



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Sirlene do Nascimento Senna

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE XILANASES E CELULASES UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

São José do Rio Preto
2014

Sirlene do Nascimento Senna

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE XILANASES E CELULASES UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira
Alves Prado

São José do Rio Preto
2014

Sirlene do Nascimento Senna

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE XILANASES E CELULASES UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves Prado
UNESP – Ilha Solteira
Orientador

Prof. Dr^a. Maria de Lourdes Texeira de Moraes Polizeli
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini
UNESP – Ilha Solteira

São José do Rio Preto
18 de Julho de 2014

Dedico aos meus pais,
Auceniro e Izenilda, meu irmão,
Sérgio, ao meu namorado,
Mateus por todo amor,
incentivo e carinho dedicados.

Agradecimento

Á Deus, por permitir concluir mais uma etapa na minha vida acadêmica, me protegendo e me dando forças;

Aos meus pais Izenilda e Auceniro por sempre estarem me apoiando, dando tudo de si, além de amor e carinho, sem a presença, esforço e compreensão deles eu nada seria. Ao meu irmão Sergio pelo apoio e convivência ao longo dos anos;

Ao meu namorado Mateus, pelo amor, companheirismo, compreensão e incentivo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), projeto da Rede SISBIOTA, pelo auxílio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia;

Agradeço ao minha orientadora, o prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado, pela ajuda e confiança na minha capacidade;

A todos os amigos que reencontrei durante o período do mestrado em São José do Rio Preto em especial, Cristina Laura Manoel, Janaina Zanchetta, Rafaela Rodrigues Britto, Juliana Ferreira (pela acolhida em suas casas e suas vidas) e a Crislen Danielle, por todos os momentos que vivemos juntas;

Aos meus grandes amigos (as) Luciana, Mariana, Jaqueline Cristine, Jaqueline Ferreira, Andreia, Maria Fernanda, Keila, Luiz Fernando, Lisandra Lima, Neuterlandio, Vanessa, Cristiane, Cintia e Mirian que sempre participaram e se fizeram presentes em minha vida, cada um de uma forma muito especial.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos UNESP Campus de Ilha Solteira Aline, Wanderleia, Lumena, Erica, Mateus, Rodrigo, Letícia e Veridiana. Em especial, a Cintia, pela colaboração mais efetiva neste trabalho.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) em especial aos técnicos de laboratório José Hernandez e Alexandre Marques da Silva pela ajuda para esse trabalho fosse realizado.

A todos os funcionários da sessão de pós-graduação, do Instituto de Biociências, letras e Ciências Exatas UNESP, Campus de São José do Rio Preto, pela atenção e dedicação no atendimento.

A todos que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Cento e quarenta e oito linhagens fúngicas, mesofílicas e termofílicas, foram isoladas de amostras de solo e de matéria orgânica em decomposição de áreas de Cerrado no estado do Mato Grosso Sul. Essas linhagens tiveram suas capacidades de crescimento a 35 °C e 45 °C analisadas em meios contendo palha de milho como fonte de carbono. Sessenta e seis fungos, com crescimento a 45 °C foram selecionados para testes de produção enzimática. A maioria das linhagens isoladas produziram xilanase e celulasas (avicelase e CMCase) por fermentação em estado sólido (FES), inicialmente utilizando o farelo de trigo como substrato. Posteriormente, foram realizados os estudos do efeito da fonte de carbono e do perfil de produção de enzimas, utilizando diferentes substratos como: farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, serragem, sabugo de milho e com misturas destes na proporção de 1:1. A produção mais elevada de CMCase, 18 U/g, foi obtida pelo fungo *Penicillium* sp 1IP4-A2, em farelo de trigo, após 48 horas de cultivo. As maiores produções de avicelase 13,1 U/g, e xilanase, 370 U/g, foram obtidas pelo fungo *Aspergillus* sp 1IP2B1, quando cultivado em farelo de trigo e sabugo de milho, após 24 horas e 96 horas de cultivo, respectivamente. A xilanase referida acima, produzida pelo fungo *Aspergillus* sp 1IP2B1, apresentou atividade máxima em 55 °C com pH de 5,5 e se manteve estável até 55 °C.

Palavras-chave: Bioma Cerrado; Fermentação em Substrato Sólido; resíduos agroindustriais, Enzima Fúngicas.

ABSTRACT

One hundred forty-eight mesophilic and thermophilic fungal strains were isolated from samples of soil and decomposing organic matter from Cerrado in the state of Mato Grosso do Sul. These strains have had their capacity for growth at 35 °C and 45 °C analyzed in culture medium containing corn straw as the carbon source. Sixty-six fungi, growing at 45 °C, were selected for enzyme production testing. The most of the isolated strains produced xylanase and cellulase (CMCase and avicelase) by solid state fermentation (SSF), initially using wheat bran as substrate. Subsequently, studies of the effect of carbon source and enzyme production profile were performed using different substrates: wheat bran, sugar cane bagasse, sawdust, corn cobs and mixtures in a 1:1 ratio. The highest CMCase production, 18 U/g, was produced by fungi *Penicillium* sp 1IP4-A2 in wheat bran, after 48 hours of cultivation. The highest avicelase production, 13.1 U/g, and xylanase, 370 U/g, were obtained by fungi *Aspergillus* sp 1IP2B1, in wheat bran and corn cob, after 24 hours and 96 hours of culture on solid fermentation, respectively. The xylanase produced by fungi *Aspergillus* sp 1IP2B1 showed maximum activity at 55 °C at pH 5.5 and it was stable up to 55 °C.

Keywords: *Cerrado biome, agro-industrial waste, solid fermentation, fungal enzymes.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Arranjo típico da parede celular vegetal, com a disposição das fibras de celulose, hemicelulose e lignina.	17
Figura 2 – Representação da estrutura de celulose com unidades de glicose e celobiose.	18
Figura 3 – Estrutura representativa das cadeias de celulose.	19
Figura 4 - Estrutura Molecular de celulose e os sítios de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase.	22
Figura 5 - Estrutura da xilana, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.	24
Figura 6 – Vista das áreas e pontos de coleta na Fazenda São José, Inocência, MS.	35
Figura 7 – Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase pelos fungos: <i>Penicillium sp</i> 1IP4-A2 e <i>Aspergillus sp</i> 1IP2B1, 1IP6B1, 1IP7B1, 1IP8A1, 1IP15B2 e 1IP16-A1, sob fermentação em estado sólido à 45 °C em 72 horas de cultivo.	45
Figura 8 – Efeito da fonte de carbono na produção de CMCase pelos fungos: <i>Penicillium sp</i> 1IP4-A2 e <i>Aspergillus sp</i> 1IP2B1, 1IP6B1, 1IP7B1, 1IP8A1, 1IP15B2 e 1IP16-A1, sob fermentação em estado sólido à 45 °C em 72 horas de cultivo.	48
Figura 9- Efeito da fonte de carbono na produção de avicelase pelos fungos: <i>Penicillium sp</i> 1IP4-A2 e <i>Aspergillus sp</i> 1IP2B1, 1IP6B1, 1IP7B1, 1IP8A1, 1IP15B2 e 1IP16-A1, sob fermentação em estado sólido à 45 °C em 72 horas de cultivo.	48
Figura 10 - Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCase (U/g de substrato) do fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP2B1, cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e sabugo de milho como substrato, à 45 °C.	51
Figura 11 - Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCase (U/g de substrato) dos fungos <i>Aspergillus sp</i> 1IP6B1, 1IP7B1 e 1IP16-A1, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e sabugo de milho como substrato, à 45 °C.	52
Figura 12 – Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCase (U/g de substrato) do fungo <i>Penicillium sp</i> 1IP4-A2, cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e serragem como substrato, à 45 °C...	53
Figura 13 - Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCase (U/g de substrato) do fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP8-A1, cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e serragem como substrato, à 45 °C...	54
Figura 14 - Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCase (U/g de substrato) do fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP15B2, cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar como substrato, à 45 °C.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de celulases.....	26
Tabela 2 - Pontos de coleta geofeccionados em área de cerrado do Estado do Mato Grosso do Sul.....	35
Tabela 3 – Isolados fúngicos de áreas de Cerrado do município de Inocência (MS).	40
Tabela 4 – Atividades xilanase, avicelase e CMCCase de linhagens isoladas na primeira coleta em áreas de Cerrado, no município de Inocência-MS. Cultivo sob fermentação em estado sólido, à 45 °C, após 72 horas de fermentação... 41	41
Tabela 5 – Atividades xilanase, avicelase e CMCCase de linhagens isoladas na segunda coleta em áreas de Cerrado, no município de Inocência-MS. Cultivo sob fermentação em estado sólido, à 45 °C, após 72 horas de fermentação... 41	41
Tabela 6 – Comparação de dados da literatura, sobre as produções de xilanase, CMCCase, obtidas por fungos cultivados em farelo de trigo sob fermentação em estado sólido.	43
Tabela 7 - Caracterização das xilanases produzidas pelas linhagens selecionadas.....	56
Tabela 8 - Características de algumas xilanases produzidas por fungo.	57
Tabela 9 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo <i>Penicillium sp</i> 1IP4-A2 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.....	82
Tabela 10 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP2B1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.....	82
Tabela 11 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP8-A1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.....	83
Tabela 12 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP16-A1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.....	83
Tabela 13 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo	84
Tabela 14 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP7B1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos, à 45 °C, em 72 horas de cultivo.....	84
Tabela 15 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP15B2 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos, à 45 °C, em 72 horas de cultivo.....	85

Tabela 16 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo <i>Penicillium sp</i> 1IP4-A2, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Serragem à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.	86
Tabela 17 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP2B1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Sabugo de milho à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.	86
Tabela 18 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP8-A1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Serragem à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.	87
Tabela 19 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína para linhagem 1IP16-A1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Sabugo de milho à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.	87
Tabela 20 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP6B1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Sabugo de milho à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.	88
Tabela 21 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP7B1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Sabugo de milho à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.	88
Tabela 22 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo <i>Aspergillus sp</i> 1IP15B2, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Bagaço de cana-de-açúcar à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.....	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Parede Celular Vegetal.....	16
2.1.1 Biomassa lignocelulósica.....	17
2.1.2 Celulose.....	18
2.1.3 Hemicelulose.....	20
2.1.4 Lignina.....	20
2.2 Enzimas.....	21
2.2.1 Mecanismo de ação das enzimas do complexo celulolítico.....	21
2.2.2 Mecanismo de ação das enzimas do complexo xilanolítico.....	23
2.3 Produção de Enzimas.....	26
2.3.1 Micro-organismos mesófilos e termófilos celulolíticos.....	26
2.3.2 Micro-organismos mesófilos e termófilos xilanolítico.....	27
2.3.3 Fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....	29
2.4 Aplicações das Celulases e Hemicelulases.....	31
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Área de Coleta.....	34
4.2 Isolamento de Micro-organismos.....	35
4.3 Produção Enzimática e Perfil de Produção.....	36
4.3.1 Fermentação em estado sólido (FES).....	36
4.3.2 Efeito da fonte de carbono.....	37
4.4 Determinação de Atividade Enzimática.....	37
4.5 Determinações do Teor Proteína Total.....	38
4.6 Caracterização da Xilanase.....	38
4.6.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	39
4.6.2 Efeito do pH na atividade enzimática.....	39
4.6.3 Estabilidade térmica da xilanase.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Isolamento das Linhagens Fúngicas.....	40
5.2 Efeito da Fonte de Carbono na Produção Enzimática.....	43
5.3 Perfil de Produção das Enzimas.....	49
5.4 Caracterização da Xilanase.....	56
6 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICE A.....	82
APÊNDICE B.....	86

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um dos 'hotspots' para a conservação da biodiversidade mundial. Nos últimos 35 anos mais da metade dos seus 2 milhões de km² originais foram cultivados com pastagens plantadas e culturas anuais acelerando a destruição dos ecossistemas que constituem o cerrado (KLINK e MACHADO, 2005).

Paralelamente ao avanço da destruição, vem crescendo em todo o mundo a consciência sobre a importância da conservação dos recursos naturais. Os componentes da chamada biodiversidade sejam árvores, animais, micro-organismos ou mesmo genes oriundos de seres vivos, passaram a ser vistos como tesouros de valor ainda desconhecido, que podem dar origem a novos medicamentos, produtos industriais, alimentos e outros usos cuja descoberta depende de muita pesquisa científica sobre o pouco que restou dos ecossistemas naturais (DURIGAN, et al., 2011).

Os micro-organismos representam as formas de vida mais abundante e diversificada do planeta, sua diversidade funcional e estrutural possui certa relevância, pois estão associados em mais de 80% das reações que ocorrem no solo. As comunidades microbianas desempenham um papel significativo para a manutenção e equilíbrio ecológico dos ecossistemas, uma vez que estão envolvidas em importantes processos do solo (ZELLER et al., 2001; NANNIPIERI, 2003; KASANA, 2008)

Dentre os micro-organismos presentes no solo com potencial para aplicações biotecnológicas são os fungos que vêm despertando interesse, devido à grande diversidade de enzimas que secretam no ambiente, sendo responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais. Esses micro-organismos desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de ciclagem de nutrientes, decompondo resíduos lignocelulósicos. O seu cultivo em substratos lignocelulósicos, que entre estes, inclui os resíduos agroindústrias tais como palha de milho, arroz, trigo e bagaço de

cana-de-açúcar, possibilita fornecer elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais e, além disso, vem sendo utilizados como substratos e/ou fontes de carbono para induzirem a produção de diversas enzimas como celulases, amilases, proteases e xilanases (BENNET, 1998; SAHA, 2003; ALEXANDRINO et al., 2007).

As xilanases são responsáveis por hidrolisar a cadeia de xilana, principal hemicelulose da parede celular dos vegetais. Estas enzimas xilanolíticas apresentam aplicações na conversão de materiais lignocelulósicos em produtos químicos e combustíveis, nas indústrias de alimentos, têxteis e de ração animal, no branqueamento da celulose e do papel, entre outras (POLIZELI et al., 2005).

As celulases são uma classe de enzimas que catalisam a reação de hidrólise da celulose em glicose e outros açúcares. É dividida em três enzimas principais: endoglucanase, exoglucanases e β -glicosidase (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008). A habilidade em decompor a biomassa celulósica em glicose, a qual poderá ser convertida em produtos de valor agregado e energia, tem tornado as celulases um dos sistemas enzimáticos multicomponentes mais investigados (ADSUL et al., 2005; CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). Além desta aplicação específica, as celulases são amplamente utilizadas no descoramento e amaciamento de tecidos, formulações de detergentes domésticos e industriais, na produção de sucos, preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos e rações animais (SUKIMARAN; REETA; PANDEY, 2005; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006, KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011).

O uso de resíduos agroindustriais nos processos fermentativos, além de ser economicamente viável, pode ajudar a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (DASHTBAN; SCHARAFT; WENSHENG, 2009; ALVIRA et al., 2010, STROPARO et al., 2012). Os resíduos agroindustriais têm sido utilizados, tanto em fermentação do estado sólido como no submerso, e tem sido empregado no cultivo de bactérias ou fungos, tais como, *Aspergillus niger* e *Aspergillus Flavus*

(GUIMARÃES et al., 2013), *Ceriporiopsis subvermispota* (CHMELOVÁ e ONDREJOVIC, 2012), *Bacillus sp* (CARVALHO et al., 2008; CORDEIRO e MARTINS, 2009; KAMBLE E JADHAV, 2012), *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 (SHAH e MADAMWAR, 2005; CHAPLA, et al., 2010).

O conhecimento do conjunto de enzimas que um micro-organismo produz em um determinado substrato, permite avaliar o potencial do preparado enzimático obtido. A presença de um conjunto específico de enzimas pode ser desejável em alguns processos industriais. Além disso, a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheçam suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento dessas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001).

As pesquisas sobre produção de enzimas por micro-organismos termofílicos, assim como a diversidade de substratos alternativos têm crescido significativamente nos últimos anos (I-SON et al., 2010; MAIJALA et al., 2012; MORETTI et al., 2012; CHEN-YU et al., 2013).

Os micro-organismos que vivem em condições extremas são, usualmente, uma rica fonte para obtenção de bioprodutos com propriedades diferenciadas, em particular, enzimas. Devido às suas propriedades únicas, esses bioprodutos podem ser empregados em condições ambientais drásticas, que com freqüência ocorrem na prática industrial. Em geral, há uma alta correlação entre a termofilia do organismo e a termoestabilidade de suas proteínas (intra e extracelulares). Enzimas de termófilos são usualmente moléculas mais termoestáveis e não perdem a sua conformação original e a sua atividade em elevadas temperaturas. Como vários processos industriais requerem enzimas funcionais em temperaturas superiores a 70 °C, há um grande interesse comercial na busca desses catalisadores biológicos (VIEILLE e ZEIKUS, 2001; BRUINS et al., 2001).

Este trabalho aborda o isolamento em áreas de cerrado do Mato Grosso do Sul e seleção de linhagens fúngicas, produtoras de celulasas e xilanases,

através da utilização de resíduos agroindustriais como substrato, sob fermentação em estado sólido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Parede Celular Vegetal

A parede celular vegetal melhor do que qualquer característica diferencia as células animais das células vegetais. Sendo esta responsável não só pela forma e rigidez da célula, mas também limita o tamanho do protoplasto, impedindo a ruptura da membrana plasmática pela entrada de água no interior da célula, além de desempenhar um papel ativo na defesa contra bactérias e fungos patogênicos (RAVEN et al., 2001).

