Adriana Chahud, e aos meus primos, Fernando Jr. e Leonardo, pela convivência excepcional nestes dois anos que estive em Ribeirão Preto. Serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim. Amo vocês.

Ao meu tio, Eduardo Chahud, o Engenheiro mais admirável que conheci nesta vida, por todo apoio e incentivo de ingressar neste mundo acadêmico, afinal, engenheiro entende engenheiro!!! Obrigada por tudo o que fez e faz por nossa família. Amo você.

Às minhas primas Bruna, Mariana e Natália pela amizade inabalável que veio, literalmente, do berço. Amo vocês eternamente.

Aos meus padrinhos Ricardo Chahud e Eliana Bueno da Silva Chahud que estão presentes em todos os momentos da minha vida, torcendo e incentivando-me a seguir em frente. Amo vocês.

Às minhas tias, Adur, Badia e Vitória (*In memoriam*), que sempre acreditaram no meu potencial, incentivando-me em todos os momentos que estivemos juntas neste plano. A saudade é imensa, mas a certeza do reencontro é confortador. Amo vocês.

Ao meu Amor, pessoa maravilhosamente impressionante. Obrigada por todo amor, carinho, amizade e paciência ao longo desses últimos anos. Amo você infinitamente.

Ao prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, pela oportunidade, confiança depositada, pelos ensinamentos e orientações. Muito obrigada.

Ao prof. Dr. João Jorge Atílio, pelos ensinamentos e disponibilidade.

Aos meus eternos e fiéis amigos de vida, Jéssica e Paulo, por estarem comigo em todos os momentos nesses ultimos 15 anos de amizade. Obrigada por todos os churrascos e jantares. Com certeza, essa amizade será eterna. Amo vocês infinitamente.

Aos meus amigos da graduação, Felipe e Guilherme, que, apesar da distância, fazem presentes na lembrança, proporcionando imensas saudades e a certeza de que a amizade se prolongará por todos os dias desta vida. Saudades. Amo vocês.

Aos amigos que Ribeirão Preto me proporcionou. Thaís, Rayza, Pedro, Isabela, Larissa e Fernanda pelo companherismo, amizade, risadas, traquinagens no laboratório e sobremesas pós almoço. Sem vocês os dias não teriam luz!!!

Ao técnico Maurício pelo auxílio e apoio no laboratório.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela disponibilidade para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Insitituto de Química de Araraquara, UNESP, por estarem sempre a disposição quando foi necessário, em especial às secretárias da Pós-Graduação em Biotecnologia.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

“Sei o que devo ser e ainda não sou, mas rendo graças a Deus por estar trabalhando, embora lentamente, por dentro de mim próprio, para chegar, um dia, a ser o que devo ser.”

Chico Xavier

RESUMO

A prospecção de enzimas fúngicas tem sido amplamente estudada nos últimos anos, principalmente utilizando a Fermentação em Estado Sólido (FES). A procura por enzimas microbianas, principalmente de fungos filamentosos, capazes de degradar material lignocelulósico, tem despertado grande interesse para processos biotecnológicos como, por exemplo, na produção de bioetanol, a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Fungos do gênero *Aspergillus* são reconhecidos como ótimos produtores de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico, e a busca por novas linhagens com potencial de produção destas torna-se um grande desafio. *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 é um fungo filamentoso recentemente isolado no sul do Brasil e, por este motivo, não há estudos na literatura sobre seu potencial de produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Diante do exposto, este estudo visou a produção e quantificação de enzimas do complexo celulolítico (celulase total, endoglucanase e β -glicosidase) e hemicelulolítico (xilanase), a partir de fermentação em estado sólido utilizando resíduos/produtos agroindustriais como substratos. Neste contexto, a maior atividade enzimática de xilanase foi obtida na presença de farelo de trigo (74,83 U/g de substrato) e de β -glicosidase em farelo de aveia (6,35 U/g de substrato) como substratos/fontes de carbono. Sendo a produção de xilanase em FES a que mais se destacou, algumas características da enzima contida no extrato bruto foram determinadas. Apresentou temperatura ótima de reação de 55 °C e pH ótimo de 5,5. Com relação à estabilidade térmica, a enzima manteve sua atividade acima de 50% quando incubada a 45°C por 180 minutos. No que diz respeito à estabilidade ao pH, a enzima apresentou T_{50} de 3 horas quando mantida em valores de pH de 5,5 a 10. Quanto à resistência a solventes e compostos, de modo geral, a atividade xilanásica foi reduzida para a maioria dos compostos analisados. Este estudo indentificou que o fungo *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 produz níveis significativos de xilanase quando cultivado em farelo de trigo, e enzimas do complexo celulolítico, como β -glicosidase e endoglucanase em farelo de aveia e soja moída, respectivamente, sendo todas de grande interesse biotecnológico possibilitando direcionar diversos estudos para futuras aplicações industriais.

Palavras chaves: *Aspergillus*, Celulase, Fermentação em Estado Sólido, Resíduos agroindustriais, Xilanase.

ABSTRACT

Prospecting of fungal enzymes has been largely studied in recent years, especially by means of Solid-State Fermentation (SSF). The search for microorganisms' enzymes able to degrade lignocellulosic material, mainly those of filamentous fungi, has attracted interest for application in biotechnological processes, such as in production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse. *Aspergillus* species are well known for their capability to produce cellulosic and hemicellulosic enzymes complex and the search for strains with this potential is an important challenge. *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 is a filamentous fungus recently isolated in south of Brazil with unknown potential to produce cellulolytic or hemicellulolytic enzymes. This study aimed the production and quantitation of enzymes of the complex cellulolytic (total cellulose, endoglucanase and β -glucosidase) and hemicellulolytic (xylanase) obtained under solid-state fermentation using agroindustrial waste and product as substrates. According to this, the greatest enzymatic productions of xylanase (74.83 U/g of substrate) and β -glucosidase (6.35 U/g of substrate) were obtained using wheat bran and oat bran as substrates during SSF fermentation, respectively. Taking in account the best production of xylanase in SSF, some biochemical characteristics were determined for the enzyme contained in the crude extract. Optimal of temperature for enzyme activity was 55°C and optimal pH was 5.5. Regarding its thermal stability, the enzyme kept its activity above 50%, when incubated at 45°C for 180 minutes. For pH conditions, the enzyme presented half-life (T_{50}) of 3 hours at pH range 5.5-10. As for resistance to solvents and compounds, xylanase activity was generally reduced for most analyzed. This study identified that the fungus *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 produces significant levels of xylanase when grown in wheat bran, and enzymes of the cellulolytic complex, such as β -glycosidase and endoglucanase in oat bran and ground soybeans, respectively, all of them of great biotechnological interest making it possible to direct several studies for future industrial applications.

Keywords: *Aspergillus*, Cellulase, Solid-State Fermentation, Agro industrial residues, Xylanase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da parede celular vegetal.	20
Figura 2. Estrutura da cadeia linear da celulose.....	21
Figura 3. Estrutura das homoxilanas e heteroxilanas.....	23
Figura 4. Estrutura química dos precursores primários da lignina.....	25
Figura 5. Principais tipos de ligações na estrutura da lignina.....	26
Figura 6. Ação das enzimas celulolíticas na degradação da celulose.....	28
Figura 7. Ação das enzimas hemicelulolíticas na degradação da xilana.....	30
Figura 8. Estrutura do conidióforo de <i>Aspergillus</i> sp.	34
Figura 9. Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico.....	36
Figura 10. <i>Aspergillus labruscus</i> ITAL 22.223	37
Figura 11. Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.	45
Figura 12. Crescimento do fungo <i>Aspergillus labruscus</i> ITAL 22.223	46
Figura 13. Crescimento do fungo <i>A. labruscus</i> cultivado em bagaço de cana-de-açúcar, casca de mandioca, farelo de aveia, farelo de trigo, farinha de centeio, soja moída e farelo de arroz.	57
Figura 14. Quantificação de proteínas na presença e ausência de <i>A. labruscus</i> em FES e eletroforese SDS-PAGE (12%)	58
Figura 15. Determinação da atividade específica xilanásica obtidas de diferentes cultivos de <i>A. labruscus</i> em FES.....	62
Figura 16. Influência do tempo de cultivo de <i>A. labruscus</i> na produção de xilanase.	63
Figura 17. Determinação de temperatura ótima, pH ótimo, estabilidade térmica e estabilidade ao pH.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos filamentosos capazes de produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em FES.	41
Tabela 2. Exemplos de fungos filamentosos capazes de produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em FSbm.....	42
Tabela 3. Produção de celulase total, endoglucanase, β -glicosidase e xilanase pelo fungo <i>A. labruscus</i>	60
Tabela 4. Efeito de diferentes agentes umectantes sobre a produção de xilanase por <i>Aspergillus labruscus</i>	64
Tabela 5. Efeito de diferentes compostos na atividade xilanásica de <i>A. labruscus</i> ..	69

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – micrograma	mL – mililitro
μL – microlitro	mmol.L^{-1} – milimol/Litro
μmol – micromol	nm – nanômetros
atm – atmosfera	$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius
BDA – Batata Dextrose Ágar	pH – potencial hidrogeniônico
BF – Fermentação por Biofilmes	rpm – rotações por minuto
BSA – Albumina Soro Bovino	SDS - dodecil sulfato de sódio
DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico	U – unidade de atividade enzimática
EC – Enzyme Commission	V – volts
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético	v/v – volume por volume
FES – Fermentação em Estado Sólido	W- watt
FSbm – Fermentação Submersa	
g – grama	
<i>g</i> - aceleração da gravidade	
HMF – hidroximetilfurfural	
kDa- mil Daltons	
L – litro	
m/v – massa por volume	
mA – miliampere	
mg- miligrama	
<i>p</i> NP β G - <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina	19
1.1.1 Celulose	20
1.1.2 Hemicelulose	22
1.1.2.1 Xilanas.....	22
1.1.3 Lignina.....	24
1.2.1 Complexo celulolítico	27
1.2.2 Complexo hemicelulolítico	29
1.2.2.1 Aplicações biotecnológicas das xilanases	31
1.3 Fungos filamentosos	32
1.3.1 <i>Aspergillus</i>	33
1.3.2 Regulação de enzimas xilanolíticas por <i>Aspergillus</i>	35
1.3.1.1 <i>Aspergillus labruscus</i>	36
1.4 Fermentação em Estado Sólido (FES) X Fermentação Submersa (FSbm)	38
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Microrganismo e manutenção da linhagem em laboratório	46
3.2 Coleta e preparo dos resíduos/produtos agroindustriais.....	46
3.3 Obtenção de culturas em Fermentação em Estado Sólido (FES)	48
3.3.1 Composição das soluções salinas	49
3.4 Determinação da temperatura ótima de crescimento visual em FES .	50
3.5 Obtenção do extrato enzimático	50

3.6	Quantificação proteica.....	50
3.7	Eletroforese em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)	50
3.8	Determinação das atividades enzimáticas	51
3.8.1	Celulase total – FPase.....	51
3.8.2	Carboximetilcelulase (CMCase)	52
3.8.3	β -glicosidase.....	53
3.8.4	Xilanase.....	53
3.9	Determinação da temperatura ótima de atividade xilanásica em extrato bruto	54
3.10	Determinação do pH ótimo de atividade xilanásica em extrato bruto	54
3.11	Determinação da termoestabilidade das xilanases do extrato bruto	55
3.12	Determinação da estabilidade ao pH das xilanases do extrato bruto	55
3.13	Efeito de diferentes compostos na atividade xilanásica	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Fermentação em Estado Sólido (FES).....	56
4.3	Produção de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico por <i>A. labruscus</i>	59
4.4	Produção de xilanase em função do tempo de cultivo utilizando farelo de trigo em FES	62
4.5	Efeito de diferentes soluções umectantes na produção xilanásica ...	63
4.6	Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade xilanásica.....	65
4.7	Efeito de diferentes compostos na atividade xilanásica	68
5	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma vasta biodiversidade que ocupa lugar importante na economia nacional, sendo o setor agroindustrial responsável por 40% do PIB brasileiro. Neste contexto, o bioprocessamento da enorme variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais gerados tem grande interesse econômico (BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, 2010; RAMOS, 2000). Muitos destes bioprocessos têm sido desenvolvidos em larga escala utilizando diversos resíduos lignocelulósicos como substratos para produção de várias moléculas com valores agregados consideráveis, como proteínas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (ALEXANDRINO et al., 2007). A principal vantagem de se utilizar estes resíduos é favorecer a diminuição de problemas ambientais causados pelo acúmulo destes na natureza (VIRMOND, 2011).

O bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, é um dos resíduos industriais que possui valor agregado ainda pouco aproveitado, pois a cada tonelada de cana-de-açúcar moída cerca de 250 quilogramas deste resíduo são gerados (ANDRIETTA, 2009); 75% do bagaço de cana são destinados para incineração a fim de se obter vapor para produção de energia elétrica e os 25% restantes são estocados ou depositados em aterros, os quais poderiam ser utilizados para a produção de etanol de segunda geração (DAWSON; BOOPATHY, 2008). Desta forma, muitos estudos estão sendo direcionados para conversão bioquímica da celulose e da hemicelulose presente neste resíduo para produção deste biocombustível (JOHNSON, 2016).

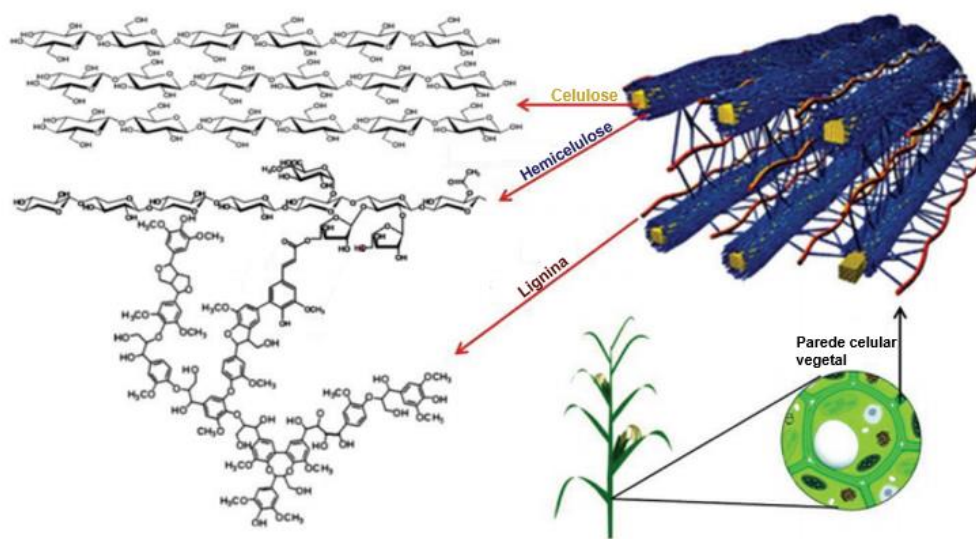
Além do bagaço de cana-de-açúcar, diversos resíduos e produtos agroindustriais como mandioca, soja, beterraba, batata doce, farelo e palha de trigo e arroz, casca de soja, milho e arroz, resíduos da indústria de processamento de café (polpa e casca), entre outros, são utilizados em pesquisas para aproveitamento em bioprocessos por conterem em sua composição material lignocelulósico (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

1.1 Biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina

Em geral, o termo biomassa define-se como qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas

bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. As biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1), além de proteínas, lipídeos e composto inorgânicos. Sua composição, em quantidades, depende de diversos fatores como o tipo de vegetal, condições de crescimento e tempo de colheita, entre outros (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SILVA, 2010).

Figura 1. Esquema da parede celular vegetal.



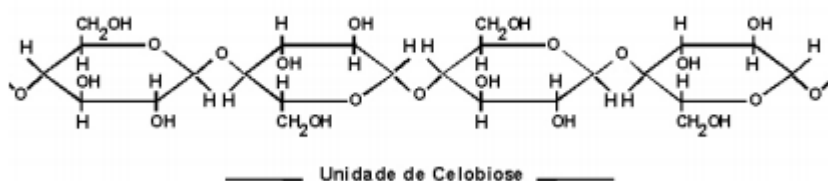
Fonte: Volynets, Ein-Mozaffari e Dahman (2017), adaptado pela Autora (2018).

1.1.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo composto por até 15.000 unidades de β-D-glicose unidas através de ligações glicosídicas do tipo β-D(1,4) (Figura 2) (ARANTES e SADDLER, 2010). Nos vegetais, os polímeros de glicose são unidos paralelamente por ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, e forças de Van der Waals na estrutura cristalina, denominada fibrila elementar altamente ordenada, consistindo em cerca de 40 cadeias de glicano, formando as fibrilas da celulose (JEFFRIES, 1990; BAYER; LAMED, 1992; MARTINEZ et al, 2005; BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992; SILVA, 2010). A junção destas fibrilas dá a formação das microfibrilas, onde distinguem-se regiões cristalinas que são conhecidas por serem de

elevada organização, onde a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação devido à grande quantidade de ligações de hidrogênio presente e regiões amorfas, menos organizadas, onde a fibra apresenta maior grau de flexibilidade devido ao menor número de ligações de hidrogênio presente (RABELO, 2010).

Figura 2. Estrutura da cadeia linear da celulose, formada por unidades de celobiose.



Fonte: Da Luz, Gonçalves e Del'Arco Jr. (2006)

O grau de polimerização e o índice de cristalinidade da celulose são propriedades de extrema importância para a classificação dos polímeros celulósicos. Enquanto que o grau de polimerização informa a frequência relativa das ligações glicosídicas internas e terminais, definido com base no número médio de monômeros e na massa média do polímero, o índice de cristalinidade está associado à reatividade do substrato e pode ser quantificado pelo método de difração de raios X (D'ALMEIDA, 1988). Estas características, junto com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula de celulose grande resistência à hidrólise, indicando um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas (ARANTES; SADDLER, 2010).

No entanto, no que diz respeito à hidrólise da celulose, principalmente através da ação das enzimas que compõem o complexo celulolítico, esta pode ser facilitada quando as fibras da celulose são imersas em água ou em certos solventes orgânicos, sofrendo intumescimento. Este intumescimento pode ser intercristalino ou intracristalino, sendo que o agente intumescedor intercristalino (geralmente a água) penetra nas regiões amorfas e o agente intumescedor intracristalino penetra nas regiões cristalinas, que pode ser efetuado pelo uso de soluções concentradas de ácidos e bases fortes e de soluções salinas (RABELO, 2010).

1.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose, também chamada de poliose, é um heteropolímero altamente ramificado composto por resíduos de hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose, D-ramnose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos. A variedade de ramificações e ligações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA et al., 2009).

Sendo o segundo tipo de polissacarídeo mais importante da parede celular vegetal, a hemicelulose corresponde entre 15 a 45% da sua composição e interage com as fibras da celulose através de ligações de hidrogênio e à lignina por interações covalentes, proporcionando elasticidade. Apresentam baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não possuem regiões cristalinas, sendo mais suscetível à hidrólise ácida, apresentando, geralmente, grau de polimerização bem menor que o da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989; AFONSO, 2012; PALMA, 1993; OGATA, 2013; SILVA, 2010).

As hemiceluloses são, geralmente, classificadas de acordo com o resíduo de açúcar da cadeia principal como, por exemplo, xilanas, mananas e glucanas. Existem, também, diferentes subclasses de hemiceluloses, dentre elas, as glucoroxilanas, arabinoxilanas, mananas lineares, glicomananas, galactomananas, β -glucanas e xiloglucanas. Algumas tem função de estabilizar a parede celular vegetal através de ligações de hidrogênio com a celulose e de ligações covalentes com a lignina. Outras podem ser utilizadas como energia extracelular e mecanismo de retenção de água em sementes (WYMAN et al., 2005; OGATA, 2013).