Morfologicamente, a parede celular vegetal varia de espessura, dependendo do papel que determinadas células desempenham na estrutura da planta. As camadas da parede celular formada primeiro constituem a parede primária. A parede primária é depositada antes e durante o crescimento da célula vegetal. As regiões de união das paredes primárias de células adjacentes constituem a lamela mediana. Muitas células subsequentemente depositam camadas celulares adicionais, formando a parede secundária. Quando presente a parede secundária é depositada pelo protoplasto da célula sobre a superfície mais interna da parede primária. A formação da parede secundária ocorre principalmente após a célula ter cessado seu crescimento e a parede primária não aumentar mais em superfície (RAVEN et al., 2001).

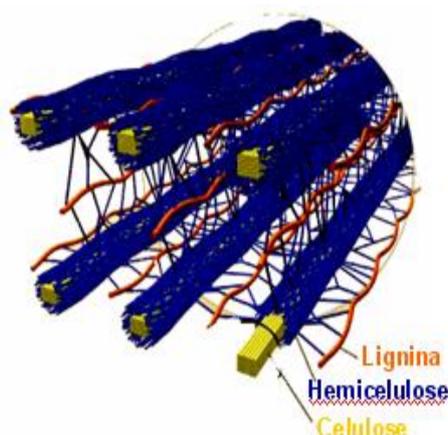
Quimicamente, a parede celular é uma matriz complexa composta de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos, água e minerais. Dos polissacarídeos, destacam-se a celulose, hemicelulose, lignina e a pectina. Existem fortes evidências de que os polissacarídeos isolados apresentam relativa facilidade de degradação pelos micro-organismos do rúmen ou por enzimas isoladas. Entretanto, a degradação destes polissacarídeos quando presente na forma natural, compondo a parede celular, é raramente

completada e varia conforme o tecido examinado, a espécie e a idade da planta. As interações dos componentes da parede, particularmente entre os polifenóis e os carboidratos, exercem as maiores restrições à degradação da parede celular (JUNG, 1992).

2.1.1 Biomassa lignocelulósica

As propriedades químicas dos componentes da lignocelulose tem despertado um crescente interesse que vão além da demanda por aplicações tradicionais como fabricação de papel, compostagem, alimentação animal, entre outras e novas aplicações tais, como por exemplo, combustível de etanol, acetona e butanol, fazem deste substrato um composto de enorme valor biotecnológico, o que tem incentivado seu uso como fontes promissoras na produção de enzimas (MALHERBE e CLOETE, 2003). Os três principais componentes das fibras vegetais são celulose, hemicelulose e lignina (Fig. 1).

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



Fonte: PETERS, 2014

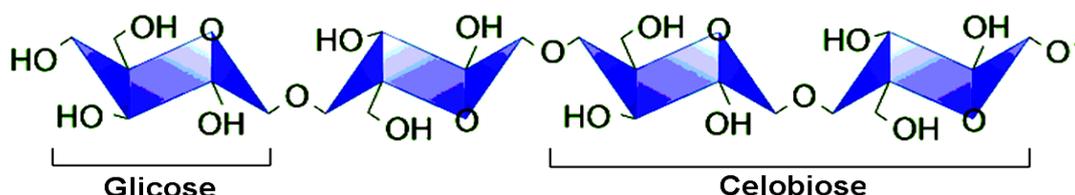
As madeiras apresentam altos teores de celulose (30-75%) e resíduos agrícolas baixos teores (30-45%). Por outro lado, a porcentagem de hemicelulose varia (10-40%) dependendo do tipo de material. O teor de lignina,

em geral, é maior em madeira do que em resíduos agrícolas. Desta forma, as madeiras são mais difíceis de serem biodegradadas, devido à natureza recalcitrante inerente à lignina, o que dificulta o ataque de micro-organismos e enzimas (TAVARES et al., 1997).

2.1.2 Celulose

A celulose é o principal componente estrutural da parede celular que proporciona resistência mecânica e estabilidade química para plantas. É um homopolissacarídeo formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4. O dissacarídeo formado recebe o nome de celobiose (Fig. 2) e é considerada a unidade básica da celulose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ 2006; CHAMPAGNE; LI 2009; SINGH et al., 2014).

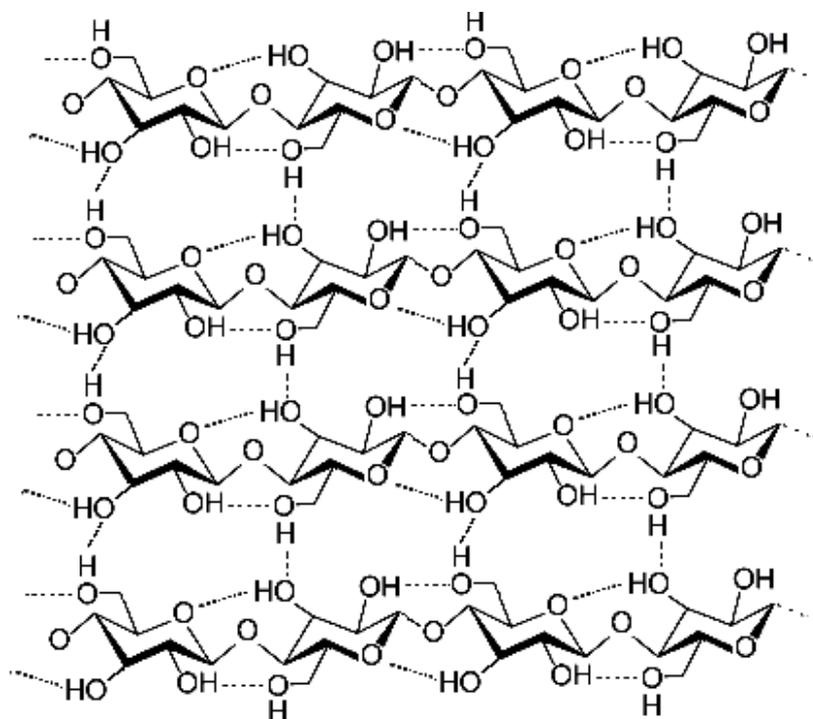
Figura 2 – Representação da estrutura de celulose com unidades de glicose e celobiose.



Fonte: PETERS, 2014

As moléculas de celulose ligam-se umas as outras por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, formando fibrilas (Fig. 3). Várias fibrilas de celulose são agregadas umas as outras formando as microfibrilas. Estas microfibrilas são constituídas por regiões cristalinas rigorosamente ordenadas e por regiões amorfas menos ordenadas (SÁNCHEZ, 2009). Essas propriedades estruturais resultam em uma elevada resistência a hidrólise ácida ou enzimática. Anualmente, as plantas produzem aproximadamente 180 bilhões de toneladas de celulose, sendo o maior reservatório de carbono orgânico no planeta (BUSELLI et al., 2007; BON et al., 2008a).

Figura 3 – Estrutura representativa das cadeias de celulose.



Fonte: YEOMAN et al. (2010)

Lynch et al (1981), citado RUEGGER e TORNISIELO (2004), afirma que a degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem. Na natureza, esses processos representam a maior fonte de carbono para o solo.

A hidrólise da celulose por celulasas resulta na produção final de glicose. Estas, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (THIEMANN et al., 1980 citado por RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO, 2004). Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulasas; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (ROBSON e CHAMBLISS, 1989 citado por RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO, 2004).

2.1.3 Hemicelulose

O termo hemicelulose foi primeiramente introduzido por Schulze em 1891, após obter uma fração isolada, em material vegetal submetido a tratamento químico alcalino. As hemiceluloses são heteropolímeros de xilose, galactose, manose, arabinose e vários outros açúcares, bem como seus ácidos urônicos. Eles são nomeados de acordo com o principal resíduo de açúcar da cadeia polimérica. A xilana é o principal polissacarídeo da hemicelulose e é formada por unidades de D-xilose ligadas entre si por ligações xilopiranosídicas β -1,4 na cadeia principal. À essa cadeia podem se ligar diferentes carboidratos tais como ácidos urônicos e seus derivados, grupos acetil, unidades de 4-O-metil- α -D-glucuronopiranosídeo e α -L-arabinose entre outros, formando as cadeias laterais.

A xilana está presente na madeira numa proporção que varia de 7 a 30% de todo o material da parede celular da planta, seja ela folhosa ou conífera. As xilanas desempenham um papel importante na contextura da madeira, interagem covalentemente com a pectina, estão intimamente associadas à lignina e estão ligadas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals à cadeia de celulose (KULKARNI et al., 1999; BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005; PAES et al., 2012).

Devido à diversidade dos seus açúcares, hemiceluloses requerem uma grande gama de enzimas para serem completamente hidrolisadas em monômeros livres (LIMAYEM e RICKE, 2012). Na degradação da xilana, por exemplo, β -1,4 endoxilanase, β -xilosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilxilana esterase, são enzimas que atuam sobre os diferentes heteropolímeros disponíveis na natureza (KUMAR et al., 2008).

2.1.4 Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante, superado apenas pela celulose. É um componente fundamental da madeira, representando cerca de 15 a 35% de seu peso seco, ela é responsável, em grande parte, pela dificuldade inerente a hidrólise da celulose. Sua rigidez e hidrofobicidade são importantes para o suporte mecânico. Característica que provavelmente permitiu a melhor adaptação das plantas. Esta macromolécula possui natureza polifenólica e é produto da desidratação de três álcoois monoméricos, trans-P-cumaril, trans-coniferil e trans-sinopil. A complexidade deste polímero na célula lhe confere alta eficiência na condução de água da base até o topo do vegetal e também na defesa ao ataque de patógenos. As ligninas de madeiras macias, madeira duras e gramíneas são diferentes em composição, principalmente no grupo metoxil substituinte e no grau de ligação entre os grupos fenólicos. A distribuição do conteúdo de lignina é diferente para cada região da célula. É encontrada em concentrações maiores na lamela média, atuando como um cimento entre as fibras da madeira, e também está presente na parede celular, principalmente na parede celular secundária, formando junto com a hemicelulose uma matriz amorfa, onde as microfibrilas de celulose estão embebidas e protegidas contra a degradação (RAVEN et al., 2001; MARTINEZ et al., 2005).

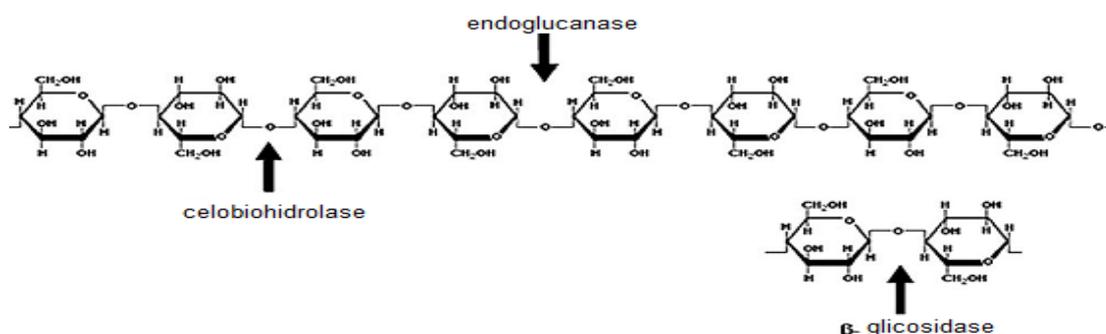
2.2 Enzimas

2.2.1 Mecanismo de ação das enzimas do complexo celulolítico

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise (Fig. 4). Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (LYND et al., 2002; CASTRO e PEREIRA, 2010).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam as ligações β -1,4 da celulose e sua classificação está de acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico, sendo assim classificada em três grandes grupos (Fig. 4): as exoglucanases ou celobiohidrolases, as endoglucanases ou celodextrinases, e as celobiasas ou β -glicosidases, essas últimas não são consideradas como celulases legítimas, mas desempenham um importante papel na hidrólise da celulose (MARTINS et al., 2008; CASTRO e PEREIRA, 2010; OGEDA e PETRI, 2010).

Figura 4 - Estrutura Molecular de celulose e os sítios de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase.



Fonte: KUMAR et al. (2008)

As endoglucanases (1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase; EC 3.2.1.4) são enzimas do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor, quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre e um não redutor, quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente (LYND et al., 2002).

As celobiohidrolases (1,4- β -D-glicana celobiohidrolase; EC 3.2.1.91), são exocelulases, que atuam como exoenzimas que agem no final das cadeias e libera celobiose como principal produto. As β -glicosidases (β -D-glicosideo glicohidrolase; EC 3.2.1.21) clivam celobiose em glicose. Ao contrário das

exoglicosidases, a taxa de hidrólise das celobioses aumenta proporcionalmente à diminuição do tamanho do substrato. As β -glicosidases e as exoglicohidrolases têm em comum os substratos de cadeias de glicose de 2 até 6 unidades. Elas podem ser distinguidas baseadas na suas atividades relativas sobre os dois substratos celbiose e celohexose. As β -glicosidases hidrolisam muito mais rapidamente a celbiose do que as celbiohexoses, enquanto o oposto ocorre com as exoglicohidrolases (WHITAKER, 1994).

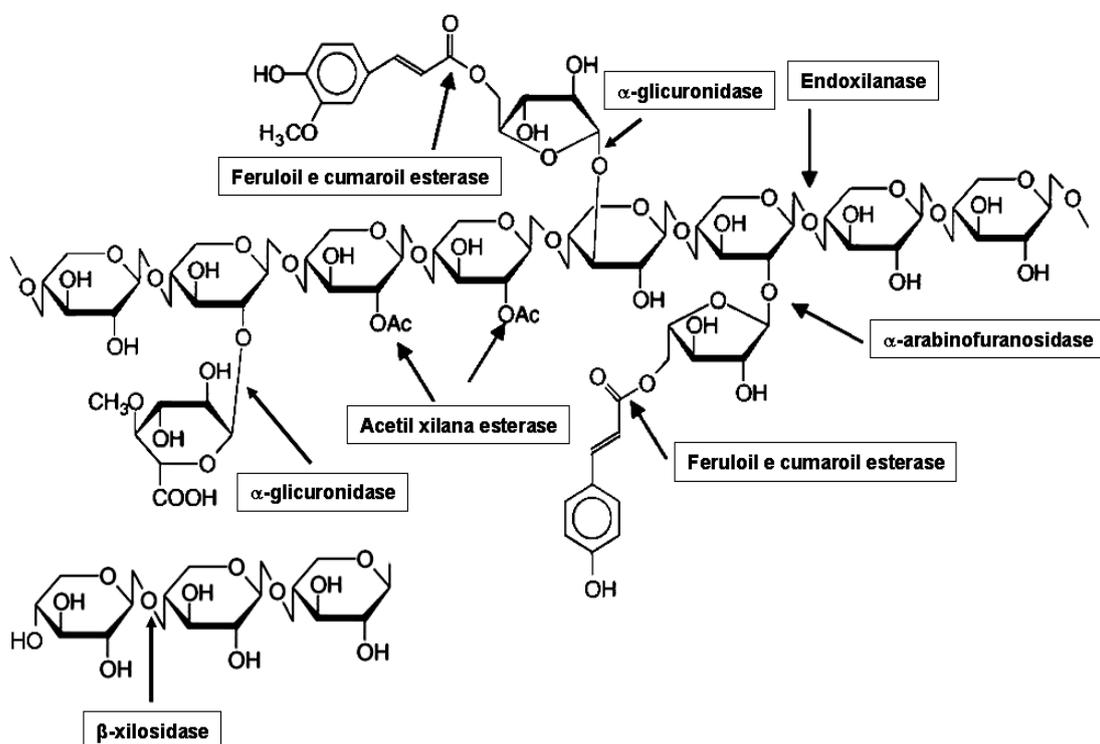
A ação sinérgica dos componentes individuais do sistema de celulases, especialmente endo e exoglicanases sobre a celulose insolúvel tem sido relatada por diversos trabalhos (BÉGUIN e AUBERT, 1994; BHAT e BHAT, 1997; MANSFIELD e MEDER, 2003; WANG et al., 2013). Endoglucanases e celbiohidrolases podem causar dispersão da celulose, seja por ação hidrolítica ou mecânica. A ação de dois ou mais componentes celulolíticos individuais é maior do que a soma de cada ação individual. Apesar de várias décadas de investigação, o mecanismo molecular desta ação sinérgica, continua por resolver, a exemplo temos a cooperação entre as celbiohidrolases. Ainda não se sabe como essas enzimas solúveis conseguem agir sob seu substrato insolúvel. No entanto, uma compreensão da sinergia entre enzimas celulolíticas é essencial para a sua utilização eficiente em escala industrial (WANG et al., 2013).