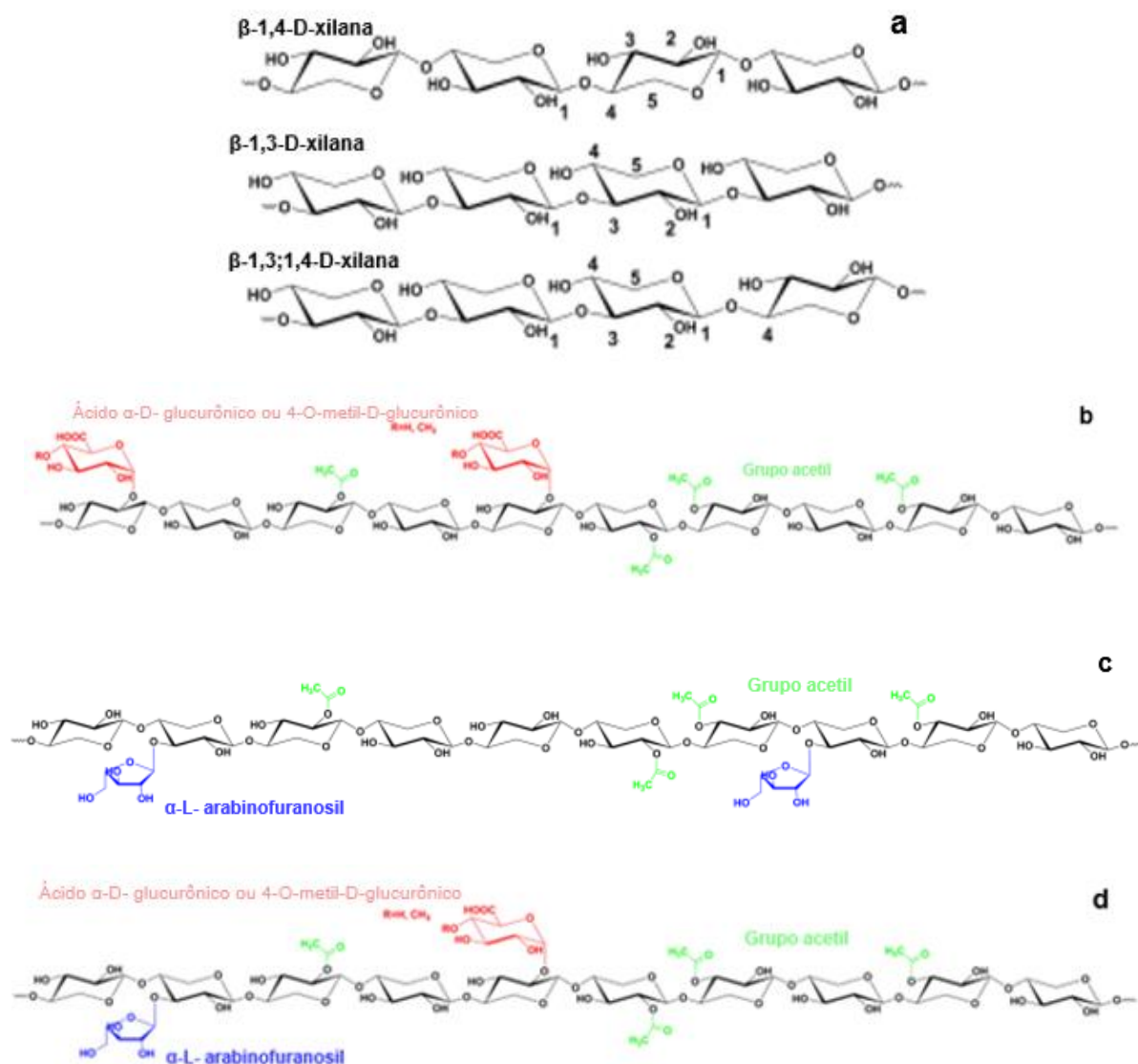
1.1.2.1 Xilanas

As xilanas são polissacarídeos predominantemente encontrados em madeiras duras e biomassa herbácea. São constituídas por monômeros de xilose e podem ser divididas em duas categorias: homoxilana e heteroxilanas (ZHOU et al., 2016).

As homoxilanas são formadas por apenas resíduos de D-xilose, que incluem β -1,4-D-xilana, β -1,3-D-xilana e β -1,3;1,4-D-xilana (Figura 3 a). As heteroxilanas podem

ser classificadas em glucuroxilana (Figura 3 b), arabinoxilana (Figura 3 c) e glucuronoarabinoxilana/arabinoglucuroxilana (Figura 3 d).

Figura 3. Estrutura das homoxilanas e heteroxilanas. Homoxilanas (a), Heteroxilanas: glucuroxilana (b), arabinoxilana (c) e glucuronoarabinoxilana/arabinoglucuroxilana (d).



Fonte: Zhou et al. (2016), adaptado pela Autora (2018).

As glucuroxilanas possuem o ácido α -D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico, como grupos primários laterais. Também podem formar ligações éster com a lignina através dos ácidos urônicos. Além disso, os grupos acetil podem estar ligados no carbono 2 e/ou carbono 3 dos resíduos de xilose. As glucuroxilanas são os maiores polissacarídeos da hemicelulose de madeira dura, sendo responsável por 15-30% da massa total (ZHOU et al., 2016).

As arabinoxilanas são os principais polissacarídeos da hemicelulose, contém arabinose como grupos primários laterais, ligados ao carbono 3 das unidades de xilose na estrutura principal. Os grupos acetil, assim como nas glucuroxilanas, podem estar ligados nos carbono 2 e/ou carbono 3 dos resíduos de xilose. As arabinoxilanas podem ser ligados covalentemente com a lignina através dos grupos fenólicos (ZHOU et al., 2016).

As arabinoxilanas também podem ter anexados às cadeias laterais o ácido α -D-glucurônico, ou 4-O-metil-D-glucurônico, sendo referidas como arabinoglucuroxilana, e as glucuroxilanas podem ter os resíduos de arabinose ligados à cadeia lateral, sendo referidas como glucuronoarabinoxilana (ZHOU et al., 2016).

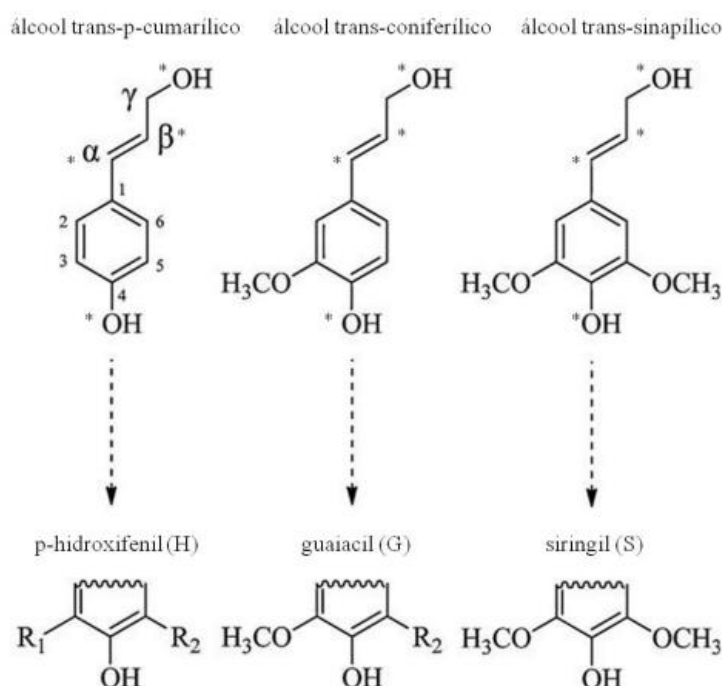
Devido à variedade e complexidade da cadeia de xilana, para sua hidrólise completa é necessária a ação sinérgica de enzimas que compõe o complexo hemicelulolítico (COLLINS et al, 2005; MICHELIN et al., 2008).

1.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula formada por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Para que ocorra sua formação, três precursores monoméricos são responsáveis pela polimerização, sendo eles os álcoois *p*-cumarílico (precursor das unidades *p*-hidroxifenílicas), coniferílico (precursor das unidades guaiacil) e sinapílico (precursores das unidades siringil) (Figura 4) (SILVA, 2010; CALVO-FLORES et al., 2015). Esses álcoois podem formar um complexo polimérico com uma elevada variedade de interações intermoleculares por meio de ligações a sítios variados (HIGUCHI, 1982; SEDEROFF et al., 1999).

Durante o desenvolvimento das plantas, a lignina é incorporada como o último componente da parede celular, interpenetrando as fibrilas de celulose, acarretando no fortalecimento da parede, sendo representada como um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza e é o maior depósito de estruturas química aromáticas. Suas principais funções são o de transporte de água, nutrientes e metabólitos, resistência mecânicas dos vegetais e proteção dos tecidos contra oxidação, degradação enzimática e ação de microrganismos (SILVA, 2010; MARABEZI, 2009; CAMPBELL e SEDEROFF, 1996; ROSA, 2014).

Figura 4. Estrutura química dos precursores primários da lignina.

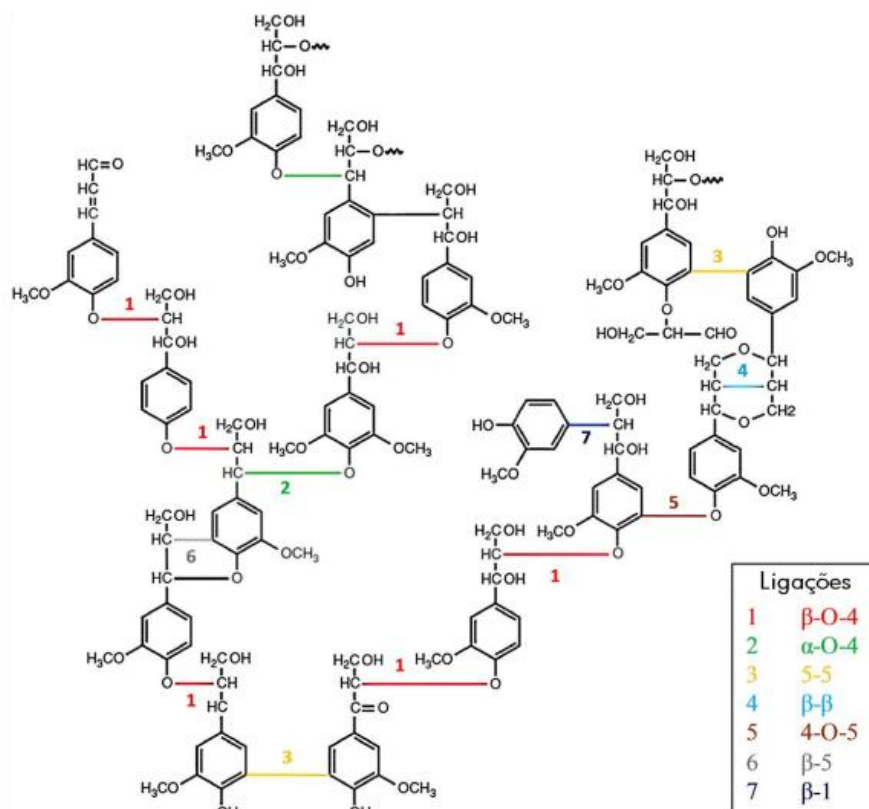


Fonte: Calvo-Flores et al. (2015).

Os monômeros são acoplados randomicamente e dão origem a um polímero tridimensional estável, heterogêneo e resistente à degradação químicas. Na Figura 4, o carbono benzílico da cadeia alifática é denominado α , sendo os demais chamados de β e γ . As posições indicadas por (*) são as mais suscetíveis a participar de reações químicas, indicando uma vasta gama de possibilidades estruturais e, consequentemente, incertezas na descrição precisa da estrutura da lignina (DEUSS; BARTA, 2016; BRASIL, 2017).

Para formar a matriz complexa de lignina, os monômeros se agrupam por diferentes ligações do tipo C-C e C-O, tais como β -O-4, α -O-4, 5-5, β - β , 4-O-5, β -5, β -1, entre outras, como apresentado na Figura 5 (BRASIL, 2017).

Figura 5. Principais tipos de ligações na estrutura da lignina.



Fonte: Laurichesse e Avérous (2014).

A biodegradação da lignina tem sido muito estudada nas últimas décadas, tendo sido estabelecido o papel de várias fenoloxidasas como enzimas importantes no processo. As enzimas ligninolíticas mais efetivas no ataque à lignina são as lacases (EC 1.10.3.2), lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (EC 1.11.1.13). Pertencentes ao grupo de enzimas cobre-oxidases, as lacases catalisam a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, sendo o um dos pontos de atuação a ligação β -1 dos compostos fenólicos. As ligninas peroxidases e manganês peroxidases fazem parte da Classe II (peroxidases fúngicas) das família das peroxidases. Atuam na abstração de elétrons de estruturas fenólicas, podendo a lignina peroxidase oxidar, também, estruturas aromáticas não fenólicas (SILVA; GOMES, 2004; CARVALHO et al., 2009).

1.2.1 Complexo celulolítico

Enzimas são macromoléculas, predominantemente proteínas, que possuem propriedades catalíticas, imprescindíveis a qualquer ser vivo, pois é uma das duas condições fundamentais para haver vida: a primeira é que o organismo deve ser capaz de se autorreplicar e a segunda é que ele deve ser capaz de catalisar reações químicas com eficiência e seletividade. Atuando em sequências organizadas, as enzimas catalisam cada uma das reações das centenas etapas que degradam as moléculas dos nutrientes, que conservam e transformam energia química e que constroem as macromoléculas biológicas a partir de precursores elementares (NELSON; COX, 2014; SAID; PIETRO, 2004).

Dentre as milhares de enzimas já descobertas e catalogadas, existe uma gama muito grande de enzimas capazes de degradar biomassa lignocelulósica, como as do complexo celulolítico e hemicelulolítico.

O complexo celulolítico constitui-se de um conjunto de enzimas celulásicas pertencentes a classes das hidrolases glicosídicas. São consideradas glicoproteínas de massa molecular entre 34 a 250 kDa, capazes de romper as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 entre as unidades de glicose, atuando em sinergia para a liberação deste açúcar (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010; DILLON, 2004).

As enzimas celulásicas podem ser divididas em três grandes grupos, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, sendo eles (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010):

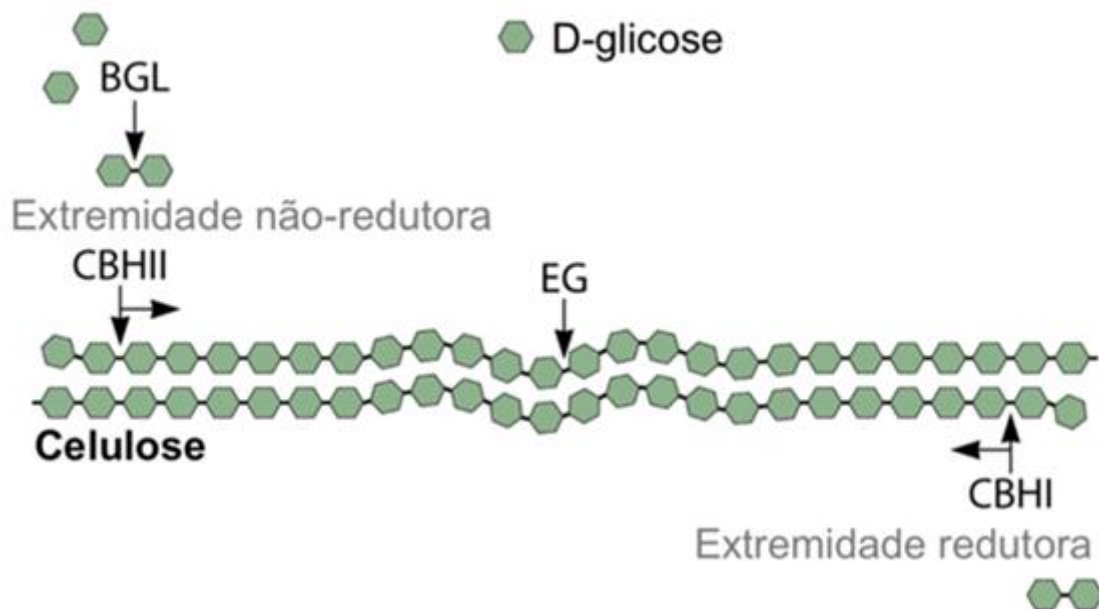
- Endo- β (1-4) glucanase ou CMCase (EC 3.2.1.4) (EG): responsável por iniciar o processo de hidrólise. Hidrolisando randomicamente as ligações β (1-4) no interior da estrutura amorfa da fibra da celulose liberando oligossacarídeos com terminais redutores (quando a glicose apresenta hidroxila heterosídica livre) e não redutores (ausência da hidroxila heterosídica livre na molécula de glicose);
- Exo- β (1-4) glucanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) (ExG): hidrolisa ligações glicosídicas da celulose a partir da extremidade redutora e não redutora. As enzimas deste grupo ainda pode ser divididas em duas classes: Celobiohidrolase I (CBH I), que cliva ligações dos terminais redutores e

Celobiohidrolase II (CBH II) que cliva ligações dos terminais não redutores. A ação destas enzimas libera celobiose.

- Celobiase ou $\beta(1-4)$ glicosidase (EC 3.2.1.21) (BGL): hidrolisa as ligações do tipo $\beta(1-4)$ (celobiose, trealose, gentiobiose) e libera glicose;

Na Figura 6 é possível observar o modo de ação das celulasas sobre a estrutura da celulose.

Figura 6. Ação das enzimas celulolíticas na degradação da celulose.



BGL: β -glicosidase; EG: endoglucanase; CBHI: celobiohidrolase I; CBHII: celobiohidrolase II
 Fonte: Rytioja et al. (2014), adaptado pela Autora (2018).

A sinergia destas enzimas apresentam melhor rendimento do que a soma dos rendimentos individuais e são conhecidas pelos menos três formas de sinergia entre elas, de acordo com Castro e Pereira Jr (2010):

- EG-ExG: a endoglucanase, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para a ação de CBH I e CBH II, respectivamente;
- ExG-ExG: as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados pela ação da endoglucanase;

- ExG-BG e EnG-BG: como seus produtos de hidrólise, as celobiohidrolases e a endoglucanase liberam celobioses e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β -glicosidase.

1.2.2 Complexo hemicelulolítico

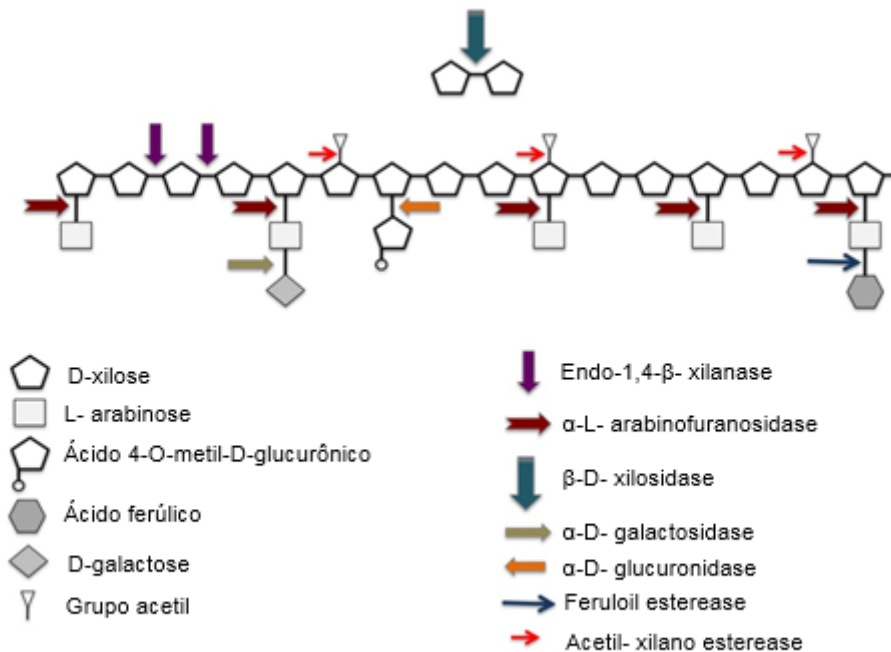
As propriedades químicas e estruturais da hemicelulose pode ser influenciada pela presença de diversos resíduos, e para que ocorra sua hidrólise completa é necessária a ação de diversas enzimas que possam clivar as cadeias principais e as cadeias laterais existentes. Essas enzimas compõem o complexo hemicelulolítico (MENEZES; BARRETO, 2015).

Entre as enzimas responsáveis pela clivagem da cadeia principal, pode-se citar as β -D-xilanase (1,4- β -D-xilana xilanhidrolase, EC 3.2.1.8), β -D-xilosidase (1,4- β -D-xilana xilohidrolase, EC 3.2.1.37), β -D-manase (1,4- β -D-manana mananhidrolase, EC 3.2.1.78), β -D-manosidase (1,4- β -D-manopiranosídeo hidrolase, EC 3.2.1.25), α -L-arabinase (1,5- α -L-arabinase EC 3.2.1.99) e β -D-galactanase (1,4- β -D-galactana galactanhidrolase EC 3.2.1) (FERREIRA FILHO, 2004).

Para a quebra das ligações das cadeias laterais, as enzimas acetil xilana esterase (EC 3.1.1.6), α -D-galactosidase (α -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.22), α -L-arabinofuranosidase (α -L-arabinofuranosídeo arabinohidrolase, EC 3.2.1.55) e α -D-glucoronidase (EC 3.2.1.131) devem atuar (FERREIRA FILHO, 2004).

Na Figura 7 é possível observar o modo de ação das hemicelulases sobre a cadeia de xilana da hemicelulose.

Figura 7. Ação das enzimas hemicelulolíticas na degradação da xilana.



Fonte: Souza (2013), adaptado pela Autora (2018).

As enzimas endo-1,4-β-xilanase, também chamada de xilanases, são responsáveis pela quebra das ligações glicosídicas β-1,4 internas da cadeia principal heteroxilana, diminuindo o grau de polimerização do substrato e liberando xilooligossacarídeos. Pertencentes a uma classe de enzimas denominadas glicosil hidrolase (GH), as xilanases são classificadas em diversas famílias de acordo com características principais, como massa molecular, ponto isoelétrico, similaridade das sequências de aminoácidos, propriedades cinéticas, especificidade pelo substrato e perfil de produtos formados. São encontradas, principalmente, entre as famílias GH 10 e GH 11, sendo que, na família 10 as endo-1,4-β-xilanase classificadas possuem massas moleculares acima de 30 kDa, pontos isoelétricos ácidos, topologia em barril e em alguns casos são altamente glicosiladas. Na família 11, as endo-1,4-β-xilanase classificadas possuem massas moleculares menores de 30 kDa, pontos isoelétricos alcalinos, não são glicosiladas, possuem dois glutamatos que agem como sítios catalíticos e possuem alta especificidade em relação à xilana (LIAO et al., 2015; WALIA et al., 2017; PAES; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; KULKARNI et al., 1999).

Muitos microrganismo são reportados na literatura como produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, sendo eles bactérias, fungos, leveduras e protozoários, destacando-se os fungos filamentosos, que produzem elevados títulos enzimáticos quando comparados aos demais microrganismos citados (KUMAR et al., 2016; WALIA et al., 2017; POLIZELI et al., 2005).

1.2.2.1 Aplicações biotecnológicas das xilanases

As xilanases são comercializadas e produzidas em diferentes países, como Japão, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Dinamarca, Canadá e EUA. Junto com as celulasas e as pectinases, representam 20% do mercado mundial de enzimas. Os principais microrganismos produtores dessas enzimas são *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp., *Humicola insolens* e algumas espécies de bactérias (POLIZELI et al., 2005).

A utilização da xilanase na indústria teve início na década de 1980, onde era inserida na preparação da ração animal com a finalidade de quebrar arabinoxilanos nos ingredientes para diminuir a viscosidade da matéria prima (POLIZELI et al., 2005).