2.2.2 Mecanismo de ação das enzimas do complexo xilanolítico

As xilanases são enzimas que degradam as xilanas por mecanismo de ação exo e endo. No entanto, a degradação total da xilana inclui as enzimas que degradam o esqueleto, formado pelos resíduos de D-xilose e, aqueles que atuam nos resíduos substituintes das ramificações do esqueleto. O complexo xilanolítico pode ser clivado pela ação de diferentes enzimas que atuam na xilana, componentes do sistema que têm sido mais amplamente estudados são as endoxilanases e as β -xilosidases (WONG et al., 1988; POLIZELI et al., 2005) como ilustrado na figura 5. Assim, têm-se que as endo- β -1,4-xilanases

(1,4- β -D-xilana xilanohidrolase; EC 3.2.1.8) clivam as ligações glicosídicas β -1,4 internas das moléculas de xilana, liberando xilooligossacarídeos e conseqüentemente reduzindo o grau de polimerização do substrato (WONG et al., 1988).

Figura 5 - Estrutura da xilana, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.



Fonte: CHAVEZ et al (2006)

De acordo com Wong et al. (1988), as endoxilanases podem ser de dois tipos, de acordo com o produto final da reação. Assim, podem ser endoxilanases não desramificantes, as quais não conseguem hidrolisar o ponto de ramificação 1,3- α -L-arabinofuranosil da arabinoxilana e as endoxilanases desramificantes as quais conseguem clivar essa ligação liberando arabinose.

Em geral, as endoxilanases mostram o pico de atividade nas temperaturas entre 40°C e 80°C, e pH entre 4,0 e 6,5, embora tenham sido

encontradas condições ótimas de temperatura e pH, fora dessas faixas (POLIZELI et al., 2005).

As β -D-xilosidases (1,4- β -D-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.37) liberam xilose a partir de xilooligossacarídeos curtos e xilobiose. Normalmente, não são capazes de hidrolisar xilana, e seu melhor substrato é xilobiose, mas estas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais como *p*-nitrofenil e nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (POLIZELI et al., 2005).

Um importante papel é atribuído a essas enzimas, pois as xilanases são inibidas por altas concentrações de seus produtos e uma das funções das β -D-xilosidases é diminuir esta inibição causada pela concentração de xilooligossacarídeos (ANDRADE et al., 2004; POLIZELI et al., 2005). As β -D-xilosidases podem ser obtidas do intestino de humanos (SHIN et al., 2003), intestino de insetos (MATTÉOTTI, 2011) e a partir de micro-organismos. A enzima tem sido produzida por bactérias (KIM et al., 2010; ZHOU et al., 2012) como por fungos (WAKIYAMA et al., 2008; SOMERA et al., 2009). As β -D-xilosidases apresentam uma massa molecular de 60 a 360 kDa sendo geralmente glicoproteínas. A maioria dos pHs ótimo fica entre 4,0 e 5,0, e as temperaturas ótimas podem variar entre 40 °C a 80 °C, dependendo do micro-organismo estudado, mas a maioria das β -D-xilosidases obtiveram melhores resultados nos ensaios a 60 °C (POLIZELI et al., 2005).

A acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6) remove os grupos O-acetil na posição do C2 e/ou C3 do resíduo β -D-xilopiranosil da acetil xilano (WONG et al., 1988).

As arabinases removem resíduos de L-arabinose na posição do C2 e C3 de β -D-xilopiranosil e podem apresentar dois modos de ação: exo- α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), a qual degrada arabinanas ramificadas e o *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo; e a endo-1,5- α -L-arabinase (E.C. 3.2.1.99) que hidrolisa as arabinanas lineares (WONG et al., 1988).

A α -Glucuronidase (EC 3.2.1.-) hidrolisa as ligações α -1,2 dos resíduos de ácido glucurônico e β -D-xilopiranosil, da cadeia de glicoranoxilana (WONG et al., 1988).

A ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.-) e a ácido ρ -cumaroil esterase (E.C.3.1.1) clivam as ligações ésteres da xilana, sendo que a primeira cliva entre a arabinose e o ácido ferúlico e a segunda entre a arabinose e o ácido- ρ -cumarico (WONG et al., 1988).

2.3 Produção de Enzimas

2.3.1 Micro-organismos mesófilos e termófilos celulolíticos

Os micro-organismos são as fontes favoritas para a produção de celulases (Tabela 1), devido à ampla diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética (YEOMAN, 2010). Entre os micro-organismos os fungos filamentosos apresentam diversas vantagens em função do grande potencial de secreção desse grupo de enzimas (ÖGEL et al., 2001; GOMES et al., 2007).

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de celulases.

Grupo	Micro-organismo	Grupo	Micro-organismo
Bactérias	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Bactérias	<i>Cellvibrio gilvus</i>
	<i>Bacteroides cellulosityticus</i>		<i>Cellvibrio vulgaris</i>
	<i>Bacteroides succinogenes</i>		<i>Clostridium thermocellum</i>
	<i>Cellulomonas sp</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Cellvibrio fulvus</i>		<i>Ruminococcus albus</i>
Actinomicetos	<i>Streptomyces griseu</i>	Actinomicetos	<i>Thermonospora curvata</i>
	<i>Thermoactinomycete spp</i>		<i>Thermonospora fusca</i>
Fungos	<i>Agaricus bisporus</i>	Fungos	<i>Fusarium solani</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Humicola insolens</i>
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Macrophomina phaseolina</i>
	<i>Aspergillus terreus</i>		<i>Penicillium janthinellum</i>
	<i>Botryodiplodia theobromae</i>		<i>Talaromyces emersonii</i>
	<i>Chaetomium thermophilum</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>
	<i>Eupenicillium javenicum</i>		<i>Trichoderma reesei</i>

Fonte: COUGHLAN, 2013

O decaimento do material lignocelulósico catalisado pelas enzimas celulolíticas fúngicas é de extrema importância ao nosso ecossistema. Desta

forma, não é surpreendente que estas celulasas fúngicas têm sido os principais alvos de grande investigação por muitos anos. O principal interesse nessas enzimas se dá pelo fato dos fungos serem capazes de produzir celulasas extracelulares, que assim como as celulasas bacterianas, agem sinergicamente para hidrólise celulósica (ZHOU e INGRAM, 2000; GRAY e ZHAO, 2006; KUMAR et al., 2008).

Muitos estudos foram realizados sobre a produção de celulasas por fungos aeróbios *Trichoderma viride* (TIAN-QING et al., 2013.; IRSHAD et al., 2013), *Trichoderma reesei* (MAURYA, et al., 2012; FANG e XIA, 2013), *Penicillium pinophilum* (POL et al., 2012; VISSER et al., 2013). Também foram identificados outros micro-organismos produtores de celulase ativa tais como os fungos aeróbios termofílicos *Sporotrichum termophile* (DIMAROGONA et al., 2012) *Thermoascus aurantiacus* (MCCLENDON et al., 2012, BRIENZO; MONTE; MILAGRES, 2012), e por bactérias mesofílicas e termofílicas a exemplo temos *Bacillus subtilis* (RAWAT; TEWARI, 2012) *Bacillus halodurans* (PRAKASH et al., 2012), *Clostridium thermocellum* (OLSON et al., 2010), *Streptomyces viridobrunneus* (DaVinha et al., 2011). Dentre estes micro-organismos, os termofílicos celulolíticos são os mais interessantes, pois as celulasas são geralmente estáveis sob uma variedade de condições severas incluindo pH altamente ácido e alcalino. Também conseguem desenvolver-se em uma variedade de substratos com menores riscos de contaminação por outros micro-organismos (BHAT e BHAT, 1997; GOMES et al., 2007).

2.3.2 Micro-organismos mesófilos e termófilos xilanolítico

As xilanases são produzidas por uma variedade de micro-organismos, tais como bactérias, leveduras e fungos. Entre as fontes microbianas, os fungos filamentosos são especialmente interessantes do ponto vista industrial devido ao fato de secretarem xilanases no meio em níveis superiores aos encontrados em leveduras e bactérias (HALTRICH et al., 1996; POLIZELI et

al., 2005). Acredita-se que a habilidade de degradar a lignocelulose eficientemente esteja associada à capacidade de crescimento micelial, que permite que o fungo acesse regiões internas do substrato (HAMMEL, 1997).

Importante ressaltar que um dos fatores básicos para uma eficiente produção de xilanases por micro-organismos refere-se a escolha adequada do substrato e a otimização da composição do meio de cultivo, pois, a partir daí, pode-se definir as características da enzima, bem como controlar a formação de compostos indesejáveis (KULKARNI et al., 1999). Ainda tem-se que a produção de xilanases, por fungos filamentosos, é influenciada, por variáveis como temperatura, pH, nível de oxigênio dissolvido e agitação dos meios, por via de regra. Os fungos sintetizam enzimas mais ativas em pH baixo (HALTRICH et al., 1996).

Na indústria, os fungos são os mais utilizados nos processos de fermentação em estado sólido, para a obtenção do extrato enzimático. Entre os fungos xilanolíticos mesofílicos destacam-se os gêneros: *Aspergillus*; *Trichoderma*; já as mais notáveis espécies entre os termófilos incluem: *Humicola insolens* (YANG et al., 2014), *Humicola lanuginosa* (KAMRA e SATYANARAYANA, 2004), *Humicola grisea* (MANDALARI et al., 2008), *Thermoascus aurantiacus* (OLIVEIRA et al., 2010; BRIENZO; MONTE; MILAGRES, 2012), *Thermomyces lanuginosus* (KUMAR et al., 2009), *Chaetomium thermophile* (LATIF et al., 2006) *Melanocarpus albomyces* (BISWAS et al., 2010), *Paecilomyces thermophila* (YANG et al., 2006). As xilanases desses fungos possuem temperatura ótima entre 60 °C e 80 °C e são muito estáveis nesses intervalos. Estas enzimas são geralmente glicoproteínas e apresentam uma maior atividade em pH ácido na faixa entre 4,5-6,5 (BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005). Entre as bactérias têm-se: *Bacillus stearothermophilus* (FAEZIZADEH e GHARIB, 2011), *Cellulomonas fimi* (CHEN et al., 2012), *Bacillus circulans* (POKHREL et al., 2013), *Bacillus licheniformis* (VAN et al., 2010) entre outras espécies de *Bacillus sp.*

2.3.3 Fermentação em estado sólido e fermentação submersa

As duas principais estratégias para a produção de enzimas microbianas são os processos de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm) (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

A FSm é a técnica majoritariamente utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas devido à facilidade de crescimento dos micro-organismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares. Este processo utiliza um meio fermentativo líquido, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis e o desenvolvimento do micro-organismo se dá em presença de água livre. O conteúdo de água nesse processo é superior a 95% (ORLANDELLI et al., 2012). Essa técnica de fermentação é mais adequada para os micro-organismos, tais como bactérias que requerem elevada umidade (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012).

Na FES, o meio de cultura é composto de substratos sólidos, atuando como fonte de carbono e apresenta pouca água livre, o que faz com que essa condição de crescimento tente se aproximar do habitat natural. É um sistema de cultivo alternativo para a produção de produtos de valor agregado a partir de micro-organismos, especialmente enzimas (PARANTHAMAN et al., 2008).

Produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria, na forma de resíduos não processados, são empregados na FES como substratos para servirem de matriz sólida e fornecerem carbono para o crescimento do micro-organismo, além de apresentarem um custo relativamente baixo. Esses substratos são divididos em três grupos: os que apresentam amido como fonte de carbono principais sendo estes: arroz, batata, mandioca e milho, entre outros; os que apresentam celulose ou lignocelulose como fonte de carbono principal como as madeiras e as palhas e os que apresentam açúcares solúveis como fonte de carbono principal sendo eles forragens, polpas de frutas e beterraba, entre outros (ORLANDELLI et al., 2012). Nessa técnica de

fermentação, a degradação de substrato é muito lenta e ocorre progressivamente, de modo que o mesmo substrato pode ser utilizado por períodos longos de fermentação. Assim, esta técnica suporta a liberação controlada de nutrientes. A FES é adequada para fungos filamentosos, pois estes podem se desenvolver-se em ambientes que apresentam baixos níveis de umidade relativa. Além disso, os fungos filamentosos apresentam hifas áreas propícias para a colonização de substratos sólidos (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012).

Comparado com fermentação submersa, o uso de FES apresenta vantagens, como menor necessidade de energia, menor volume do reator e alta produtividade, baixo investimento de capital, baixo desperdício de água, maior concentração de metabólitos obtidos e baixo custo de processamento (PARANTHAMAN et al., 2008). Contudo FES também apresenta algumas limitações, como a dificuldade de dissipação de calor gerado pelo metabolismo microbiano, transferência de oxigênio limitada dependendo da granulometria do substrato, dificuldade no controle de temperatura e além dessas variáveis, há uma maior dificuldade de coleta de amostras representativas durante o processo, devido à não homogeneidade da massa em fermentação (SANTOS et al., 2006).

Análise da literatura mostrou a potencialidade e aplicabilidade da fermentação em estado sólido. Apesar das limitações, esse processo é viável ao crescimento fúngico, semelhante às condições mais próximas às do habitat naturais.

Na produção de enzimas por fungos e bactérias, os efeitos da fonte de carbono, além dos fatores físico-químicos, como pH e temperatura, são muito importantes como fatores de regulação da biossíntese (ALI e HOSSAIN, 1991; GHOSH et al., 1991; KILIKIAN, 1996; GONÇALVES, 2006).

2.4 Aplicações das Celulases e Hemicelulases

Atualmente, as enzimas são comumente utilizadas em muitas aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas estão crescendo rapidamente. Há várias aplicações das celulases e hemicelulases em processos biotecnológicos em diversas indústrias como de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, etc. Para essas indústrias, a aplicação de tecnologia enzimática reduz custos operacionais, aumenta a qualidade do produto, utilizando processos limpos que contribuem para diminuir os impactos ambientais (MAYRINK, 2010).

As celulases podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias em conjunto com as hemicelulases e pectinases, na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. Após o prensamento, centrifugação e filtração das frutas, essas enzimas são utilizadas para clarear o suco e aumentar a liquefação através da degradação da fase sólida que é gerada. O processamento enzimático aumenta o rendimento do suco, reduz o tempo de processamento e melhora a qualidade do produto (BHAT, 2000). Também tem sido utilizada no processo para obtenção de ração animal, pois as enzimas glucanases, pectinases, proteases, amilases, fitases, galactosidases, lipases, celulases e hemicelulases, especialmente, a xilanase, na ração pode melhorar a sua qualidade nutricional e favorecer a digestão de ruminantes e monogástricos (TWOMEY et al., 2003).

As xilanases atuam no arabinosilano, um dos componentes da ração, reduzindo a viscosidade do material cru. O arabinosilano encontrado na parede celular dos grãos têm um efeito anti-nutriente. Quando esses componentes estão presentes na forma insolúvel, eles podem alterar a viscosidade do alimento ingerido, interferindo com a mobilidade e a absorção de outros componentes. Se esta enzima é adicionada a rações contendo milho e sorgo, ambos alimentos de baixa viscosidade, ela pode aumentar a digestão dos nutrientes na parte inicial do trato digestivo, resultando em um melhor uso energético (TWOMEY et al., 2003).

Na indústria têxtil, as celulases têm alcançado um sucesso mundial, devido sua capacidade de modificar fibras celulósicas em um ambiente controlado e de forma desejada, melhorando a qualidade dos tecidos (BHAT, 2000). Agem removendo fibras e “*pilling*” do tecido, além de oferecer amaciamento da peça. Sua aplicação mais bem sucedida é na produção da aparência desbotada do jeans. O acréscimo de celulases também pode ser realizado em produtos de lavagem de tecidos e são indicadas por ajudar na detergência e para limpar as superfícies de fibra, melhorando a aparência do tecido (CAVACO-PAULO, 1998).

As celulases e hemicelulase têm sido utilizadas na indústria de papel e celulose para diferentes finalidades. A utilização de celulases na polpa de celulose atua nas propriedades das fibras, permitindo seu desenxague, aumentando a velocidade de fabricação do papel (BHAT, 2000). Na fabricação de papel reciclado, a ação enzimática promove a despigmentação da matriz celulósica formando folhas de papel com o mínimo de brilho exigido para impressão e escrita (PÈLACH et al., 2003). Quanto à utilização da hemicelulase, especificamente as xilanases, tem a função de reduzir o requerimento de produtos contendo cloro. A principal força motriz para utilização desta enzima, nesses setores, está relacionada à questões de economia e meio ambiente, devido vantagens que a mesma apresenta no processo de branqueamento (BEG et al., 2001).

As xilanases são capazes de degradar a porção de hemicelulose na polpa seletivamente, sem afetar a celulose. A utilização enzimas lignocelulolíticas no processo da produção do papel é chamada branqueamento. No processo de produção de papel, produção de pasta química é o primeiro passo, no qual as fibras são quebradas e a maior parte da lignina é removida. O processo químico mais utilizado em todo o mundo é conhecido como branqueamento de polpa *kraft* (DAMIANO et al., 2003; DUARTE et al., 2003; OAKLEY et al., 2003). Branqueamento de polpa *kraft* geralmente requer grandes quantidades de produtos químicos à base de cloro e hidrossulfito de sódio, que causam vários problemas à base de efluentes das

indústrias de papel e celulose. A utilização desses produtos químicos gera substâncias orgânicas cloradas, alguns dos quais são tóxicos, mutagênicos, persistente e muito resistente à biodegradação (DHIMAN et al., 2008). O uso das xilanases permite uma redução de 30% na quantidade de cloro usado (DaSILVA et al., 1997).

Outra importante área é a de tratamento de resíduos lignocelulósicos, pois anualmente toneladas de resíduos agroindustriais e florestais são geradas na natureza, sendo essa biomassa formada de celulose, lignina e hemicelulose. Porém há vários anos, as celulasas e xilanases estão sendo utilizadas como uma alternativa para reciclar esses resíduos. As xilanases, juntamente com outras enzimas, como as manases, ligninases, e celulasas são empregadas para a geração de biocombustíveis como o etanol (GALBE e ZACCHI, 2002). O processo biológico de produção de etanol combustível requer a deslignificação da lignocelulose para liberar celulose e hemicelulose complexada com a lignina. Em seguida, há uma despolimerização dos polímeros de carboidrato para produzir açúcares fermentescíveis aos micro-organismos (BEG et al., 2001). Alguns micro-organismos foram geneticamente modificados para produzir etanol a partir de biomassa hemicelulósica, tais como as *Saccharomyces*, *Escherichia coli* e *Zymomonas* (NIGAM e SINGH, 1995; SUN e CHENG, 2002).

Em função da aplicabilidade das enzimas na indústria, muitos processos podem ser desenvolvidos utilizando fungos e outros micro-organismos como fontes de enzimas, que são capazes de degradar os componentes dos resíduos lignocelulósicos, além de contribuir para a remoção de poluentes ambientais.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho propõe isolar linhagens fúngicas em áreas de Cerrado, com intuito de investigar a produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos, através de fermentação em estado sólido utilizando como substratos resíduos agroindústrias. Dessa forma objetivou-se:

- a) Isolar linhagens fúngicas produtoras de xilanases e celulases em áreas de Cerrado;
- b) Selecionar as linhagens que apresentaram maiores atividades enzimáticas com crescimento a 45 °C;
- c) Estudar o perfil de produção das enzimas por fermentação em estado sólido (FES), visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais;
- d) Realizar caracterização físico-química, relativa à pH e temperatura ótima da xilanase bruta das linhagens selecionadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Coleta

As coletas foram realizadas em área de Cerrado do estado do Mato Grosso do Sul-MS, na Fazenda São José, propriedade particular, localizada no município de Inocência-MS.

Na fazenda São José foram amostrados 16 pontos de coleta devidamente georeferenciadas (Tabela 2), nas datas de 15 de agosto de 2012 e 2 de maio de 2013.

Na área de coleta eram evidentes dois tipos de vegetação característicos do cerrado: o estrato lenhoso composto de árvores, arbustos e o estrato herbáceo formado por ervas e subarbustos (Fig. 6).

Tabela 2 - Pontos de coleta geofeccionados em área de cerrado do Estado do Mato Grosso do Sul.

Ponto de Coleta	Latitude	Longitude
P1	-20 01' 28,34798"	-51 46' 35,70624"
P2	-20 01' 24,69803"	-51 46' 34,74064"
P3	-20 01' 14,67515"	-51 46' 16,45227"
P4	-20 01' 15,64074"	-51 46' 17,39855"
P5	-20 01' 10,61965"	-51 46' 13,30443"
P6	-20 01' 23,40413"	-51 46' 29,44918"
P7	-20 01' 28,57972"	-51 46' 33,29225"
P8	-20 01' 39,45232"	-51 46' 16,08534"
P9	-20 01' 36,34310"	-51 46' 04,84582"
P10	-20 01' 32,59659"	-51 46' 07,64604"
P11	-20 01' 18,86583"	-51 46' 21,26094"
P12	-20 01' 01,46580"	-51 46' 08,43783"
P13	-20 00' 51,80985"	-51 46' 04,57545"
P14	-20 01' 34,54710"	-51 46' 11,39255"
P15	-20 01' 38,69916"	-51 46' 11,08356"
P16	-20 01' 42,04012"	-51 46' 22,97969"

Fonte: Dados do próprio autor

Figura 6 – Vista das áreas e pontos de coleta na Fazenda São José, Inocência, MS.



Fonte: Do próprio autor

4.2 Isolamento de Micro-organismos

As amostras de solo coletadas em campo foram acondicionadas em sacos plásticos e caixa de isopor para o transporte até o laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos da UNESP, Câmpus de Ilha

Solteira, para os procedimentos de isolamento microbiano. Aproximadamente 1,0 g de amostra de solo, madeira em decomposição ou serapilheira foram coletados em campo e transferidos diretamente para frascos contendo 4 mL de meio nutriente esterelizado composto por; 0,2 % peptona; 0,14 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,20 % K_2HPO_4 ; 0,02 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 % uréia; $1,60 \text{ mg L}^{-1}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $1,40 \text{ mg L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ CoCl_2 ; 5 mg L^{-1} $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 tiras de palha de milho (3,0 cm x 0,5 cm) como principal fonte de carbono.

Após incubação de 35 e a 45 °C por 24 horas, o material líquido foi transferido por esgotamento em estria, com o auxílio de uma alça de inoculação, para placas de Petri contendo o meio correspondente, com 1,0 % de palha milho triturada, acrescido de 1,5% de ágar. Após a esterilização foi adicionado uma solução com streptomomicina e clorofenicol ao meio com o objetivo de impedir o crescimento bacteriano.

As culturas puras foram estocadas no mesmo meio inclinado, contendo 0,5 % de xilana, os quais foram mantidas a 7 °C, para os testes de produção. Foi mantido estoque das culturas, também, em meio Saboraud inclinado.

4.3 Produção Enzimática e Perfil de Produção

4.3.1 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada com 66 linhagens em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5,0 g de substrato, o qual foi umedecido com 10 mL de solução de minerais (0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,20% K_2HPO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,03% uréia para pH 5,0), visando um teor de umidade inicial em torno de 75%. Foi utilizado como principal fonte de carbono o farelo de trigo obtido no comércio local. Após a esterilização dos frascos, o material sólido foi umedecido com solução salina e inoculado com a cultura microbiana. O inóculo fúngico foi preparado a partir do cultivo em placa de Petri contendo meio Agar Dextrose Sabourand por 48 horas. Cinco discos (0,5 cm de diâmetro) do crescimento foram utilizados como inóculo e transferidos para os frascos Erlenmeyer

contendo o substrato. Foi utilizado um bastão de vidro para homogeneizar o inoculo no substrato. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados em estufa a 45 °C por 72 horas e o crescimento microbiano foi avaliado através da visualização do crescimento micelial típico.

Ao final de cada fermentação, a solução enzimática bruta foi extraída pela adição de 50 mL de água estéril em cada frasco, com crescimento. Esse meio foi suavemente homogeneizado usando um bastão de vidro e, em seguida, levado a agitação em shaker a 100 ciclos/minutos por 1 hora à temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada utilizando gase, seguido por centrifugação a 10.000 rcf, 5 °C durante 15 minutos. O sobrenadante líquido foi utilizado como enzima bruta para a determinação das atividades enzimáticas para xilanase, CMCase e avicelase.

4.3.2 Efeito da fonte de carbono

As linhagens que apresentaram as maiores atividades foram submetidas ao ensaio em diferentes fontes de carbono. As fontes de carbono, analisadas foram além do farelo de trigo (FT), sabugo de milho (SM), serragem (S) e bagaço de cana-de-açúcar (BC). Após o inóculo do micro-organismo, a fermentação ocorreu a uma temperatura de 45 °C, por 72 horas. Após crescimento microbiano a solução enzimática bruta foi obtida como descrito no item 4.3.1.

4.4 Determinação de Atividade Enzimática

As enzimas analisadas caracterizam como degradadoras de parede celular de plantas: celulasas (avicelase e CMCCase) e a hemicelulase (xilanase).

Para as atividades CMCCase, avicelase e xilanase foram utilizados no meio reacional os substratos carboximetilcelulose (CMC) a 4%, avicel (Sigma) a 1% e xilana (Sigma) a 1%, respectivamente. A mistura reacional foi

constituída de 0,025 mL da enzima bruta em 0,225 mL do substrato específico, preparado em tampão acetato 100 mM e pH 5,5. A mistura de reação foi incubada a 55 °C por 10 minutos, posteriormente foi interrompida pela adição de 0,250 mL do reagente DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por MILLER (1959). Os controles foram preparados com a enzima após a adição do reagente DNS. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm. Uma unidade (IU) de atividade de CMCCase ou avicelase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mol de glicose por minuto sob as condições de reação acima, utilizando uma curva analítica de glicose. Uma unidade (IU) de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mol de xilose por minuto sob as condições de reação acima, utilizando uma curva analítica de xilose.

4.5 Determinações do Teor Proteína Total

A quantificação da proteína foi determinada pelo método de Hartree-Lowry, usando soro albumina bovina como padrão (HARTREE, 1972). A determinação da atividade específica foi obtida pela divisão da atividade enzimática (U/mL) pelo teor de proteína total (g/mL), apenas para enzima xilanase.

4.6 Caracterização da Xilanase

Nesta etapa, diferentes linhagens foram selecionadas com base nas maiores atividades obtidas, após a etapa descrita no item 4.3.2, em variados períodos de produção e utilizando diversas fontes de carbono sob fermentação em estado sólido.

4.6.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade da xilanase foi realizada, nas mesmas condições descritas no item 4.4, variando a temperatura de 30 °C a 75 °C. Os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. A densidade ótica foi determinada em leitor de Elisa a 540 nm.

4.6.2 Efeito do pH na atividade enzimática

A determinação do pH ótimo da xilanase seguiu as mesmas condições descritas no item 4.4, em diferentes valores de pHs, nas temperaturas ótimas anteriormente encontradas no item 4.6.1, por 10 minutos. Os seguintes tampões (100 mM) foram utilizados: McIlvaine (pH 3,0-8,0) e tampão glicina-NaOH (pH 8,0-11).

4.6.3 Estabilidade térmica da xilanase

Para determinar a estabilidade térmica da xilanase frente às diferentes temperaturas, utilizou-se 500 µL de solução enzimática bruta. A solução foi incubada, variando a temperatura de 30 °C a 75 °C por 60 minutos na ausência de substrato, em banho maria. Posteriormente, as amostras foram retiradas e incubadas em gelo por 10 minutos. Foi determinada a atividade da xilanase, nas mesmas condições anteriormente citadas item 4.4, utilizando as temperaturas ótimas anteriormente encontradas no item 4.6.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento das Linhagens Fúngicas

Foram isolados 148 fungos filamentosos, com crescimento a 35 °C e 45 °C a partir de amostras de serapilheira e solo (Tabela 3).

Tabela 3 – Isolados fúngicos de áreas de Cerrado do município de Inocência (MS).

Coleta	Fungos Filamentosos	
	35 °C	45°C
1 ^a	46	40
2 ^a	36	26

Fonte: Dados do próprio autor

Desses fungos 66 linhagens com crescimento a 45 °C foram selecionadas, quanto ao potencial de enzimas celulolíticas e hemicelolíticas. As linhagens foram cultivadas sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, o qual tem sido um excelente meio para o crescimento de fungos e para a produção de enzimas lignocelulolíticas em função do seu elevado teor em nutrientes (HU et al., 2011; LEITE et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2005; SILVA et al., 2002).

Nas tabelas 4 e 5 encontra-se os resultados para a produção de xilanase, avicelase e CMCase dos isolados, da primeira e da segunda coleta respectivamente.

Tabela 4 – Atividades xilanase, avicelase e CMCase de linhagens isoladas na primeira coleta em áreas de Cerrado, no município de Inocência-MS. Cultivo sob fermentação em estado sólido, à 45 °C, após 72 horas de fermentação.

Linhagens	Atividade enzimática (U/g)			Linhagens	Atividade enzimática (U/g)		
	Xilanase	CMCase	Avicelase		Xilanase	CMCase	Avicelase
1IP1A	3,70	1,20	0	1IP8B	3,90	0	0
1IP1B1	48,3	3,00	4,40	1IP9-A1	17,6	5,3	8,80
1IP2-A1	17,1	0,90	6,50	1IP10-A2	15,6	5,3	7,70
1IP2-A1.2	6,50	1,00	3,20	1IP10B1	22,9	2,0	2,40
1IP2-A3	2,80	2,90	1,20	1IP10B1.1	6,40	1,2	7,30
1IP2B1	159,0	2,90	2,90	1IP11-A1	3,90	8,0	4,10
1IP3-A1	2,90	5,70	0	1IP11-A3.1	5,60	8,2	2,10
1IP4-A1	15,3	0	0	1IP11B1	3,90	0,21	4,00
1IP4-A2	190,0	1,10	3,50	1IP12-A1.1	4,80	1,2	2,80
1IP4B1	1,70	0,70	0	1IP12-A1.2	42,4	1,7	0
1IP5-A1	15,4	2,90	1,90	1IP13-A	2,20	2,2	0
1IP5B1.2	6,60	0,90	1,30	1IP13-A1	1,40	0,9	0
1IP6B1	108,0	2,40	1,40	1IP13-A2	3,70	4,3	2,10
1IP6B2	33,9	0,90	2,40	1IP13B	10,2	2,8	0
1IP7-A1	3,70	2,70	2,60	1IP14-A2	4,50	5,6	7,30
1IP7-A1.2	10,2	5,10	5,90	1IP14-A3	3,70	0	3,60
1IP7B1	98,3	2,70	1,80	1IP15-A3	33,2	0	3,20
1IP8-A1	118,6	5,90	0	1IP15B1	2,70	1,3	1,70
1IP8-A3	17,1	0	4,60	1IP15B2	73,0	5,4	1,20
1IP8B2	0	0,70	7,70	1IP16-A1	113	2,3	3,00

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 5 – Atividades xilanase, avicelase e CMCase de linhagens isoladas na segunda coleta em áreas de Cerrado, no município de Inocência-MS. Cultivo sob fermentação em estado sólido, à 45 °C, após 72 horas de fermentação.

Linhagens	Atividade enzimática (U/g)			Linhagens	Atividade enzimática (U/g)		
	Xilanase	CMCase	Avicelase		Xilanase	CMCase	Avicelase
2IP1B1	5,4	1,1	0	2IP9-A	3,2	1,3	0
2IP2-A1	4,7	2,3	2	2IP10-A	1,8	3,8	0
2IP2B1.2	2,7	1,7	2,5	2IP10-A1	3	0	0
2IP2B3	9,1	0	4,9	2IP11-A1.1	2,6	0,9	1,6
2IP3B1	4,7	2,3	0	2IP11-A4	0	1,6	2,3
2IP4-A1	4,2	2	0	2IP12-A	2,3	0,9	0
2IP4-A2	4,3	0,7	3,1	2IP12B1	2,4	4,4	2,9
2IP5-A1	2,1	3,4	0	2IP13-A2.2	2,6	0,7	2
2IP5B1	5,2	1,3	7,2	2IP13B1	3,7	0	3,2
2IP6B2.1	5,6	2,1	3,1	2IP14B	2,5	3,3	0
2IP7-A1	4,2	2	0	2IP15-A1	3,7	2,9	1
2IP7B	5,7	0	0	2IP15B2	4,2	4,6	2,4
2IP8-A2	4,4	2,2	2,1	2IP16-A2.1	4,8	0	2,2

Fonte: Dados do próprio autor

Verifica-se que todas as diferentes linhagens fúngicas em estudo, diferiram quanto ao potencial de produção e/ou níveis de enzimas produzidas. De acordo com Underklofer, Barton e Rennert (1958), as quantidades absolutas e relativas de cada enzima produzida podem variar consideravelmente entre espécies e mesmo entre linhagens da mesma espécie. As características físico-químicas das enzimas produzidas também podem diferir, visto que diferentes micro-organismos e linhagens se comportam de maneira variada frente a uma mesma condição de incubação, podendo produzir enzimas com propriedades diversas.

As melhores atividades de xilanase foram obtidas pelas linhagens 1IP2B1, 1IP4-A2, 1IP6B1, 1IP7B1, 1IP8-A1, 1IP15B2, 1IP16-A1. A atividade CMC_{case} foi maior para as linhagens 1IP11-A3.1, 1IP11-A1, 1IP8-A1, 1IP3-A1, 1IP14-A2, 1IP15B2. Para a atividade avicelase, os resultados não foram superiores a 8,8 U/g (0,88 U/mL), sendo os isolados 1IP9-A1, 1IP8B2, 1IP10-A2, 1IP10B1.1, 1IP14-A2, 2IP5B1 os que apresentaram as maiores atividades.

As linhagens com as melhores atividades enzimáticas foram identificadas com base nas características de crescimento exibidas em meio Sabourand e morfológicas através de microscópio óptico, sendo como *Penicillium sp* a linhagem 1IP4-A2, como sendo *Aspergillus sp* as linhagens 1IP2B1, 1IP6B1, 1IP7B1, 1IP8-A1, 1IP15B2 e 1IP16-A1.

Análises comparativas dos isolados que obtiveram o maior valor de atividade de xilanase e CMC_{case} em estudo na primeira etapa do projeto com diferentes espécies de fungos, mostram que valores mais elevados ao estudo, foram encontrados por vários autores, utilizando o farelo de trigo como substrato sob fermentação em estado sólido. Embora valores menores para atividade de xilanase, também foram encontrados (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação de dados da literatura, sobre as produções de xilanase, CMCase, obtidas por fungos cultivados em farelo de trigo sob fermentação em estado sólido.