Além da utilização em alimentação animal, as xilanases têm tido papel importante na hidrólise da biomassa lignocelulósica, produção de etanol de segunda geração, biobranqueamento da polpa de celulose e na indústria de alimentos e bebidas.

No que diz respeito a hidrólise da biomassa, a adição de xilanases tem por finalidade hidrolisar xilooligossacarídeos e xilose formados a partir da hidrólise parcial das xilanas, provindas das etapas de pré-tratamento da biomassa, aumentando a disponibilidade dos açúcares fermentáveis. Estas enzimas também estão sendo empregadas para obtenção de açúcares fermentáveis, como a xilose, a partir da batata-doce, os quais podem ser utilizados em processos fermentativos fazendo uso de microrganismos como fungos filamentosos (*Rhizopus oryzae* e *Rhizomucor pusillus*) e leveduras (*Pichia stipidis*) para produção de etanol de segunda geração (ZHANG et al., 2010; FALKOSKI et al., 2011).

Já no processo biobranqueamento da polpa de papel e celulose, estas enzimas promovem a hidrólise da xilana, precipitando-a sobre a celulose e liberando a lignina. A lignina é responsável pela cor escura da polpa celulósica não branqueada, devido a presença de grupos cromóforos em sua estrutura. Quando a lignina é

exposta/liberada da polpa da celulose, o uso de agentes de branqueamento pode ser diminuído no processo de polpação (WALIA et al., 2017).

1.3 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são microrganismos heterotróficos que crescem rapidamente e formam filamentos celulares microscópicos, denominados hifas, cujo conjunto constitui o micélio, que são responsáveis por todas as funções vegetativas do organismo (CUNHA, 2011).

Por possuírem uma diversidade metabólica alta, os fungos filamentosos estão presentes em vários ecossistemas, apresentam crescimento rápido e os meios de cultura onde são cultivados são relativamente simples, fáceis de manusear e as condições de cultivos são facilmente controladas. Fisiologicamente, requerem para o seu crescimento a presença de nutrientes essenciais, sejam eles macronutrientes (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, potássio e magnésio) ou micronutrientes (ferro, zinco, cobre, manganês, molibdênio, cálcio, estrôncio, escândio, vanádio, cobalto e gálio). A presença destes elementos é importante para a manutenção da viabilidade celular (AINSWORTH e SUSSMAN, 1965; MOORE-LANDECKER, 1982; COCHRANE, 1958; TREVISAN, 2004).

Entre os fungos com habilidade de degradar compostos lignocelulósicos, as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* merecem atenção, já que algumas linhagens podem sintetizar níveis significativos de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico, superiores a outros fungos (AGUIAR e LUCENA, 2011). As enzimas de origem microbiana ocupam lugar de destaque no mercado biotecnológico, por sua obtenção ser mais simples e não dependerem das intempéries climáticas, sendo produzidas em fermentadores com condições de cultivos controladas (temperatura, pH, umidade, aeração) (SAID e PIETRO, 2004).

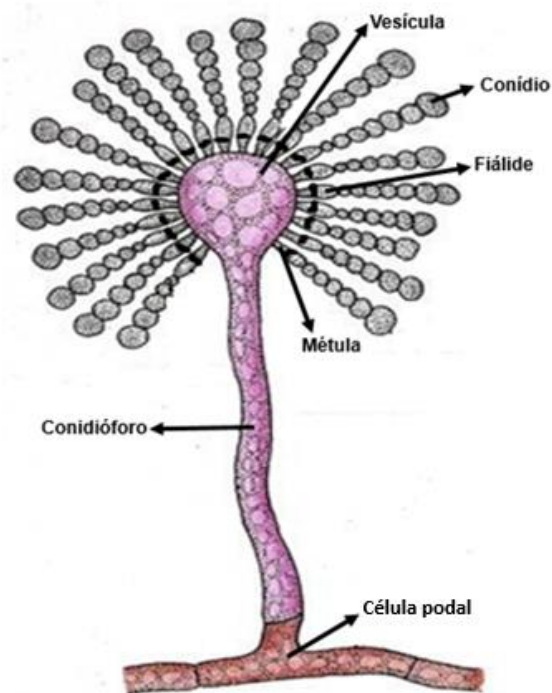
1.3.1 *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus*, primeiramente descrito por Micheli em 1729, consiste de fungos filamentosos, anamorfos (reprodução assexuada) e de dispersão cosmopolita, podendo ser encontrados principalmente em material vegetal em decomposição. Em relação à morfologia, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração, sendo a principal característica macroscópica utilizada para classificação, em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco (BENNETT, 2010; SCHUSTER et al, 2002).

As espécies pertencentes a este gênero podem ser divididas em seções: *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentii*. As espécies mais comumente estudadas pertencem às seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri* (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

As espécies produzem conidióforo, asseptado e com a base normalmente em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de célula podal, conectada a uma hifa vegetativa. O conidióforo estende-se a partir da célula podal até chegar à vesícula, na qual as células conidiogênicas, métulas e fiálides, são formadas. As vesículas podem ter várias formas características. Espécies que possuem o conídio diretamente ligado às fiálides, são denominados de unisseriadas. Outras espécies apresentam estruturas especializadas que ficam entre a vesícula e as fiálides, chamadas de métulas, e são denominadas como bisseriadas, como pode ser observado na Figura 8 (KLICH, 2002; KOZAKIEWICZ, 1989; RAPER; FENNELL, 1965). O tamanho, o arranjo e as cor dos conidiósporos são ainda características para a identificação e divisão interna do gênero em subgrupos, como o caso dos *Aspergillus* com esporos negros que são classificados na seção *Nigri* (BENNETT, 2010; SCHUSTER et al, 2002). No entanto, as espécies podem variar significativamente nas características morfológicas e fisiológicas. Portanto, para uma identificação inequívoca de um isolado, às vezes, é necessário utilizar técnicas moleculares e bioquímicas (PARENICOVÁ et al., 2001; SAMSON; FRISVAD, 2004).

Figura 8. Estrutura do conidióforo de *Aspergillus* sp.



Fonte: Vashishta e Sinha (2010), adaptado pela Autora (2018).

Este gênero tornou-se um dos grupos de fungos mais conhecidos e estudados devido a sua prevalência no ambiente natural, sua facilidade de cultivo em laboratório, versatilidade e alta secreção de metabólitos primários, como ácidos orgânicos, vitaminas e enzimas, além de metabólitos secundários como antibióticos e alcalóides. Atualmente, fungos deste gênero também são muito utilizados como organismos hospedeiros para expressão de proteínas heterólogas recombinantes (Archer, 2000; Nitsche et al., 2012). Algumas espécies podem ser patógenas oportunistas de humanos, como o *Aspergillus fumigatus* e o *Aspergillus chevalieri* (Vries; Visser, 2001; Gruben; Vries, 2009). Outras são conhecidas por produzir micotoxinas, como *Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus wentii*. Dentre as micotoxinas produzidas, estão a aflotoxina, ocratoxina, ácido kojico, ácido asperlegico e ácido ciclopiazônico (HOELTZ, 2005).

Muitas espécies de *Aspergillus* têm sido estudadas para a produção de produtos de interesse biotecnológico, como *Aspergillus niger* e *Aspergillus tubingensis* que possuem características que os tornam ideais para a aplicação na indústria biotecnológica, com capacidade de fermentação e elevada produção enzimática.

Dentre as enzimas sintetizadas, estão as do complexo celulolítico e hemicelulolítico (YOKOYAMA, 2001; SCHUSTER et al., 2002; LUBERTOZZI; KEASLING, 2009; SÁNCHEZ, 2009).

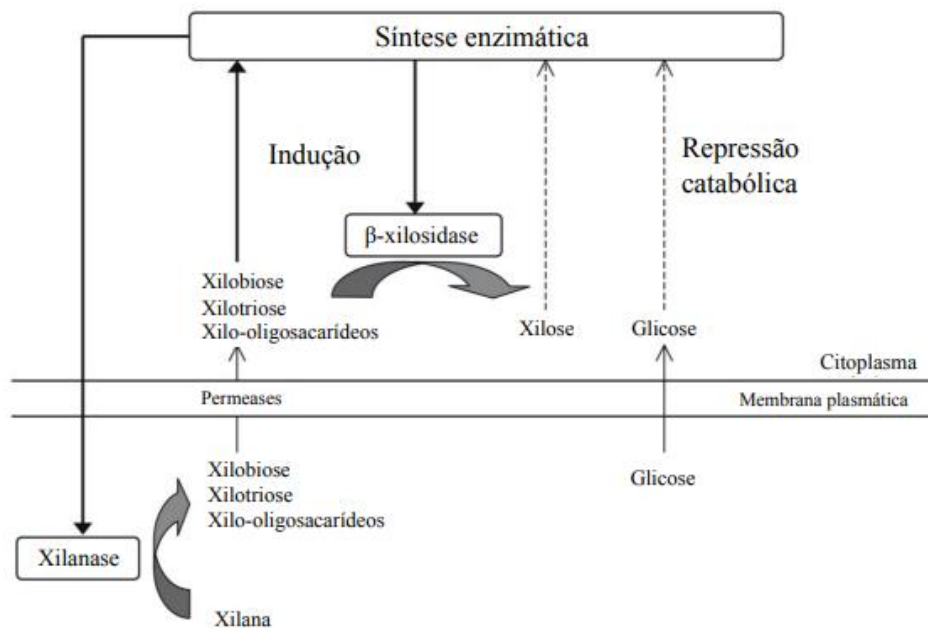
1.3.2 Regulação de enzimas xilanolíticas por *Aspergillus*

Os fungos filamentosos podem ser eficientes na degradação da xilana devido a sua capacidade de produzir múltiplas xilanases de diversas famílias, que diferem umas das outras em suas propriedades físico-químicas, estruturas, modos de ação, especificidades ao substrato e abundância (LIAO et al., 2015).

A regulação e indução da expressão de xilanases deve-se à presença dos polímeros do substrato, mono e oligossacarídeos. A indução da via catabólica de pentoses nas espécies de *Aspergillus* ocorre na presença de D-xilose ou L-arabinose, sendo que a presença de D-xilose no meio ativa a transcrição de enzimas xilanolíticas pelo fator de transcrição XlnR, que regula a expressão de genes xlnB, xlnC e xlnD em *Aspergillus* sp. que codificam as enzimas responsáveis pela degradação da xilana (endoxilanase B, endoxilanase C e β -xilosidase) (STRICKER; MARCH; GRAFF, 2008; VAN PEIJ et al., 1998).

Um mecanismo explicativo, proposto por Biely (1985), relata que pequenas quantidades de xilanases constitutivas são secretadas para o meio extracelular, as quais hidrolisam a xilana liberando xilose, xilobiase e xilooligossacarídeos, que são transportados para dentro da célula com o auxílio de transferases presentes na membrana plasmática. Posteriormente estes açúcares são degradados por β -xilosidases ou mesmo por xilanases intracelulares. Com o acúmulo desses produtos, um efeito contrário passa a ocorrer, reprimindo a produção das xilanases. Um esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico pode ser observado na Figura 9.

Figura 9. Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico.