Fungo	Xilanase (U/g)	Referências
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	2,335	Gaffney et al., 2009
<i>Myceliophthora sp</i>	128,9	Badhan et al., 2007
<i>Aspergillus japonicus C03</i>	155,50	Facchini et al., 2011
<i>Penicillium sp 1IP4-A2</i>	190,0	Presente estudo.
<i>Trichoderma reesei SAF3</i>	210,0	Kar et al., 2013
<i>Aspergillus foetidus MTCC 4898</i>	4516	Chapla et al., 2010
<i>Humicola brevis var. thermoidea</i>	5372	Masui et al., 2012.
<i>Humicola lanuginosa</i>	5977	Kamra e Satyanarayana, 2004.
CMCase (U/g)		
<i>Aspergillus japonicus C03</i>	19,38	Facchini et al., 2011
<i>Myceliophthora sp</i>	26,6	Badhan et al., 2007
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10,26	Sherief et al., 2010
<i>Aspergillus niger MTCC7956</i>	135,4	Sukumaran et al., 2009
<i>Aspergillus sp 1IP8-A1</i>	5,90	Presente estudo

Fonte: Dados do próprio autor

Os resultados obtidos, para todas as linhagens, na primeira etapa do projeto demonstraram que, dentre as linhagens isoladas, não foram encontrados fungos com potencial catalítico muito maior aos já descritos nas literaturas. No entanto, deve-se considerar que há diferenças de metodologia de fermentação tais como umidade, aeração, pH e temperatura. O perfil de microbiano presente no local ainda não havia sido estudado. Tais dados foram importantes para o levantamento da diversidade fúngica associada ao Cerrado no Mato Grosso do Sul. Assim, as atividades enzimáticas por esses isolados foram importantes para uma prévia seleção de fungos com potencial de produção enzimática, levando em consideração as maiores atividades.

5.2 Efeito da Fonte de Carbono na Produção Enzimática

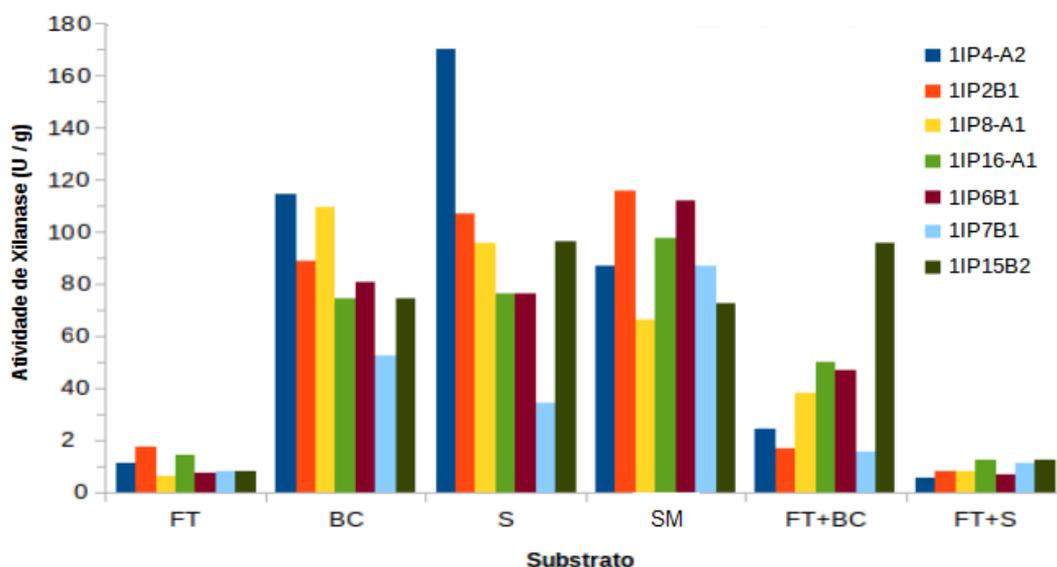
Os resultados apresentados na tabela 4 indicaram que as melhores atividades para xilanase foram apresentadas pelos fungos

Penicillium sp 1IP4-A2, *Aspergillus sp* 1IP2B1, 1IP8-A1, 1IP16-A1, 1IP6B1, 1IP7B1 e 1IP15B2. E esses, foram selecionados para o cultivo em diferentes fontes de carbono visando estabelecimento dos melhores substratos indutores.

Foram utilizados os substratos isoladamente ou em mistura com farelo de trigo na proporção 1:1. A otimização da fermentação com misturas de substrato, é uma estratégia para melhorar a produção da enzima (DAS e GHOSH, 2009). Misturas de substratos naturais fornecem nutrientes adequados e além de simular as condições do habitat para o crescimento de fungos filamentosos (Rao et al., 2007). Os substratos analisados foram farelo de trigo (FT), serragem (S), sabugo de milho (SM) e bagaço de cana-de-açúcar (BC), disponibilizados pela fazenda de ensino da UNESP ou adquiridos no comércio local.

A figura 7 apresenta o perfil da influência da fonte de carbono na produção da xilanase para cada fungo. Foi possível observar que os melhores meios para produção desta enzima foram: serragem para *Penicillium sp* 1IP4-A2 (170 U/g ou 17 U/mL), *Aspergillus sp* 1IP2B1 (106,8 U/g ou 10,68 U/mL), *Aspergillus sp* 1IP15B2 (96 U/g ou 9,60 U/mL) e *Aspergillus sp* 1IP8-A1 (95,4 U/g ou 9,54 U/mL), sabugo de milho para os fungos *Aspergillus sp* 1IP2B1 (115,6 U/g ou 11,56 U/mL), *Aspergillus sp* 1IP16-A1 (97,3 U/g ou 9,73 U/mL), *Aspergillus sp* 1IP6B1 (112,2 U/g ou 11,2 U/mL), *Aspergillus sp* 1IP7B1 (86,6 U/g ou 8,66 U/mL). A mistura de farelo de trigo com bagaço de cana açúcar demonstrou ser um bom substrato para produção de xilanase por *Aspergillus sp* 1IP15B2 (95,8 U/g ou 9,58 U/mL). Pode-se concluir que o farelo de trigo pareceu não ser o melhor substrato para a produção de xilanase para fungos analisados.

Figura 7 – Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase pelos fungos: *Penicillium sp* 1IP4-A2 e *Aspergillus sp* 1IP2B1, 1IP6B1, 1IP7B1, 1IP8A1, 1IP15B2 e 1IP16-A1, sob fermentação em estado sólido à 45 °C em 72 horas de cultivo.



Fonte: Dados do próprio autor

A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono, para a produção de xilanase, foi relatada para vários fungos (CHAPLA et al., 2010; FACCHINI et al., 2011; MASUI et al., 2012; MORRETTI et al., 2012). FACCHINI et al (2011) observou a maior produção de xilanase (224.62 U/g) por *Aspergillus japonicus* cultivado em farelo de soja. *Myceliophthora thermophila* M.7.7 (1292.0 U/g) teve sua maior atividade de xilanase em cultivo em bagaço de cana-de-açúcar (MORRETTI et al., 2012), e neste mesmo substrato CHAPLA et al. (2010) verificou a maior atividade de xilanase por *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 (51,88 U/g) enquanto *Humicola brevis var. thermoidea* teve sua melhor produção em casca de amendoim (935.5 U/g) (MASUI et al., 2012).

Alguns autores tem otimizados os meios de cultura para a FES (YANG et al., 2006; MACIEL et al., 2008; BETINI et al., 2009, PAL e KHANUM, 2010. O fungo *Aspergillus niger* DFR-5 apresentou um pico de produção de (1545 U/g) de xilanase em meios contendo uma mistura de farelo de trigo e soja em pó em uma proporção de 7:3 (PAL e KHANUM, 2010). MACIEL et al.,

2008 também observou uma alta produção de xilanase ao cultivar *A. niger* LPB 326 (3099 U/g) em bagaço de cana-de-açúcar misturado com farinha de soja numa proporção de 1.86:1.

YANG et al (2006), descobriram que o fungo *Paecilomyces themophila* J18 apresentou um pico de produção de xilanase de 18.580 U/g quando cultivado em palha de trigo enriquecido com extrato de levedura, como fonte de nitrogênio. Enquanto BETINI et al. (2009) estudando a produção de xilanase, em misturas de substratos 1:1, com sabugo de milho com farelo de trigo, obteve as seguintes atividades máximas para *A. niger* (794.7 U/g), *A. niveus* (652.6 U/g) e *A. ochraceus* (752.6 U/g).

A influência das fontes de carbono sobre a produção de celulasas encontra-se ilustrada nas Figuras 8 e 9. A produção de celulasas pelas linhagens em estudo, apresentou baixa atividade, quando cultivadas em farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho. A inadequação dos substratos lignocelulósicos para produção destas enzimas em fermentação em estado sólido, pode ser devido as características dos mesmos, sendo impróprias para os isolados, como o tamanho das partículas, a geometria e a compacidade do substrato (KRISHNA, 2005). A menor produção de celulasas pelos isolados também pode ser decorrente da utilização de resíduos sem nenhum tipo de pré-tratamento, pois de acordo com Camassola e Dillon (2009) o pré-tratamento permite a diminuição da recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, deixando que os seus componentes fiquem mais acessíveis a ação dos micro-organismos.

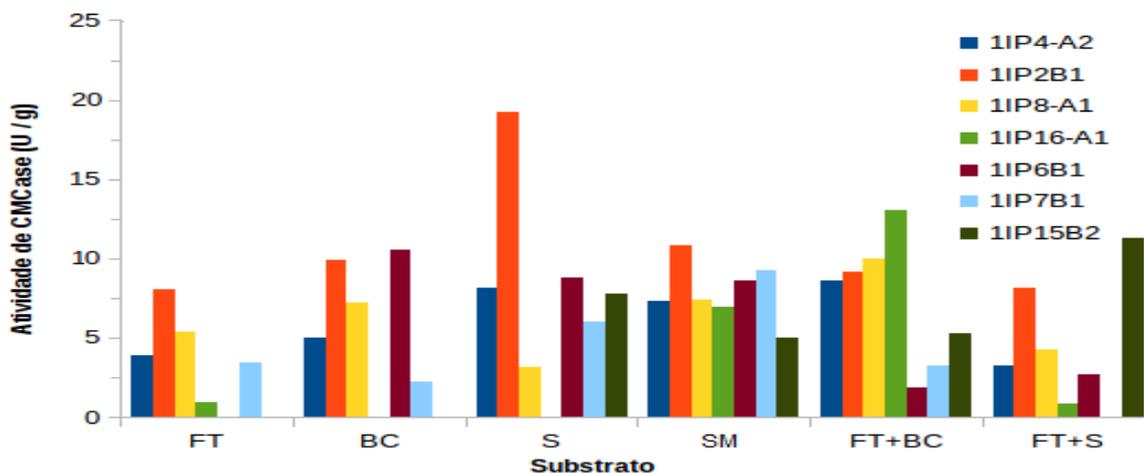
As maiores produções de CMCase foram observadas respectivamente por *Aspergillus sp* 1IP2B1 em serragem (19,2 U/g ou 1,92 U/mL) e por *Aspergillus sp* 1IP16-A1 na mistura de farelo de trigo com bagaço de cana-de-açúcar 1:1 (13 U/g ou 1,30 U/mL).

Os resultados observados na Fig. 8 indicam que não houve produção de CMCase pelos fungos *Aspergillus sp* 1IP6B1 e *Aspergillus sp* 1IP15B2, ao serem cultivados em farelo trigo. O fungo *Aspergillus sp* 1IP15B2 também não produziu CMCase, em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, resultado

semelhante ao obtido por *Aspergillus sp* 1IP16-A1, ao ser cultivado neste mesmo substrato e em serragem. A mistura de farelo de trigo com serragem não indicou ser um bom substrato para produção de CMCCase por *Aspergillus sp* 1IP7B1.

Dados descritos em literatura indicam baixos níveis de produção de CMCCase (MEMBRILLO et al., 2008, BASSO et al., 2010), quando comparado a maior atividade de CMCCase obtida com a linhagem 1IP6B1 (10,5 U/g ou 1,03 U/mL) em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar. MEMBRILLO et al. (2008) estudando o cultivo do fungo *Pleurotus ostreatus IE8* em bagaço de cana-de-açúcar obtiveram atividade CMCCase de 0,18 U/g, enquanto a de *T. reesei* QM 9414, em 15 dias de cultivo utilizando o mesmo substrato, atingiu a produção de 5,4 U/g, de atividade para CMCCase (BASSO et al., 2010). Entretanto, maiores produções de CMCCase foram observadas por CHANDRA et al., (2010) e OBEROI et al., (2008), respectivamente estudando as espécies *T. reesei* QM 9414 (94,13 U/g) em cultivo com farelo de trigo e por *T. reesei* RUT C30 (25,2 U/g) na mistura de farelo de trigo com polpa cítrica. DESWAL et al. (2011) também observaram uma alta produção de CMCCase ao cultivar o fungo *Fomitopsis sp* (71.526 U/g) em farelo de trigo.

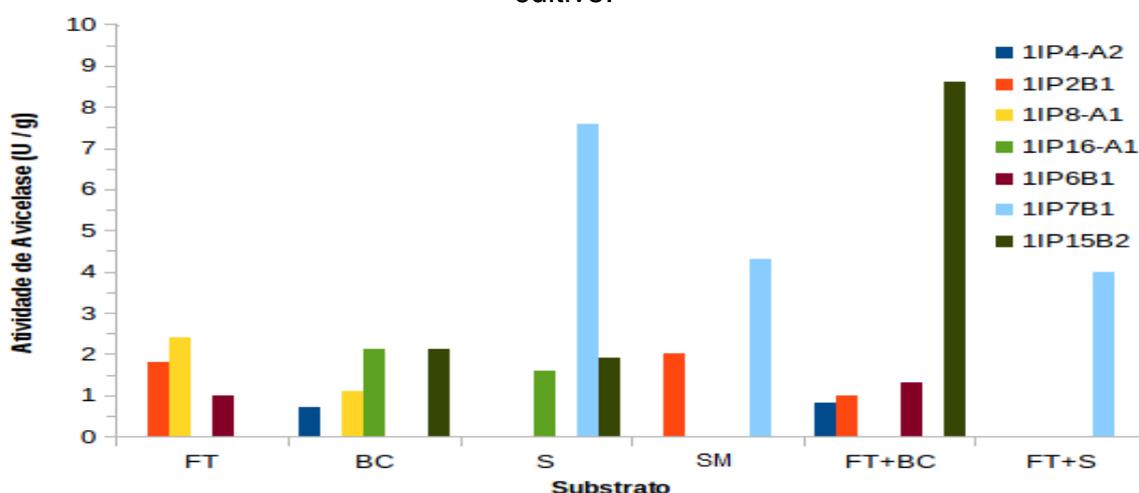
Figura 8 – Efeito da fonte de carbono na produção de CMCase pelos fungos: *Penicillium sp* 1IP4-A2 e *Aspergillus sp* 1IP2B1, 1IP6B1, 1IP7B1, 1IP8A1, 1IP15B2 e 1IP16-A1, sob fermentação em estado sólido à 45 °C em 72 horas de cultivo.



Fonte: Dados do próprio autor

Poucos isolados demonstram ter potencial para produção avicelase, nos substratos utilizados em estudo, destacando-se os fungos *Aspergillus sp* 1IP15B2 (8,6 U/g ou 0,86 U/mL) na mistura de farelo de trigo com bagaço de cana-de-açúcar e o *Aspergillus sp* 1IP7B1 (7,6 U/g ou 0,76 U/mL) em serragem (Fig. 9).

Figura 9- Efeito da fonte de carbono na produção de avicelase pelos fungos: *Penicillium sp* 1IP4-A2 e *Aspergillus sp* 1IP2B1, 1IP6B1, 1IP7B1, 1IP8A1, 1IP15B2 e 1IP16-A1, sob fermentação em estado sólido à 45 °C em 72 horas de cultivo.



Fonte: Dados do próprio autor

Dados descritos em literatura indicam baixos níveis de produção de avicelase (JATINDER et al., 2006), quando comparados as maiores atividades de avicelase obtidas pelos fungos *Aspergillus sp* 1IP8-A1 em farelo de trigo (2,4 U/g ou 0,24 U/mL), *Aspergillus sp* 1IP16-A1 em bagaço de cana-de-açúcar (2,1 U/g ou 0,21 U/mL) e *Aspergillus sp* 1IP7B1 em sabugo de milho (4,3 U/g ou 0,43 U/mL) e 1IP7B1 em serragem (7,6 U/g ou 0,76 U/mL). JATINDER et al. (2006) ao estudar avicelase por *Melanocarpus sp. MTCC 3922* em diferentes substratos obteve a atividade avicelase de 0,54 U/g, 0,20 U/g, 0,13 U/g e 0,07 U/g quando cultivado em farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e serragem, respectivamente.

Os fungos *Aspergillus sp* 1IP2B1, *Penicillium sp* 1IP4-A2, *Aspergillus sp* 1IP6B1, *Aspergillus sp* 1IP7B1, *Aspergillus sp* 1IP15B2, *Aspergillus sp* 1IP16-A1 nos diferentes tipos de substrato apresentaram uma boa produtividade de enzimas, estimulando o estudo o perfil de produção ao longo tempo dos mesmos. Destacando-se a importância de estudos futuros para um melhor conhecimento sobre a biodiversidade e o uso de outros resíduos agroindustriais, para verificar um melhor potencial enzimático de tais fungos.

5.3 Perfil de Produção das Enzimas

Os fungos selecionados, foram analisados quanto a produção das enzimas xilanase, CMCase e avicelase ao longo do tempo de cultivo, nos substratos que apresentaram maior potencial de produção enzimática no ensaio anterior e em farelo trigo. Segundo Rao et al. (2008b) vários fatores influenciam no metabolismo da fermentação incluindo-se o pH, temperatura de incubação, aeração, agitação, fontes de carbono e nitrogênio, inóculo inicial e o tempo de incubação. Para que um processo biotecnológico seja viável economicamente, este último fator deve ser estudado. Assim em intervalos de 24 horas foram retirados frascos Erlenmeyers com crescimento microbiano

para obtenção da solução enzimática e posterior determinação das atividades enzimáticas e teor de proteína (Apêndice B).

Os fungos *Aspergillus sp* 1IP2B1 (Fig. 10), *Aspergillus sp* 1IP6B1 (Fig. 11a), *Aspergillus sp* 1IP7B1 (Fig. 11b) e *Aspergillus sp* IP16A1 (Fig.11c) foram cultivados utilizando os substratos farelo de trigo e sabugo de milho.

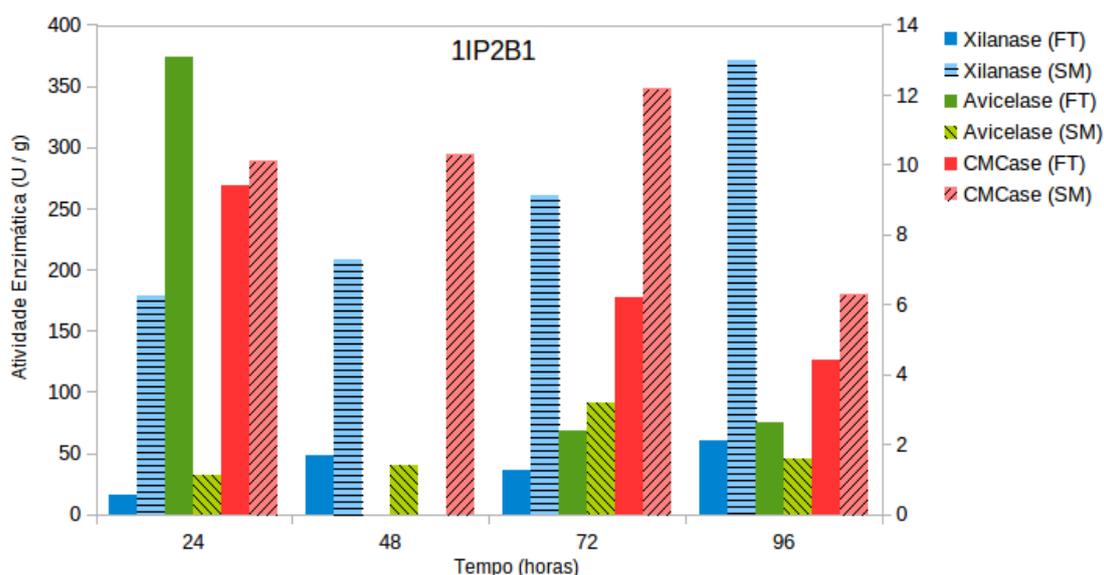
Aspergillus sp 1IP2B1 (Fig. 10) se destacou quanto à produção de xilanase, alcançando atividade de 370 U/g (37,0 U m/l) em 96 horas de cultivo, utilizando sabugo de milho como substrato. Chapla et. al., 2010 utilizou o mesmo substrato para *Aspergillus foetidus* MTCC 4898, e obteve na produção de xilanase, de 377,51 U/g em 96 horas de fermentação em estado sólido. Pode-se observar também que o pico de atividade xilanase, foi no mesmo tempo que o relatado por Chapla et al., (2010). O pico de atividade CMCase foi em 72 horas de cultivo sendo de 12 U/g (1,2 U m/L) e para avicelase foi de 3,20 U/g de substrato. BADHAN et al., (2007) observou a produção de CMCase de 11,38 U/g pelo fungo termofílico *Myceliophthora sp* IMI 387099, em presença de sabugo de milho, sob fermentação sólida a 45 °C resultado este próximo ao obtido com o fungo *Aspergillus sp* 1IP6B1.

Quando cultivado em farelo de trigo, o *Aspergillus sp* 1IP2B1 (Fig. 10) obteve a máxima atividade de xilanase, CMCase e avicelase de 60,5 U/g (6,05 U m/l), em 96 horas de cultivo, de 9,4 U/g (0,94 U m/l), em 48 horas e de 13,1 U/g (1,31 U/mL), em 24 horas, respectivamente.

De forma geral, o farelo de trigo não foi um bom indutor para essas enzimas, nessas condições de estudo. Leite et al. (2007) estudando a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Aureobasidium pulluans* obteve as maiores atividades CMCase e xilanase de 1,05 U/mL e 5,0 U/mL em 96 horas de cultivo sob fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como fonte de carbono. De forma contrária a esses dados, SONI et al. (2010) avaliaram a atividade de xilanase em FES usando o farelo de trigo e obtiveram 1722,0 U/g pelo fungo *A. fumigatus*. Estudando a produção de CMCase por *Thermoascus aurantiacus* IMI 216529, Kalogeris et al. (2003) obtiveram

atividades de 433,0 U/g e 18 U/g de substrato quando cultivado em farelo de trigo e sabugo de milho sob fermentação em estado sólido.

Figura 10 - Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCCase (U/g de substrato) do fungo *Aspergillus sp* 1IP2B1, cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e sabugo de milho como substrato, à 45 °C.



Fonte: Dados do próprio autor

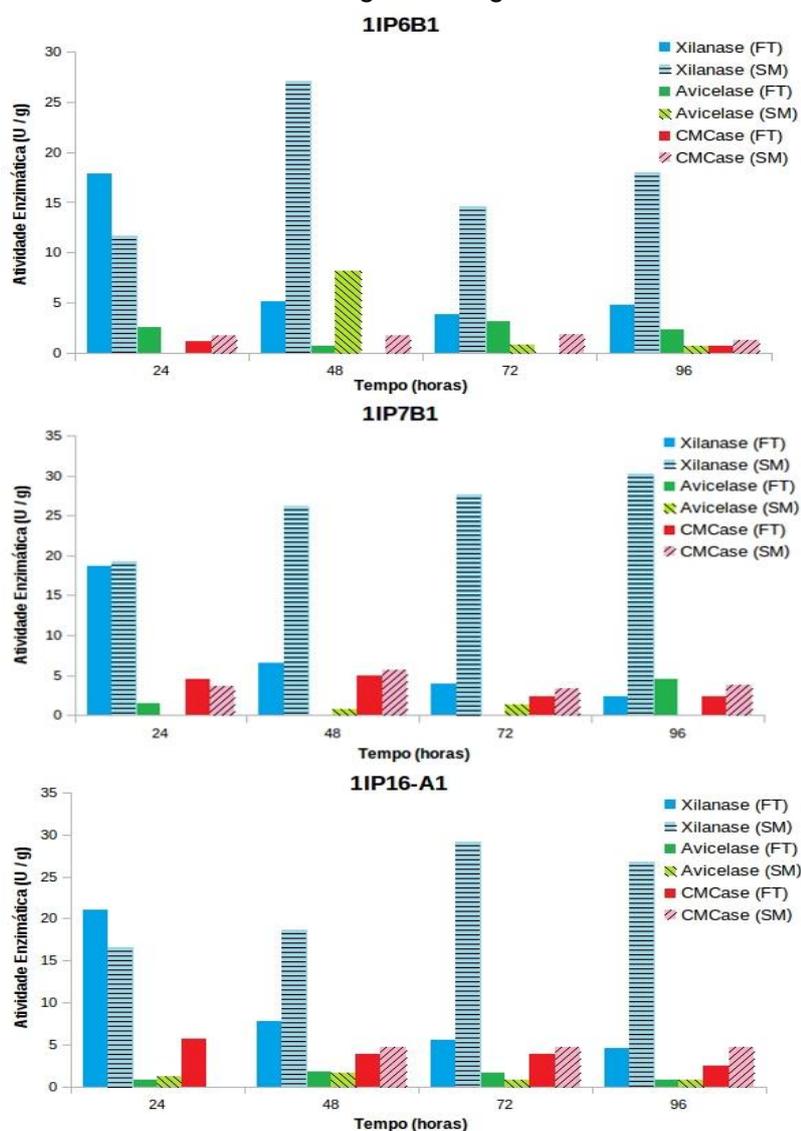
O fungo *Aspergillus sp* 1IP6B1 (Fig. 11a), apresentou as máximas atividades de xilanase, CMCCase e avicelase (27,1 U/g; 8,2 U/g e 1,9 U/g) respectivamente, em 48 horas, 48 horas e 72 horas de cultivo em sabugo de milho. Para os fungos *Aspergillus sp* 1IP7B1 (Fig. 11b) e *Aspergillus sp* 1IP16 A1 (Fig. 11c) observou-se um pico de produção de xilanase de 30,2 U/g (3,02 U/mL) em 96 horas e 29,2 (2,92 U/mL) em 72 horas de cultivo utilizando o sabugo de milho, respectivamente.

Quando cultivados em farelo de trigo, os fungos *Aspergillus sp* 1IP6B1, *Aspergillus sp* 1IP7B1 e *Aspergillus sp* 1IP16-A1 apresentaram perfil de produção de xilanase semelhantes, com máxima produção em 24 horas e decréscimo ao longo do período de fermentação. A atividade CMCCase foi de 5,7 U/g e 4,7 U/g de substrato, por *Aspergillus sp* 1IP7B1 e

Aspergillus sp 1IP16-A1 em 48 horas de cultivo, em sabugo de milho. A atividade avicelase foi baixa para esses isolados (Fig. 11b e 11c).

Dessa forma, as atividades enzimáticas apresentadas por *Aspergillus sp* 1IP2B1 foi superior às apresentada pelos fungos *Aspergillus sp* 1IP6B1, 1IP7B1 e 1IP16-A1 nas mesmas condições de cultivo. Somente a produção de CMCCase foi superior em substrato farelo de trigo pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP6B1.

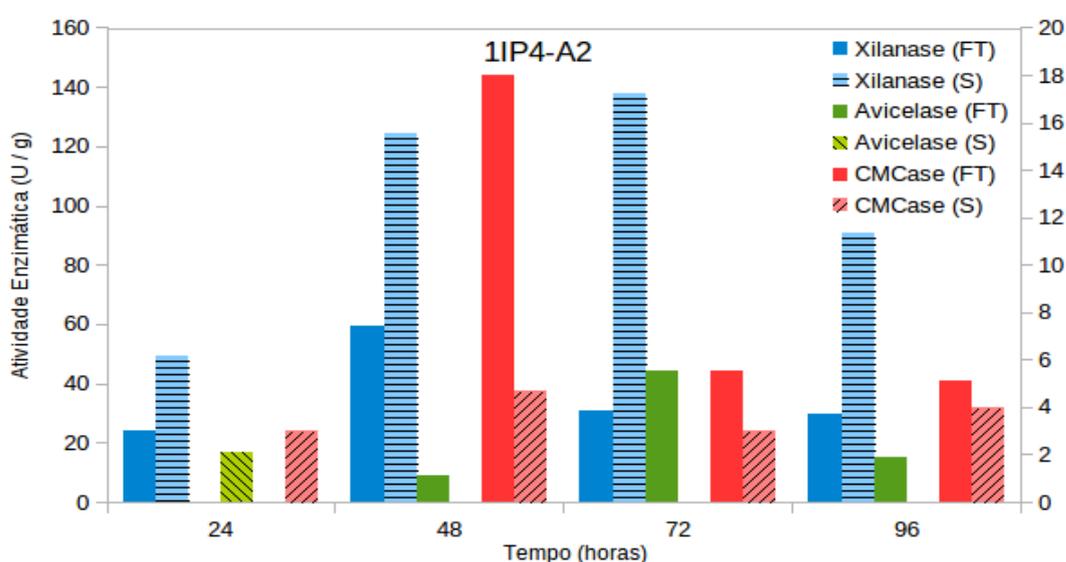
Figura 11 - Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCCase (U/g de substrato) dos fungos *Aspergillus sp* 1IP6B1, 1IP7B1 e 1IP16-A1, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e sabugo de milho como substrato, à 45 °C.



Fonte: Dados do próprio autor

O fungo *Penicillium sp* 11P4-A2 (Fig. 12) apresentou uma maior produção de xilanase no substrato serragem onde a atividade foi de 138,0 U/g (13,80 U/mL) em 72 horas de fermentação. JATINDER et al., 2006b observaram uma menor produtividade de xilanase 3,02 U/g, por *S. thermophilum* em presença de serragem, sob fermentação sólida a 45 °C.

Figura 12 – Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCase (U/g de substrato) do fungo *Penicillium sp* 11P4-A2, cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e serragem como substrato, à 45 °C.



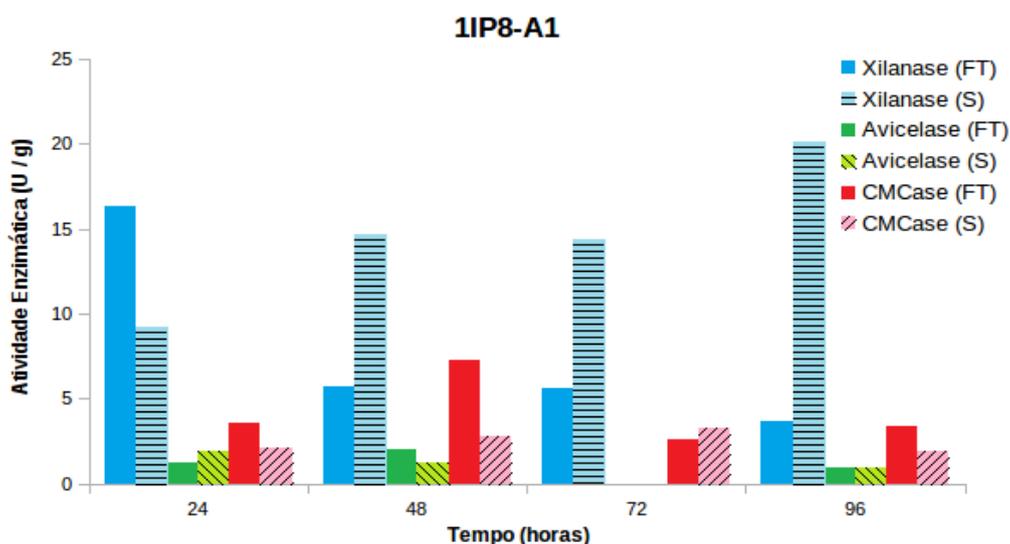
Fonte: Dados do próprio autor

A atividade máxima para CMCase foi 18,0 U/g (1,80 U/mL) em 48 horas de cultivo em substrato farelo de trigo (Fig. 12). Esse último dado de atividade foi superior aos relatados para *A. niger*, após 72 horas cultivo, na qual a atividade CMCase foi 1,77 U/g e 1,2 U/g quando cultivados em farelo de trigo e serragem, respectivamente, sob fermentação em estado sólido (MRUDULA e MURUGAMMAL 2011). Pode se observar que *Penicillium sp* 11P4-A2, assim como os demais selecionados apresentaram baixas atividades para avicelase, sendo atingido o valor 5,5 U/g (0,55 U m/l) em farelo de trigo a 72 horas de fermentação. DaSILVA et al. (2005) observaram valores mais elevados quanto comparados aos desse estudo, para o cultivo de *Thermoascus aranticus* em farelo de trigo e sabugo de milho, encontrando os valores de atividade de

avicelase de 1,50 U/mL e 0,86 U/mL, respectivamente em um período de 120 horas de fermentação em estado sólido.

O fungo *Aspergillus sp* 1IP8-A1 (Fig. 13) também foi cultivado utilizando farelo de trigo e serragem como fontes de carbono. A atividade xilanase foi menor para esse isolado, apresentando um perfil de produção semelhante às demais fungos estudados, com maior atividade xilanase em 96 horas de cultivo com a serragem (20,1 U/g) e maior atividade em 24 horas com o farelo de trigo (16,3 U/g).

Figura 13 - Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCase (U/g de substrato) do fungo *Aspergillus sp* 1IP8-A1, cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e serragem como substrato, à 45 °C.