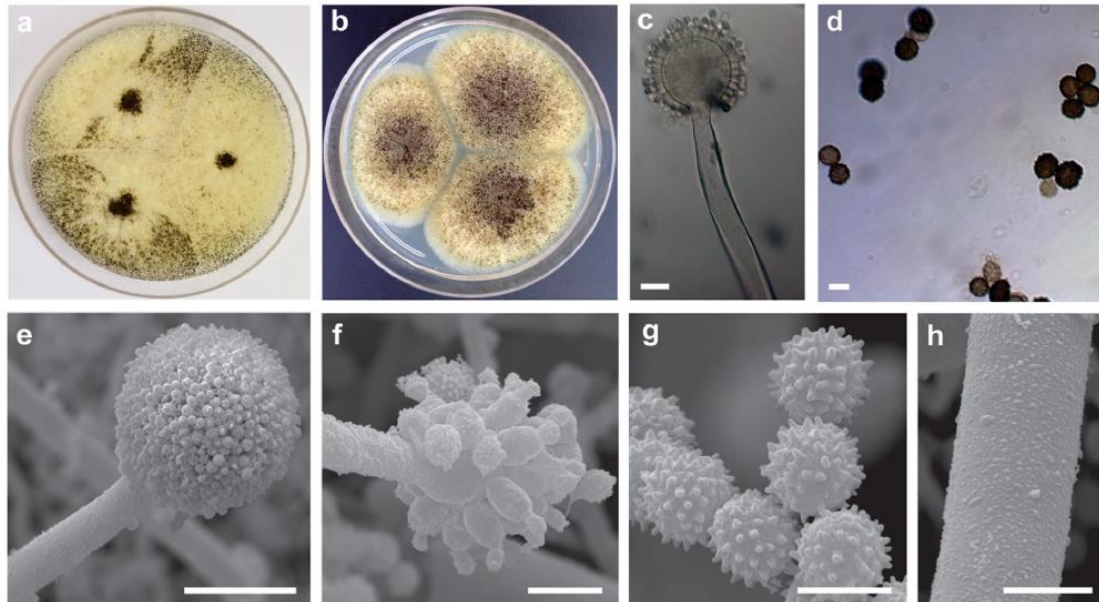
Fonte: Amorim (2017).

A busca por novas linhagens de *Aspergillus* capazes de produzir níveis elevados de enzimas xilanolíticas é de grande interesse biotecnológico devido a vasta diversidade para aplicação industrial.

1.3.1.1 *Aspergillus labruscus*

A espécie recentemente isolada da superfície da uva Baga (*Vitis labruscas* L.), muito utilizada para produção de suco de uva concentrado, na região sul do Brasil pertence ao gênero *Aspergillus* e subgênero *Circumdati* seção *Nigri*, sendo descrita como *Aspergillus labruscus* (Figura 10) (FUNGARO et al., 2017).

Figura 10. *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 (a) colônias em meio Czapeck, (b) colônias em meio malt extract ágar, (c) conidióporos em microscopia de luz (c), conídios em microscopia de luz (d), conidióforo (e, f), conídios (g) e hifa (h) em microscopia de varredura.



Fonte: Fungaro et al. (2017).

Existe uma grande dificuldade de identificação de *Aspergillus* seção *Nigri* devido as sutis diferenças morfológicas entre as espécies. Devido a esta dificuldade, os autores Fungaro et al. (2017) fizeram o sequenciamento genético para a identificação exata da nova linhagem isolada. Na análise do sequenciamento genético, frente aos bancos de dados utilizados pelos autores, *Aspergillus labruscus* apresentou faixa de 85-88% de similaridade com as linhagens *Aspergillus homomorphus* CBS 101889, *Aspergillus aculeatus* CBS 172.66 e *Aspergillus japonicus* CBS 114.51.

Com relação à análise de metabólitos, as linhagem de *Aspergillus labruscus* produzem ácido secalônico D e neoxalina, e não produzem ocratoxina A e fumonisinas, que são micotoxinas cancerígenas. Em comparação com as linhagens filogeneticamente relacionadas, *Aspergillus saccharolyticus* diferem de *Aspergillus labruscus* por produzir aculene A e B e homomorfosinas e a linhagem *Aspergillus homomorphus* produz ácido secalônio D, assim como *A. labruscus*, mas difere produzindo homomorfosinas e 3-methoxy-5-hydroxy-9-phenyl-2,4,6,8-nanotetranoic acid lactone (FUNGARO, et al., 2017).

As análises macromorfológicas indicaram que os diâmetros de colônias de *Aspergillus labruscus*, quando cultivado em meio Czapeck à 25 °C por 7 dias, variam de 70-77 mm, sendo o micélio amarelo e com baixa esporulação. Nas análises micromorfológica, a estrutura do conidióforo é unisseriada, com cabeças conidiais esféricas, vesículas 43 x 60 µm, fiálide 7,2-7,8 x 3,8 µm, conídios esféricos 6,5-8 x 6,1-6,9 µm e de coloração preta, aparentemente rugoso. Morfologicamente, *Aspergillus labruscus* é semelhante ao *Aspergillus sclerotioniger*, que também possui micélio amarelo, baixa esporulação nas mesmas condições de cultivo e conídios áspersos. A principal diferença entre as duas linhagens é que *Aspergillus sclerotioniger* é bisseriada e produz ocratoxina A (FUNGARO, et al., 2017).

Com relação à produção de enzimas por *Aspergillus labruscus*, Fungaro et al. (2017) analisaram produção de tanases e caseinases obtendo resultados satisfatórios para ambas enzimas. Entretanto, até o momento, não foi realizado nenhum estudo aprofundado sobre produção de enzimas de interesse biotecnológico por *Aspergillus labruscus*.

Considerando a importância dos estudos de novos fungos para degradação de biomassa lignocelulósica para processos biotecnológicos, a produção de enzimas pode ser conduzida de diferentes formas, como a Fermentação Submersa (FSbm), a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação por Biofilmes (BF) (GASPAROTTO, 2014; GAMARRA et al., 2010).

1.4 Fermentação em Estado Sólido (FES) X Fermentação Submersa (FSbm)

A fermentação em estado sólido (FES) tem recebido grande atenção nos últimos anos, pois o sucesso no desenvolvimento de bioprocessos em FES está ligado a vários aspectos gerais, incluindo a adequação de diferentes tipos de microrganismos, substratos e parâmetros de processo. Existem vários tipos de microrganismos utilizados no processo FES, incluindo fungos, leveduras e bactérias. Entretanto, fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, e leveduras do gênero *Candida*, *Saccharomyces* e *Aureobasidium* são os mais comumente relatados pelo motivo de que a FES pode fornecer um habitat natural

similar, que tem baixa atividade da água nos meios de fermentação (YAZID et al., 2017).

Neste estado, o crescimento do microrganismo ocorre sobre e entre partículas porosas onde a água livre apresenta-se escassa, mas com umidade suficiente, existente na forma adsorvida na matriz sólida. As enzimas produzidas por esses microrganismos, geralmente, são mais estáveis a temperatura e ao pH, e são menos susceptíveis a problemas de inibição pelo substrato se comparada a fermentação submersa (FSbm) (HOLKER; LENZ, 2004; PANDEY; RADHAKRISHNAN, 1992; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A seleção de substratos adequados para este tipo de fermentação também desempenha um papel fundamental para uma produção eficiente e econômica do produto final desejado. Ao selecionar substratos é importante garantir a disponibilidade e custo dos substratos, que possam fornecer nutrientes adequados e suporte físico para o desenvolvimento dos microrganismos. Resíduos orgânicos de processamento agrícola, industrial, e os resíduos alimentares domésticos são os substratos mais adequados para serem usados devido à sua abundância com baixo ou nenhum custo e sua composição química. Além disso, usando esses resíduos orgânicos como substratos, os problemas de poluição ambiental podem ser minimizados. No entanto, em alguns casos, a adição de suplementos devem ser empregados aos resíduos, com a finalidade de facilitar o desenvolvimento do microrganismo. Em outros casos, pré-tratamento químico ou mecânico, especialmente para materiais lignocelulósicos, é necessário devido à inacessibilidade de certos nutrientes pelos microrganismos (YAZID et al., 2017).

Outros aspectos importantes para melhorar a eficiência do FES são a seleção e otimização de variáveis de processo, incluindo a umidade inicial, tamanho de partícula, pH, temperatura, composição de mídia, esterilização, atividade da água, densidade do inóculo, agitação, aeração e extração do produto (PANDEY, 2003; YAZID et al., 2017). Com relação ao tamanho das partículas, em especial, é evidente que partículas pequenas de substrato podem fornecer uma grande área superficial de suporte à fixação do microrganismo, entretanto, partículas extremamente pequenas pode resultar na aglomeração do substrato e interferir na oxigenação do meio de cultivo, prejudicando o desenvolvimento do microrganismo. No entanto, o contrário também pode ocorrer com partículas maiores que, embora ofereça maior aeração,

estas podem limitar a área de superfície para a fixação microbiana (PANDEY, 2003; YAZID et al., 2017; CHEN; HE, 2012; DE CASTRO; SATO, 2015).

O teor de umidade também tem um papel significativo na FES, uma vez que bactérias exigem alta umidade (60%-85%) e fungos necessitam de umidade em torno de 40%-60% (MARTINS et al., 2011; SINGHANIA et al., 2009). Além disso, a alta umidade pode interferir na difusão do oxigênio. Por outro lado, baixa umidade pode limitar a solubilidade dos nutrientes, dificultando o crescimento microbiano (YAZID et al., 2017).

As principais vantagens na utilização da FES são sua simplicidade, o uso de substratos sólidos de baixo custo e, em alguns casos, a maior produtividade quando comparada à FSbm. Além disso, a ausência de uma fase líquida reduz o risco de contaminação bacteriana e águas residuais ao final do processo. Vale ressaltar, também, a redução do uso de reagentes e baixo consumo de energia, uma vez que a agitação não é necessária (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003; HOLKER; HOFER; LENZ, 2004; GABELLE et al., 2012; QUIROZ et al., 2015).

No que diz respeito à aplicação de FES, esta tem sido amplamente relatada para produção de diferentes bioprodutos como enzimas, ácidos orgânicos, biofertilizantes, biopesticidas, biossurfactantes, bioetanol, compostos aromáticos, alimentos para animais, pigmentos, vitaminas e antibióticos, entre outros (YAZID et al., 2017). Muitos trabalhos foram publicados nos últimos anos relatando a produção de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico em FES utilizando resíduos agro industriais, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Fungos filamentosos capazes de produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em FES.