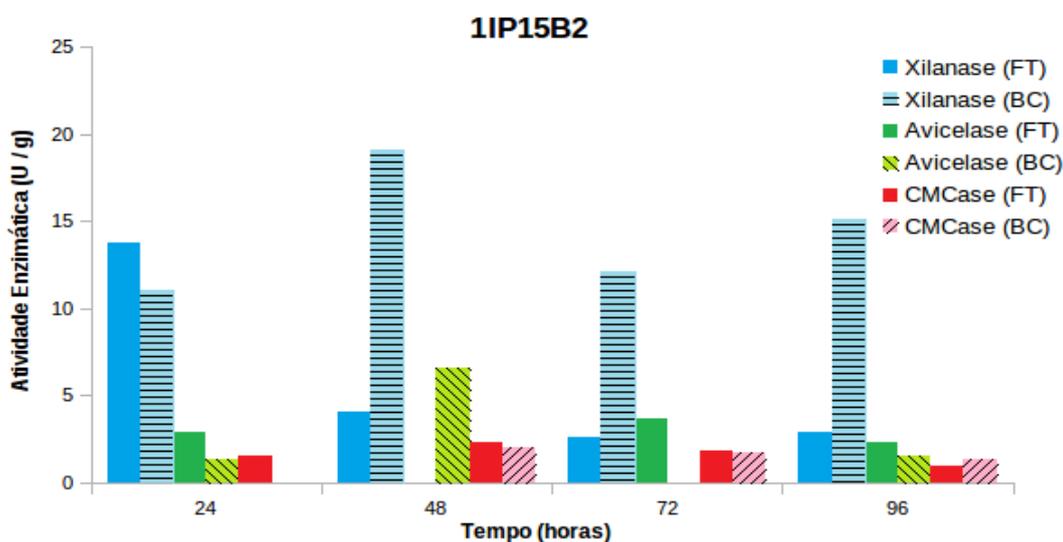


Fonte: Dados do próprio autor

O fungo *Aspergillus sp* 1IP15B2 apresentou maior atividade xilanase quando cultivado em farelo em 24 horas de cultivo (13,8 U/g; Fig.14), quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar a maior atividade foi obtida em 48 horas de cultivo (19,1 U/g; Fig. 13). As atividades CMCase e avicelase foram maiores no tempo de 48 horas de cultivo em bagaço de cana-de-açúcar, sendo de 2,0 U/g e 6,60 U/g de substrato, respectivamente (Fig. 14). A atividade máxima de xilanase produzida por *Thermoascus aurantiacus* quando cultivado em reator usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono

foi de 1597 U/g em 10 dias de cultivo á 45 °C (MILAGRES et al., 2004). A produção de xilanase por *Melanocarpus albomyces* em cultivo sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar como substrato foi de 756,0 U/g e 667,0 U/g de substrato, respectivamente (JAIN, 1995).

Figura 14 - Perfil de produção de xilanase, avicelase e CMCase (U/g de substrato) do fungo *Aspergillus sp* 1IP15B2, cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar como substrato, à 45 °C.



Fonte: Dados do próprio autor

Pode-se observar que o farelo de trigo produz as maiores atividades de xilanase em 24 horas de cultivo. Em função desse curto tempo de produção enzimática, pode-se trabalhar, buscando as melhores condições de cultivo para o cultivo com farelo de trigo e uma melhor atividade enzimática, utilizando os fungos selecionados.

A diminuição na atividade enzimática, principalmente para a atividade xilanase, nesse estudo, pode estar relacionada a alterações no metabolismo do fungo durante o crescimento contínuo e juntamente com a limitação do teor de nutrientes que poderiam resultar em morte celular e, posteriormente, a desnaturação de enzimas e redução da atividade das enzimas (BON et al., 2008). O aumento de atividade enzimática ao final das fermentações

pode estar correlacionado a vários fatores, por exemplo, temos a produção de novas enzimas ou a queda de atividade da enzima inibidora (TAVARES et al., 2012)

5.4 Caracterização da Xilanase

A xilanase bruta produzida por *Aspergillus sp* 1IP2B1, *Penicillium sp* 1IP4-A2, *Aspergillus sp* 1IP8-A1, *Aspergillus sp* 1IP15B2 e *Aspergillus sp* 1IP16-A1 foram caracterizadas quanto ao pH ótimo de ação da enzima e quanto a temperatura ótima e de estabilidade. Por apresentar alta atividade xilanase, em ambos os substratos cultivados as xilanases produzidas pelos fungos *Aspergillus sp* 1IP2B1 e *Penicillium sp* 1IP4-A2, foram caracterizadas, utilizando as duas soluções enzimáticas, com maior atividade. Para os fungos *Aspergillus sp* 1IP8-A1, *Aspergillus sp* 1IP15B2 e *Aspergillus sp* 1IP16-A1 foi utilizada a solução enzimática que apresentou maior atividade enzimática. Os dados resultantes da caracterização estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização das xilanases produzidas pelas linhagens selecionadas.

Linhagens	Fonte de Carbono	Tempo de fermentação (horas)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Estabilidade térmica (°C)
1IP2B1	Farelo de Trigo	24	5,5	65	55
1IP2B1	Sabugo de Milho	96	5,5	55	55 com 80% atividade
1IP4-A2	Farelo de Trigo	24	5,5	60	50
1IP4-A2	Serragem	48	5,5	45	55
1IP8-A1	Farelo de Trigo	24	5,5	60	50
1IP15B2	Bagaço cana-de-açúcar	48	5,0	55	60 com 50% de atividade
1IP16-A1	Sabugo de Milho	72	5,0	60	55 com 70% de atividade

Fonte: Dados do próprio autor

O pH ótimo da maioria das xilanases ficou em pH 5,5 e pH 5,0, o que é característico das enzimas de origem fúngica. A estabilidade térmica ficou na

média até 55 °C. A temperatura ótima apresentou variação significativa entre os fungos e seu meio de cultivo. Para o fungo *Penicillium sp* 1IP4-A2 a xilanase produzida em farelo de trigo apresenta uma ação à temperatura maior (60 °C) que quando produzida em serragem (45 °C). A temperatura ótima para a xilanase produzida pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP2B1 em cultivo com farelo de trigo (65 °C) foi maior que do cultivo em sabugo de milho (55 °C). Na literatura encontram-se algumas espécies com temperatura ótima elevada em 75 °C como *A. fumigatus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus aurantiacus* e estabilidade térmica em média a 55 °C, como observado no presente estudo (Tabela 8).

Tabela 8 - Características de algumas xilanases produzidas por fungo.

Micro-organismos	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Estabilidade térmica (°C)	Referência
<i>Aspergillus caespitosus</i>	5,5-6,5	50 -55	55	SANDRIM et al., 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	4,0	70	45	ANG et al., 2013
<i>Aspergillus niger</i>	5,5 – 6,0	65	55	BENETI et al., 2009
<i>Aspergillus niveus</i>	5,0 - 5,5	55 – 65	55	BENETI et al., 2009
<i>Aspergillus ochraceus</i>	5,0	65	55	BENETI et al., 2009
<i>Aspergillus sydowii</i> SBS 45	10,0	50	30 em 40 mantem 94,2% da atividade.	NAIR et al., 2008
<i>Chaetomium thermophile</i> NIBGE	6,5	70	50	LAFIT et al., 2006
<i>Penicillium citrinum</i>	3,6	50	50 com 65% da atividade	DUTTA et al., 2007
<i>Penicillium expansum</i>	5,5	40	20-40	QUERIDO et al., 2006
<i>Penicillium sp</i>	5,0	50	---	MURTHY and NAIDU 2010
<i>Talaromyces thermophilus</i>	7,0	75-80	75	MAALEJ et al., 2009
<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756	5,0	75	70 com 80% da atividade	OLIVEIRA et al., 2010
<i>Thermomyces lanuginosus</i> SS-8	5,5 – 6,0	60		SHRIVASTAVA et al., 2011
<i>Trichoderma reesei</i> SAF3	5,0	50	-	KAR et al., 2013;

Fonte: Dados do próprio autor

Quanto ao pH ótimo dos fungos em estudo foram obtidos valores de pH 5,0 e pH 5,5. Na literatura em geral esse é o pH ótimo da maioria das xilanases estudadas. No entanto há micro-organismos como *Talaromyces thermophilus* com pH 7,0 e *Aspergillus sydowii* SBS 45 com pH 10,0.

6 CONCLUSÕES

A área de Cerrado em estudo favoreceu o isolamento de diferentes linhagens fúngicas, permitindo até o momento a seleção de sete fungos com crescimento à 45 °C. Os fungos selecionados demonstraram potencial para a produção de xilanase.

Verificou-se que o potencial de produção enzimática dos fungos foi influenciado pela fonte de carbono. Observou-se também que os fungos tiveram a maior indução para a produção de xilanase, nos substratos utilizados. O fungo *Aspergillus sp* 1IP2B1 apresentou maior atividade xilanase 370 U/g de substrato, sob fermentação em estado sólido, utilizando sabugo de milho como substrato. As atividades de CMCase e avicelase foram 12,2 U/g e 3,20 U/g de substrato, nas mesmas condições de cultivo.

As xilanasas apresentaram pH ótimo em 5,5 e estabilidade térmica em até 55 °C e a temperatura ótima de 55 °C pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP2B1 quando cultivado em sabugo de milho e de 65 °C em farelo de trigo. Assim, houve diferenças com a mudança do meio fermentativo.

Estes resultados indicam a viabilidade da incorporação de fontes de carbono tais como farelo de trigo, serragem, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, no meio, para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas e, estimulam a continuação de novos estudos com as linhagens selecionadas, visando melhores condições de ensaio, como a utilização de novos substratos e tempo de cultivo.

Para o fungo *Aspergillus sp* 1IP2B1 em estudos futuros, propõe-se avaliar o potencial de hidrolise enzimática, visando à produção enzimática através de sabugo de milho, buscando entender a influência de alguns fatores no rendimento da fermentação, como temperatura e pH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M. G.; GHULEB, J. E.; SINGHB, R.; SHAIKHB, H. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 6-10, 2005.

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C.G.M.S.; PERALTA. R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. **Food Science and Technology**, v.2, p. 364-368, 2007.

ALI, S.; HOSSAIN, Z. Characteristics for glucoamylase from *Aspergillus terreus*. **Journal Applied Bacteriology**, v. 71, p. 144-146, 1991.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J. E SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes **Process Biochemistry**, v. 33, n.1, p. 21-28, 1998.

ALMEIDA, M. N. **Celulases e hemicelulases de espécies de *Acremonium* endofíticos**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/Minas Gerais, 2009.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ANDRADE, S.V.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A. Effect of carbon source on the biochemical properties of β -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry** v. 39, p. 1931-1938, 2004

BADHAN, A. K.; CHADHA, B.S.; KAUR, J; SAINI, H.S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099. **Bioresource Technology** v. 98, p.504–510, 2007.

BASSO, T.P.; GALLO, CR.; BASSO LC. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.11, p.1282-1289, 2010.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications. **Microbiology Biotechnology** v. 56, p.326 –338, 2001.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, Netherlands, v. 13, p. 25 - 58, 1994.

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

BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, E. S. C.; JORGE, J.A.; TERENCEZ, E.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**. v.32, p.819–824, 2009.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, p. 583 - 620, 1997.

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

BISWAS, R.; SAHAI, V.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Bioprocess strategies for enhanced production of xylanase by *Melanocarpus albomyces* IITD3A on agro-residual extract. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.110, n. 6, p.702-8, 2010.

BON, et al. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: **Editores Interciência**, p. 506, 2008b.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. &

COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 241-271, 2008a.

BRIENZO, M.; MONTE, J.R., MILAGRES, A. M. F. Induction of cellulase and hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* by xylan hydrolyzed products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v. 28, p.113–119, 2012.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-185, 2001.

BUSELLI, R.A.F, OTONI, W.C, JOSH, C.P Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.1, p. 1-13, 2007.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of celulasas and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Productcs**. v.29, p.642-647, 2009.

CARVALHO, R. V.; CORRÊA T. L. R.; SILVA, J.C.M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n.2, p. 380-386, 2008.

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

CAVACO-PAULO, A. Mechanism of cellulase action in textile processes. 1998. Review: **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 273–277, 1998.

CHAMPAGNE, P.; LI, C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal waste water treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. **Bioresource Technology**, v.100, n.23, p.5700-5706, 2009.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R.S.. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. **Biomass and Bioenergy**. v.34, n.5, p.805-811, 2010.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Utilization of agroindustrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 361–369, 2010.

CHAVEZ, R.; BULL, P. e EYZAGUIRRE, J. The Xylanolytic Enzyme System from the Genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n.4, p.413-433, 2006.

CHEN, Y.P.; HWANG, I.E.; LIN, C.J.; WANG, H.J.; TSENG, C.P. Enhancing the stability of xylanase from *Cellulomonas fimi* by cell-surface display on *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**. v.112, n.3, p.455-463, 2012.

CHENG-YU, C.; ZHI-SHEN H.; JATUPORN, C.; CHAO-HSUN Y., MENGHSIAO M.; A 24.7-kDa copper-containing oxidase, secreted by *Thermobifida fusca*, significantly increasing the xylanase/cellulase-catalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse. **Appl Microbiology Biotechnology** v. 97, p.8977–8986, 2013.

CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIC, M. Determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during pretreatment of different biomass sources. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. v.1, n.4, p.1168-1178, 2012.

CORDEIRO, C. A.M.; MARTINS, M.L.L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus sp.* e algumas de suas propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.29, n.1, p.135-141, 2009.

COUGHLAN, M. P.; The Properties of Fungal and Bacterial Cellulases with Comment on their Production and Application. Reviews: **Biotechnology and Genetic Engineering**, v. 3, n.1, p.39-110, 2013.

DAMIANO, V. B., BOCCHINI, D. A., GOMES, E.; DA SILVA, R. Applications of crude xylanase from *Bacillus licheniformis* 77-2 to the bleaching of eucalyptus kraft pulp," **World Journal Microbiology Biotechnology**. v.19, p.139-144, 2003.

DAS, A., GHOSH, U. Solid state fermentation of waste cabbage by *Penicillium notatum* NCIM NO-923 for production and characterization of cellulases. **Journal of Scientific and Industrial Research** v.68, p. 714–718, 2009.

DASHTBAN, M.; SCHARAFT, H.; WENSHENG, Q. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DASILVA, R.; FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 31, p. 249 - 260, 1997.

DASILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miehe, Brazilian **Journal Microbiology** v. 36, p. 235-241, 2005.

DaVINHA, F.N.M.; GRAVINA-OLIVEIRA, M.P.; FRANCO, M.N.; MACRAE, A.; BON, E.P.D.; NASCIMENTO, R.P.; COELHO, R.R.R. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 Using Lignocellulosic Biomass as Inducer Substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.164, n.3, p.256-267, 2011.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology** v.102, p.6065–6072, 2011.

DHIMAN, S. S., SHARMA, J., BATTANA, B Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. **BioResources** v.3, n.4, p.1377-140, 2008.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; OLSSON, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**, v.110, p.480-487, 2012.

DUARTE, M. C., SILVA, E. C. D., GOMES, I. M. D. B., PONEZI, A. N., PORTUGAL, E. P., VINCENTE, J. R., and DAVANZO, E. Xylan-hydrolyzing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* pulp for pulp bleaching improvement. **Bioresource Technology** v.88, p.9-15, 2003.

DURIGAN, G.; MELO, A.C.G.; MAX, J.C.M.; BOAS, O.V.;CONTIERI, W.A; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3ª Edição Revisada e Atualizada – Março 2011.

DUTTA, T.; SENGUPTA, R.; SAHOO, R.; SINHA, R. S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. A novel cellulase-free alkaliphilic xylanase from alkalitolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. **Letter Applied of Microbiology**, v.44, p.206–211, 2007.

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TERENCEI, H. F., REIS, R. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. **Bioprocess Biosystem Engineering** v.34, p.347–355, 2011.

FAEZIZADEH, Z.; GHARIB, A.; Isolation and purification of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 12980) and its hydrolysis effect on birch wood and oat spelts xylan. **Clinical Biochemistry**, v.44, n.13, p.S245-S246, 2011.

FANG, H. E XIA, L. High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. **Bioresource Technology**, v.144, n.5, p.693, 2013.

GAFFNEY, M., DOYLE, S., MURPHY, R., Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. **Bioscienci Biotechnology Biochemistry**. v.73, p. 2640–2644, 2009.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 618-628, 2002.

GHOSH, A.; CHATTERJEE, B.; DAS, A. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 162-169, 1991.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. 2006. 90f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; Emptage, M. Bioethanol Current Opinion in **Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GUIMARÃES, N. C. A.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F.F.; MARQUES, M. R., POLIZELI, M. L. T. M.; GIANNESI, G. C.; Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. **SpringerPlus** v. 2, p.380, 2013

HALTRICH, D. ; NIDETZKY, B. ; KULBE, K.D. ; STEINER, W. ; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137–161, 1996.

HAMMEL KE. Fungal degradation of lignin. In: Plant litter quality and decomposition. **CAB-International**, p. 33–46, 1997.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**. v. 48, p. 422-427, 1972.

HU, H. L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B. S.; WOSTEN, H. A. B.; GU, J. B.; DE VRIES, R. P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, p.248-252, 2011.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; BUT, H. ; AFROZ, A.; IKRAM, N.; RASHID, U. The industrial applicability of purified cellulase complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-Industrial and municipal paper wastes. **Bioresources**, v.8, n.1, p.145-157, 2013.