Microrganismo	Substrato	Enzimas	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i> (SMN1)	Palha de trigo	Celulase	Saqib et al. (2010)
<i>Aspergillus niger</i> (2B.361 U2/1)	Bagaço de uva	Celulase e xilanase	Botella et al. (2005)
<i>Aspergillus niger</i> (KK2)	Palha de arroz	Celulases e xilanase	Kang et al. (2004)
<i>Aspergillus terreus</i> (M11)	Palha de milho	Celulases e xilanase	Gao et al. (2008)
<i>Aspergillus tubingensis</i> (JP-1)	Palha de trigo	Celulase e xilanase	Pandya e Gupte (2012)
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar + farelo de trigo	Celulases e xilanase	Qin et al. (2010)
<i>Penicillium chrysogenum</i> (QML-2)	Farelo de trigo+ pó de farinha de milho	Celulases	Zhang e Sang (2012)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> (IMI 216529)	Palha de trigo	Xilanase	Kalogeris et al. (1998)
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Palha de cana-de-açúcar	Celulases	Guerra et al. (2006)
<i>Trichoderma reesei</i> (Rut-C30)	Farelo de trigo	Celulases	Oberoi et al. (2008)
<i>Trichoderma reesei</i> (SAF3 (MTCC4876)	Farelo de trigo	Xilanase	Kar et al. (2013)
<i>Trichoderma viride</i> (GIM 3.0010)	Casca de banana	Celulases	Sun et al. (2011)

Fonte: Autora.

Em contrapartida, a FSbm apresenta caráter homogêneo no qual os micélios dos fungos podem crescer na superfície do meio líquido sem agitação ou crescerem dispersos no meio líquido quando submetidos a agitação (SILVEIRA, 2003). Esta técnica de fermentação possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante a homogeneidade do meio e a facilidade no controle dos parâmetros do processo, principalmente se monitorados por sensores adequados. Entretanto, existe a maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, e o produto resultante apresenta-se de três a quatro vezes mais diluído, necessitando de separação e purificação, causando aumento nos custos (CASTRO; PEREIRA JR., 2010). Muitos estudos também são relatados na literatura quanto à produção de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico por fungos filamentosos quando cultivados em FSbm, sendo alguns exemplos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Exemplos de fungos filamentosos capazes de produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em FSbm.

Microrganismo	Substrato	Enzimas	Referência
<i>Aspergillus flavus</i> (DFR-6)	Farelo de trigo	Xilanase	Pal e Khanum (2011)
<i>Aspergillus nidulans</i> (ATCC62041)	Bagaço de cana-de-açúcar	Celulases	Bagga e Sandhu (1987)
<i>Aspergillus niger</i> (2B.361 U2/1)	Bagaço de uva + casca de laranja	Celulase e xilanase	Díaz et al. (2012)
<i>Aspergillus saccharolyticus</i> (CBS 127449)	Farelo de trigo	Celulase	Rana et al. (2014)
<i>Aspergillus terreus</i>	Casca de palmeira + farelo de milhoa	Celulases	Shahriarinnour et al. (2011)
<i>Fusarium oxysporum</i> (F3)	Palha de trigo	Celulases	Christakopoulos et al. (1995)
<i>Penicillium chrysogenum</i> (Q 176)	Xilana de aveia	Xilanase	Haas et al. (1992)
<i>Trichoderma reesei</i> (Rut-C30)	Farelo de trigo	Celulases	Prévot et al. (2013)
<i>Trichoderma viride</i> (NCIM 1051)	Bagaço de cana-de-açúcar	Celulases e xilanase	Adsul et al. (2004)

Fonte: Autora.

5 CONCLUSÕES

O fungo *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 apresenta potencial para produção de xilanases extracelulares, sendo influenciada pela composição do meio de cultivo, destacando-se o uso do farelo de trigo como substrato/fonte de carbono de baixo custo. Adicionalmente, a temperatura e pH ótimos de reação estão em consonância com o reportado na literatura para outras espécies de *Aspergillus*. A xilanase não sofreu ativação na presença de íons e solventes orgânicos, e teve sua atividade reduzida na presença de agentes surfactantes. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo de bioprospecção de enzimas do complexo celulolítico e xilanases para o fungo *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223, o que contribui significativamente para o avanço do conhecimento a respeito do potencial enzimático desta nova espécie fúngica para futuras aplicações biotecnológicas das enzimas xilanolíticas.

REFERÊNCIAS

ADSUL, M.; GHULE, J.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K.; GOKHALE, D.; VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production., **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 67–72, 2004.

AFONSO, L. C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.

AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; RIAZ, M. Partial purification and characterization of xylanase produced from *Aspergillus niger* using wheat bran. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 50, n. 3, p. 433-437, 2013.

AINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A.S. **The Fungi: An Advanced Treatise**. New York: Academic Press, 1965, vol. 1.

ALEXANDRINO A.; FARIA H.; SOUZA C.; PERALTA R. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.

ALVES, T. B. **Prospecção de proteínas bioativas secretadas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus***. 2017. 174 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2017.

AMORIM, C. C. **Liquefação de farelo de trigo para produção de xilanases por cultivo submerso de *Aspergillus niger***. 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

AMORIM, G. M.; OLIVEIRA, A. C.; GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; FREIRE, D. M. G. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 34-41, 2017.

ANDRIETTA, S. R. Optional Industrial Fermentation. In: BIOEN – Workshop on Process for Ethanol Production – **FAPESP**. 2009. Disponível em <http://www.fapesp.br/eventos/2009/09/10_bioen/Silvio_Roberto.pdf> Acesso em: 10 fev. 2016.

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil pal trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1293-1302, 2013.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.

ARCHER, D. B. Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 478–483, 2000.

BAGGA, P. S.; SANDHU, D .K. Cellulase formation by *Aspergillus nidulans*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, p. 635–642, 1987.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; MEJÍA, A. Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. **Biotechnology Annual Review**, v. 2, p. 85-121, 1996.

BATAILLON, A. M.; NUNES CARDINALI, N. P.; CASTILLON, F. N.; DUCHIRON, F. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. Strain SPS-0. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 187-192, 2000.

BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, n. 2-3, p. 171-188, 1992.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M. & GOMI, K. (editors). **Aspergillus Molecular Biology and Genomics**. Linton: Caister Academic Press, 2010. p. 1-16.

BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 32, p. 819-824, 2009.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academia of Science**, v. 72, p. 51-56, 1992.

BOTELLA, C.; DE ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 100–106, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. **Biodiversidade Brasileira**. 2010. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

BRASIL, H. F. F. Conversão de compostos modelo de lignina por óxidos mistos derivados de hidrotalcitas (Mg, Ni, Cu-Al-CO₃). 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

CALVO-FLORES, F. G.; DOBADO, J. A.; ISAC-GARCIA, J.; MARTIN-MARTINEZ, F. J. **Lignin and ligans as renewable raw materials: Chemistry, technology and applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2015.

CAMPBELL, M. M.; SEDEROFF, R. R. Variation in lignina content and composition. **Plant Physiology**, v. 110, p. 3-13, 1996.

CAMPOS, A. G.; SILVA, M. M.; SILVA, M. A. Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol. Piracicaba: **Fatec**, p. 47, 2011.

CARMONA, E. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; MONTEIRO, R. T. R.; JORGE, J. A. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **Journal of Basic Microbiology**, n. 37, v. 6, p. 387-394, 1997.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CHEN, F. L.; WEI, Y. W.; ZHANG, B. Chemical cross-linking and molecular aggregation of soybean protein during extrusion cooking at low and high moisture content. **Food Science and Technology**, v.44, n.4, p.957-962, 2011.

CHEN, H. Z.; HE, Q. Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p.1619–1625, 2012.

CHENG, K.; CAI, B.; ZHANG, J.; LING, H.; ZHOU, Y.; GE, J.; XU, J. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105-109, 2008

CHHOKAR, V.; SANGWAN, M.; BENIWAL, V.; NEHRA, K. S. Effect of additives on the activity of tanase from *Aspergillus awamori* MTCC 9299. **Applied Biochemical Engineering Journal**, v. 160, n. 8, p. 2256-2264, 2010.

CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F. N.; MACRIS, B. J. Controlling simultaneous production of endoglucanase and beta-glucosidase by *Fusarium oxysporum* in submerged Culture. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 883–888, 1995.
COCHRANE, V.W. **Physiology of Fungi**. New York: John Wiley & Sons Inc, 1958.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 29, p. 3-23, 2005.

COSTON, M.B.; LOOMIS, JR, W.F. Isozymes of β -glucosidase in *Dictyostelium discoideum*. **Journal of Bacteriology**, v. 100, n. 3, p.1208-1217, 1969.

CUNHA, F. M. **Desenvolvimento de processo não-convencional para produção de celulase por *Aspergillus niger* em biorreator pneumático na presença de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: D'ALMEIDA M. L. O. **Celulose e Papel**: tecnologia de fabricação da pasta celulósica. 2. Ed., São Paulo: IPT, 1988. v. 1, p. 45-106

DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA Jr, N. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 333-338, 2002

DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. **Bioresources**, v. 3, n. 2, p. 452-460, 2008.

DÍAZ, A. B.; DE ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 72–78, 2012.

De ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; BISCHOFF, K. M.; FALKOSKI, D. L.; PEREIRA, O. L.; GONÇALVES, D. S.; DE RESENDE, S. T. Cellulases and hemicellulases from endophytic *Acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 594–610, 2011.

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

DEUSS, P. J.; BARTA, K. From models to lignin: Transition metal catalysis for selective bond cleavage reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 306, p. 510-532, 2016.

DILLON, A. J. P. Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R, (Org). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 243-269.

DO, T. T.; QUYEN, D. T.; NGUYEN, T. N.; NGUYEN, V. T. Molecular characterization of a glycosyl hydrolase family 10 xylanase from *Aspergillus niger*. **Protein Expression and Purification**, v. 92, p. 196-202, 2013.

EL-SHISHTAWY, R. M.; MOHAMED, S. A.; ASIRI, A. M.; GOMA, A. M.; IBRAHIM, H. I.; AL-TALHI, H. A. Saccharification and hydrolytic enzyme production of alkali pre-treated wheat bran by *Trichoderma virens* under solid state fermentation. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 37, 2015.

EVERS, T.; MILLAR, S. Cereal grain structure and development: some implications for quality. **Journal of Cereal Science**, v. 36, p. 261-284, 2002.

FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; BARALDO Jr, A.; TARDIOLI, P. W.; BERTUCCI NETO, V. COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect on pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, 2010.

FALKOSKI, D. L., **Enzimas lignocelulolíticas de fungos de podridão branca e fitopatógenos: produção, caracterização e aplicação em processos de sacarificação da biomassa**. 116 f. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

FERREIRA FILHO, E. X. Xilanases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R, (Org). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 137-148.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; RAMÓN, D.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 91, p. 91-96, 1992.

FRANÇOSO, I. L. T. **Efeito da enzima α -amilase na etapa de clarificação do caldo de cana-de-açúcar**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

FUNGARO M.; FERRANTI L.; MASSI F.; DA SILVA J.; SARTORI D.; TANIWAKI M.; FRISVAD J.; IAMANAKA B. *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section Nigri discovered in Brazil. **Scientific Reports**, vol. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

GABELLE, J. C.; JOURDIER, E.; LICHT, R. B.; BEN CHAABANE, F.; HENAUT, I.; MORCHAIN, J.; AUGIER, F. Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 75, p. 408–417, 2012.

GAMARRA, N. N.; VILLENA, G. K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 545-551, 2010.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623–7629, 2008.

GASPAROTTO, J. M. **Produção de enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais lignocelulósicos**. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais, Universidades Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GONÇALVES, H. B. **β -D-frutofuranosidases de *Fusarium graminearum*: produção, purificação, imobilização e determinação das propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e secas em *Spray dryer***. 2013, 122 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

GRUBEN B. S.; DE VRIES R. P. Advances in pectinolytic enzymes, genes and regulation in *Aspergillus*. In: Pectins and Pectinases. **Wageningen Academic Publishers**, p. 101-114, 2009.

GUERRA, G.; CASADO, M. R. G.; ARGUELLES, J.; SÁNCHEZ, I. M. A.; MANZANO, A. M.; GUZMAN, T. Cellulase Production with sugarcane straw by *Trichoderma citrinoviride* on solid bed. **Sugar Technology**, v. 8, p. 30–35, 2006.

HAAS, H.; HERFURTH, E.; STÖFFLER, G.; REDL, B. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1117, p. 279–286, 1992.

HE, H.; QIN, Y.; LI, N.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and characterization of a thermostable hypothetical xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p. 3148–3161, 2015.

HIGUCHI, T. Biodegradation of lignin: biochemistry and potential applications. **Experientia**, v. 38, p. 159–166, 1982.

HMIDA-SAYARI, A.; TAKTEK, S.; ELGHARBI, F.; BEJAR, S. Biochemical characterization, cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1839–1847, 2012

HOELTZ, M. **Estudo da influência de manejos pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

HOLKER U, H. M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175–186, 2004.

ISHIDA, N.; OKUBO, A.; KAWAI, H.; YAMAZAKI, S.; TODA, S. Interaction of amino acids with transition metal ions in solution (I) solution structure of L-lysine with Co(II) and Cu(II) ions as studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, 263–270, 1980.

ITO, K.; OGASAWARA, H.; SUGIMOTO, T.; ISHIKAWA, T. Purification and properties of acid stable xylanases from *Apergillus kawachii*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 4, p. 547-550, 1992.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**, v. 1, p. 163-176, 1990.

JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 10, p. 164-174, 2016.

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

KANG, S.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153–156, 2004.

KAR, S.; SONA GAURI, S.; DAS, A.; JANA, A.; MAITY, C.; MANDAL, A.; Das MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 57–68, 2013.

KARGI, F.; DINCER, A. R. Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 529-537, 1996.

KHANNA, P.; SUNDARI, S.S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 242-243, 1995.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmeldiagnostiek, 2002. 116 p.

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. P. M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 31, 2009.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, v. 161, p. 1-188, 1989.

KROGH, K. B. R.; MØRKEBERG, A.; JØRGENSEN, H.; FRISVAD, J. C.; OLSSON, L. Screeninggenus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 113–116, p. 389–401, 2004

KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 207-216, 2007.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews*, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: an overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 149, 2016.

KUMAR, S.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Effect of substrateand fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). **Food Science and Biotechnology**, v. 20, p. 1289–1298, 2011.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p.1266-1290, 2014.

LIAO, H; ZHENG, H.; LI, S.; WEI, Z.; MA, H.; SHEN, Q.; XU, Y. Functional diversity and properties of multiple xylanases and from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

LIU, Z.; FATEHI, P.; SADEGHI, S.; NI, Y. Application of hemicelluloses precipitated via ethanol treatment of pre-hydrolysis liquor in high-yield pulp. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9613-9618, 2011.

LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 53-75, 2009.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, M. B.; NAGEM, R. A. P.; VRIES, R. P.; GUIMARÃES, V. M. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 60-67, 2016.

MARABEZZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365–373, 2011.

MICHELIN, M.; POLIZELI, M. L. T. M.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; TEIXEIRA, J. A. A new strategy for xylanase production using wheat straw to hydrolysis liquor as substrate. **Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR 2008**, p. 4-6, 2008.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of The Fungi**. 2a Edição. New Jersey: PrenticeHall Inc, 1982.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Básica**. Laboratório AutoLab LTDA, 2007.

MUSSATO, S. I.; SANTOS, J. C.; ROBERTO, I. C. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 590-596, 2004.

NARASIMHA, G.; SRIDEVI, A.; RAMANJANEYULO, G.; REDDY, B. R. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Properties**, v, 19, n. 3, p. 652-661, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6º Ed. Artmed, 2014.

NISHIDA, V. S.; OLIVEIRA, R. F.; INÁCIO, F. D.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Produção de β -Glicosidases por *Aspergillus* spp. em cultivos em estado sólido. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 388-391, 2013.

NITSCHKE, B. M.; JORGENSEN, T. R.; AKEROYD, M.; MEYER, V.; RAM, A. F. The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: insights from the transcriptome and secretome. **BioMed Central Genomic**, v. 13, p. 380 – 403, 2012.

OBEROI, H. S.; CHAVAN, Y.; BANSAL, S.; DHILLON, G. S. Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as a major substrate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 528–536, 2008.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial uso em biorrefinarias**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PAES, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanase: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564-592, 2012.

PAL, A.; KHANUM, F. Identification and optimization of critical medium components using statistical experimental designs for enhanced production of xylanase from *Aspergillus flavus* DFR-6. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 228–236, 2011.

PALMA, M.B. **Influência da agitação e da aeração na atividade de xilanases de *Penicillium janthinellum***. 1993. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 18, p. 37–45, 2003.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 14, p. 486-488, 1992.

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

PANDYA, J. J.; GUPTE, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 769–779, 2012.

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; ten HOOER-SUYKERBUYK, M.; VISSER, J. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicas* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 521-527, 2001.

PEREIRA, J. C.; GIESE, E. C.; MORETTI, M. M. S.; GOMES, A. C. S.; PERRONE, O. M.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. F. B. Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. In: SENTURK, M, (Org). **Enzymes inhibitors and Activators**. InTech, 2017, p. 139-164.

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

PRÉVOT, V.; LOPEZ, M.; COPINET, E.; DUCHIRON, F. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis, **Bioresource Technology**, v. 129, p. 690–693, 2013.

QIN, Y.; HE, H.; LI, N.; LING, M.; LIANG, Z. Isolation and characterization of a thermostable cellulase-producing *Fusarium chlamydosporum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1991–1997, 2010.

QUIROZ, R. D. L. C; ROUSSOS, S.; HERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, R.; CASTILLO, F.; AGUILAR, C. N. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: Filamentous fungi as a model. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 326–333, 2015.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE REUSO/RECICLAGEM DE RESÍDUOS SÓLIDOS INDUSTRIAIS, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Secretaria Estadual do Meio Ambiente, p. 125-126, 2000.

RANA, V.; ECKARD, A.D.; TELLER, P.; AHRING, B. K. On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 282–289, 2014.

RAPER, K. B.; FENELL, D. I. The Genus *Aspergillus*. **Science**, v. 150, p. 736-737, 1965.

RAWAT, R.; KUMAR, S.; CHADHA, B. S.; KUMAR, D.; OBEROI, H. S. Na acidothermophilic functionally active novel GH12 family endoglucanase from *Aspergillus niger* HO: purification characterization and molecular interaction studies. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 103-117, 2015.

RIZZATTI, A.; JORGE, J.; TERENCE, H.; RECHIA, C.; POLIZELI, M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose disidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

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

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; DE VRIES, R. P.; MAKELA, M. R. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-266, 2004.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnolgy Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANDRIM, V.C.; RIZZATTI, A. C. S.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; MILAGRES, A. M. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and the potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1823-1828, 2005.

SANTOS, I. R. C. **Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.).** 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641–646, 2010.

SCHRÖDER, S.; ZHANG, H.; YEUNG, E. S.; JÄNSCH, L.; ZABEL, C.; WÄTZIG, H. Quantitative Gel Electrophoresis: Sources of Variation. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p.1226–1234, 2008.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; van DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435. 2002

SEDEROFF, R. R.; MACKAY, J. J.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Unexpected variation in lignin. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, n. 2, p. 145-152. 1999.

SENDELIUS, J. **Steam pretreatment optimization for sugarcane bagasse in bioethanol production**. 2005. Master of Science – Department of Chemical Engineering, Lund University, Sweden, 2005.

SHAHRIARINOUR, M.; WAHAB, M. N. A.; MOHAMAD, R.; MUSTAFA, S.; ARIFF, A. B. Cyanobacterial biomass as n-supplement to oil palm empty fruit bunch(opefb) fibre for improvement of cellulase production by *Aspergillus terreus* in submerged fermentation. **BioResources**, v. 6, p. 1696–1706, 2011.

SHAMALA, T. R.; SREEKANTIAH, K. R. Production of cellulases and d-xylanase by some selected fungal isolates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 178–182, 1986.

SHERIEF, A. A.; EL-TANASH, A. B.; ATIA, N. Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 199-211, 2010.

SILVA, N. L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R, (Org). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 350-379.

SILVEIRA, M. L. L. **Comparação entre o desempenho do inoculo sólido e inoculo líquido para cultivo de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In: **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass – Techniques, applications and commercialization**. InTech, 2013. cap. 9, p. 207- 247.

STRICKER, A. R., MACH, R. L., DE GRAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 78, p. 211–220, 2008.

SUN, H.; LI, J.; ZHAO, P.; PENG, M. Banana peel: a novel substrate for cellulose production under solid-state fermentation. **African Journal Biotechnology**, v. 10, p. 17887–17890, 2011.

TREVISAN, H. C. **Enzimas como agente Biotecnológico**. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R., (Org). Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 115-135, 2004.

VAN PEIJ, N.; GIELKENS, M. M. C.; DE VRIES, R. P.; VISSER, J.; DE GRAAFF, L. H. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3615– 3619, 1998.

VASHISHTA, B. R.; SINHA, A. K. **Botany For Degree Students Fungi**. S. Chand & Company LTD-New Delhi, 2010, p. 768.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; RÓMERO-GOMEZ, S.D.J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 157–167, 2003.

VIRMOND, E. Utilização de resíduos agroindustriais como fonte alternativa de energia. 2011, 264 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

VOGEL, H. J. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **American Naturalist**, v. 98, n. 903, p. 435-446, 1964.

VOLYNETS, B.; EIN-MOZAFFARI, F.; DAHMAN, Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. **Green Process Synth**, v. 6, p. 1-22, 2017.

VRIES, R. P.; VISSER J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 4497-522, 2001.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanase and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 11, 2017.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1959-1966, 2005.

YAMANE, Y.; FUJITA, J.; SHIMIZU, R.; HIYOSHI, A.; FUKUDA, H.; KIZAKI, Y.; WAKABAYASHI, S. Production of cellulose -and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae*, and their contribution to the maceration of rice endosperm cell wall. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 9-14, 2002.

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 67-75, 2017.

YOKOYAMA, K. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, p. 241-246, 2001.

ZHANG, H.; SANG, Q. Statistical optimization of cellulases production by *Penicillium chrysogenum* QML-2 under solid-state fermentation and primary application to chitosan hydrolysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1163–1174, 2012.

ZHANG, L.; ZHAO, H.; GAN M.; JIN, Y. L.; GAO X.; CHEN, Q.; WANG, Z. Y. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4573–4579, 2011.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

ZÚÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por Fermentação em Estado Sólido. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.