I-SON, N.; WEI, C.; SHUANG-PI, C.; JIUN-LY, C.; TING, C. P., CHII-GONG, T.; SU-MAY, Y.; TUAN-HUA, D.; High-level production of a thermoacidophilic beta-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v.101, p.1310–131, 2010.

JAIN, A. Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68. **Process Biochemistry**. v. 30, n. 8, p. 705-709, 1995.

JATINDER, K.; CHADHA, B.S.; SAINI, H.S Optimization of culture conditions for production of cellulases and xylanases by *Scytalidium thermophilum* using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p.169-176, 2006b.

JATINDER, K.; CHADHA., B.S.; SAINI. H. H. Optimization of medium components for production of cellulases by *Melanocarpus sp.* MTCC 3922 under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p. 15–22, 2006.

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

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS D. MACRIS, B.J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 7, p. 1099–1104, 2003.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in Solid State Fermentation. **International Journal of Microbiology**. v. 2012, p.1-8, 2012.

KAMRA, P.; SATYANARAYANA, T.; Xylanase production by the thermophilic mold *Humicola lanuginosa* in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.119, n.2, p.145-157, 2004.

KAR, S.; GAURI, S. S.; DAS, A.; JANA, A.; MAITY, C.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K.; BISKASH, R. P.; 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 Biosystem Engineering**, v.36, p.57–68, 2013.

KASANA, R. C. et al. A Rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S. E TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector. Review: **Bioresource Technology**, v. 77, n.2, p. 215-227, 2001.

KILIKIAN, B. V. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 10-12, 1996.

KIM, Y.A., YOON, K-H. Characterization of a *Paenibacillus woosongensis* β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase produced by recombinante *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.12, p.1711–1716, 2010.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A Conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**. v.1, n.1, p.147-154, 2005.

KRISHNA, C.; Solid state fermentation systems-an overview. **Reviews Biotechnology** v. 25, p.1–30, 2005.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, London, v. 2011, p. 1-10, 2011.

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

KUMAR, K.S.; MANIMARAN, A.; PERMAUL, K. ; SINGH, S. Production of β -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, n.5, p.494-498, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377–391, 2008.

LATIF, F., M. ASGHER, R. SALEEM, A. AKREM AND R.L. LEGGE. Purification and characterization of a xylanase produced by *Chaetomium thermophile* NIBGE. **World Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.45-50, 2006.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SIIVA, D.; GOMES, E.; DaSILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans*

on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.736-740, p. 281-288, 2007.

LEITE, R.S.R.; ALVES-PRADO, H.F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F.C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidase produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme Microbial Technology**, v. 43, p.391-395, 2008.

LIMAYEM A., RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**. v 38. P. 449- 467, 2012.

LYNCH, J.M., SLATER, J.H., BENNETT, J.A.; HARPER, S.H.T. Cellulase activities of some aerobic micro-organisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology**, v. 127, p.231-236, 1981.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.; Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 506–57, 2002.

MAALEJ, I; BELHAJ, I.; FOURATI, N.; MASMOUDI-BELGHITH, H. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.158, p.200–212, 2009.

MACIEL, G.M.; VANDENBERGHE, L.P.S.; HAMINIUK, C.W.I.; FENDRICH, R.C.; B.E.D. BIANCA, B.E.D. ; BRANDALIZE, T.Q.S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs. **Food Technology Biotechnology** v.46, n.2,p.183–189, 2008.

MAIJALA, P.; KANGO, N.; SZIJARTO, N.; VIKARI, L.; Characterization of hemicellulases from thermophilic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 101, p.905–917, 2012.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review. **Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, p. 105-114, 2003.

MANDALARI, G.; BISIGNANO, G.; LO CURTO, R.B.; WALDRON, K.W.; FAULDS, C.B. Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresource Technology**, v.99, n.11, p.5130-5133, 2008.

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. **Cellulose, Dordrecht, Netherlands**, v. 10, p. 159 – 69, 2003.

MARTÍNEZ, A.T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M.J.; GUTIÉRREZ, A.; RÍO, J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p.195-204, 2005.

MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v.99, p.1417-1424, 2008.

MASUI, D. C.; ZIMBARDI, A.L.R.L.; SOUZA, F.H.M.; GUIMARÃES, L. H. S.; FURRIEL, R. P.M.; JORGE, J. A. Production of a xylose-stimulated b-glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2689–2701, 2012.

MATTÉOTTI, C., HAUBRUGE, E., THONART, P., FRANCIS, F., PAUW, E. DE, PORTETELLE, D., VANDENBOL, M. Characterization of a new β -glucosidase/ β -xylosidase from the gut microbiota of the termite (*Reticulitermes santonensis*). **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, p.147-157, 2011.

MAURYA, D.P.; SINGH, D.; PRATAP, D.; MAURYA, J.P.; Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of Environmental Biology**, v.33, p.5-8, 2012.

MAYRINK. M.I.C.B. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das Celulases na sacarificação da celulose**. 2010, Tese de Doutorado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MCCLENDON, S. D.; BATH, T. ; PETZOLD, C. J. ; ADAMS, P. D.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, p.54, 2012.

MEMBRILLO, I., SANCHEZ, C., MENESES, M., FAVELA, E., LOERA, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology** v.99, p.7842–7847, 2008.

MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I.C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**. v. 39, n.11, p.1387–1391, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORETTI, M. M.S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; DASILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L.D.; GOMES, E.; Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.1062-1071, 2012

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using corn waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology** v.42, p.1119-1127, 2011.

MURTHY, P.S., NAIDU, M.M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food Bio-process Technology** v.5, p.657-664, 2010.

NAIR, S.G.; SINDHU, R.; SHANKAR, S. Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS45. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.149, p.229-243, 2008.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G.; Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 655-670, 2003.

NIGAM, P.; SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute: A review. **Process Biochemistry**, v.30, p.117-124, 1995.

OAKLEY, A. J., HEINRICH, T., THOMPSON, C. A.; WILCE, M. C. Characterization of family 11 xylanase from *Bacillus subtilis* B230 used for bleaching. **Biological Crystallography**, v.59, P.627-636, 2003.

OBEROI, H.S.; BANSAL, S.; DHILLON, G.S. Enhanced β -galactosidase production by supplementing whey with cauliflower waste. **International Journal of Food Science and Technology**, V.43, N.8, P.1499-1504, 2008.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F.S. Hidrólise Enzimática De Biomassa. **Química Nova**. v. 33, n.7, p. 1549-1558, 2010.

ÖGEL, Z. B.; YARANGÜMELI, K.; DÜNDAR, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanases production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 689-695, 2001.

OLIVEIRA, D.S.; MEHERB-DINI, C.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E.; Da-SILVA, R. Production of crude xylanase from *Thermoascus Aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. **Journal of Food Science**, v.75, n.7, p. C588-C594, 2010.

OLSON, D.G.; TRIPATHI, S.A.; GIANNONE, R.J.; LO, J.; CAIAZZA, N.C.; HOGSETT, D.A.; HETTICH, R.L.; GUSS, A.M.; DUBROVSKY, G.; LYND, L.R.; Deletion of the Cel48S cellulase from *Clostridium thermocellum*. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of Ame**, v.107, n.41, p.17727-17732, 2010.

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

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

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* dfr-05 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v.101,p.7563-756, 2010.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. **New Delhi: Asiatech Publishers**, p.760, 2005.

PARANTHAMAN, R.; VIDYALAKSHMI, R.; MURUGESH, S.; SINGARAVADIVEL. K. Optimization of fermentation conditions for production of tannase enzyme by *Aspergillus oryzae* using sugarcane baggasse and rice straw. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry** v. 3 n. 2 p. 105-110, 2008.

PÈLACH, M. A.; PASTOR, F. J.; PUIG, J.; VILASECA F.; MUTJÈA, P. Enzymic deinking of old newspapers with cellulose. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1063-1067, 2003.

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

POKHREL, S.; JOO, J.C.; YOO, Y.J. Shifting the optimum pH of *Bacillus circulans* xylanase towards acidic side by introducing arginine. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.18, n.1, p.35, 2013.

POL, D.; LAXMAN, S.; RAO, M. Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS 20. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.49, n.3, p.189-194, 2012.

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

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S.K.; PRAKASH, B.; RUBUL, M.; SREERAMULU, K.; Production of alkaliphilic, halotolerant, thermostable cellulase free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: Single step purification and characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.1, p.183-192, 2012.

QUERIDO, A.L.S.; COELHO, J.L.C.; ARAÚJO, E.F.; CHAVES-ALVES, V.M. Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 475-480, 2006.

RAO, C. S.; SATHISH, T.; LAXMI, M. M.; LAXMI, G. S.; RAO, R. S.; PRAKASHAM, R. S. Modeling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated *Bacillus circulans* using feed-forward neural network and genetic algorithm, **Journal Applied Microbiology**, v. 104, p. 889 – 898, 2008b.

RAO, Y.K., TSAY, K.J., WU, W.S. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of eucalyptene A and xyloketal A from *Xylaria sp.* 2508 using response surface methodology. **Process Biochemistry** v.42, p.535–541, 2007.

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

RAWAT, R.; TEWARI, L. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. **Extremophiles**, v. 16, n.4, p.637-644, 2012.

RODRÍGUEZ, COUTO, S.; SANROMÁN, M.A. Application of solid state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemistry Engineering**, v. 22, p. 211 – 219, 2005.

RUEGGER, M.J.S.; TAU-K-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, abr.-jun. 2004.

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

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, 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 their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry** v.40, p.1823–1828, 2005.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V.H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **Janus**, v.3, n.4, p. 165-183, 2006.

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

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, 199-211, 2010.

SHIN, H-Y., JI-HYUN LEE, J-H., LEE, J-Y., HAN, Y-O., HAN, M.J., KIM, D-H. Purification and characterization of ginsenoside ra-hydrolyzing β -D-xylosidase from *Bifidobacterium breve K-110*, a human intestinal anaerobic bacterium. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p.1170-1173, 2003.

SHRIVASTAVA, S.; SHUKLA, P.; MUKHOPADHYAY, K. Purification and preliminary characterization of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* strain SS-8. **Biotechnology**, v.1, p. 255–259, 2011.

SILVA, R.; MARTINS, E.S.; DASILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.318-324, 2002.

SINGH, R.; SHUKLA, A.; TIWARI, S.; SRIVASTAVA, M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p.713-728, 2014.

SOMERA, A.F.; PEREIRA, M.G.; GUIMARÃES, L.H.S.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCEZI, H.F.; FURRIEL, R.P.M.; JORGE, J.A. Effect of glycosylation on the biochemical properties of β -xylosidases from *Aspergillus versicolor*. **The Journal of Microbiology**. v.47,n.3, p.270-276, 2009.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B.S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p.277-283, 2010.

STROPARO, E. C., BEITEL, S.M, RESENDE, J.T.V., KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse

biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUBRAMANIYAM, R. AND VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: **A comparative study**. I.J.S.N., V. 3 n. 3, p. 480-486, 2012.

SUKIMARAN, R. K.; REETA, R .S.; PANDEY, A. Microbial cellulases: production, applications and challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**, Washington, v. 64, n. 11, p. 832-844, 2005.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulose production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 32, p. 421-424, 2009.

SUN, Y., and CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: A review, **Bioresource Technology**, v.83, p.1-11, 2002.

TAVARES, V. B., GOMES, E., IEMBO, T., BOCCHINI, D. A., DA SILVA, R. Application of thermostable xylanase from *Bacillus sp strain 77-2* to the treatment of Eucalyptus kraft pulp. **Anais do Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and other Wood Components**, p 367-371, 1997.

TAVARES, I.M.C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por *Aspergillus niger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Cróton grewoides***. 2012. 67f. Dissertação (Mestre em Engenharia de alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2012.

THIEMANN, J.E., XAVIER, M.S.S.P., COLEN, G. & GUIA, M.M. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. In **Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo** (J.S. Furtado, coord.). Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, p.168-185, 1980.

TIAN-QING L.; DONG, W.; SHANG-TIAN, Y.; XIAOGUANG, L. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 175–182, 2013.

TWOMEY, L.N.; PLUSKE, J.R.; ROWE, J.B.; CHOCT, M; BROWN, W.; MCCONNELL, M.F.; PETHICK, D.W. The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. **Animal Feed Science Technology**, v. 108, p. 71–82, 2003.

UNDERKLOFER, L. A.; BARTON, R. R.; RENNERT, S. S. Production of microbial enzymes and their applications. **Applied Microbiology**, New York, v. 6, n. 3, p. 212-221, 1958.

VAN, D.; SUSAN, J.; SAKKA, M.; SAKKA, K.; PLETSCHKE, B. I.; Characterization of the multi-enzyme complex xylanase activity from *Bacillus licheniformis* SVD1. **Enzyme and Microbial Technology**, v.47, n.4, p.174-177, 2010.

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

VISSER, E. M.; FALKOSKI, D.L.; DE ALMEIDA, M.N.; MAITAN-ALFENAS, G.P.; GUIMARAES, V.M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.144, p.587-59, 2013.

WAKIYAMA M., YOSHIHARA, K., HAYASHI, S., OHTA, K. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.106, n.4,p.398-404, 2008.

WANG, J.; QUIRK, A. ; LIPKOWSKI, J.; DUTCHER, J. R.;CLARKE A. J. Direct in situ observation of synergism between cellulolytic enzymes during the biodegradation of crystalline cellulose fibers. Review: **Langmuir**. v. 29, p. 14997–15005, 2013.

WHITAKER JR **Principles of enzymology for food sciences**. Editora Marcel Dekker. 2ª edição, p. 625, 1994.

WONG K.K.Y. ; TAN LUL, SADDLER JN Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications. **Microbiology Review** v.52 n. 3 p. 305–317, 1988.

YANG, S.Q.; YAN, Q.J. ; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; TIAN, H.M. ; WANG, Y.Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, 2006, v.97, n.15, p.1794-1800, 2006.

YANG, X. Z.; SHI, P.J.; HUANG, H.Q.; LUO, H.Y.; WANG, Y.R.; ZHANG, W.; YAO, B. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional beta-xylosidase/alpha-arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. **Food Chemistry**, v.148, p.381-387, 2014.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; RODERICK I. MACKIE, R. I.; CANN, I. K. O. Chapter 1. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, 2010.

ZELLER, V.; BARDGETT, R. D.; TAPPEINE, U. Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north south gradient in the European Alps. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 639-649, 2001.

ZHANG, P. Y.-H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, p.452-481, 2006.

ZHOU S, INGRAM L.O Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. **Journal Bacteriology**, v.182, p.5676–5682, 2000.

ZHOU, J.; BAO, L.; CHANG, L.; ZHOU, Y.; LU, H. Biochemical and kinetic characterization of GH43 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase and GH30 α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase from rumen metagenome. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 39, n.1, p. 143-52, 2012.

APÊNDICE A

Tabela 9 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Penicillium sp* 1IP4-A2 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.

<i>Penicillium sp</i> 1IP4-A2	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
	xilanase	avicelase	CMCase		
Farelo de trigo	1,10	0	0,39	1,25	0,88
Bagaço de cana-de-açúcar	11,45	0,07	0,50	0,86	13,31
Serragem	17,00	0	0,81	4,39	3,87
Sabugo de milho	8,70	0	0,73	1,00	8,70
Farelo de trigo + Bagaço de cana-de-açúcar	2,44	0,08	0,86	2,46	0,99
Farelo de trigo + Serragem	0,51	0	0,32	1,78	0,29

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 10 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP2B1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.

<i>Aspergillus sp</i> 1IP2B1	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. Específica (U mg ⁻¹)
	xilanase	avicelase	CMCase		
Farelo de trigo	1,73	0,18	0,80	4,21	0,41
Bagaço de cana-de-açúcar	8,86	0	0,99	1,04	8,52
Serragem	10,68	0	1,92	4,12	2,59
Sabugo de milho	11,56	0,20	1,08	1,09	10,60
Farelo de trigo + Bagaço de cana-de-açúcar	1,64	0,10	0,91	0,86	1,91
Farelo de trigo + Serragem	0,81	0	0,81	2,94	0,27

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 11 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP8-A1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.

<i>Aspergillus sp</i> 1IP-8A1	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. Específica (U mg ⁻¹)
	xilanase	avicelase	CMCase		
Farelo de trigo	0,58	0,24	0,54	4,44	0,13
Bagaço de cana-de-açúcar	10,95	0,11	0,72	0,87	12,59
Serragem	9,54	0	0,31	2,60	3,67
Sabugo de milho	6,63	0	0,74	1,46	4,54
Farelo de trigo + bagaço de cana-de-açúcar	3,81	0	1,0	2,96	1,29
Farelo de trigo + serragem	0,81	0	0,42	2,83	0,29

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 12 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP16-A1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.

<i>Aspergillus sp</i> 1IP16A1	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. Específica (U mg ⁻¹)
	xilanase	avicelase	CMCase		
Farelo de trigo	1,42	0	0,09	3,10	0,46
Bagaço de cana-de-açúcar	7,46	0,21	0	0,94	7,94
Serragem	7,64	0,16	0	1,87	4,09
Sabugo de milho	9,73	0	0,69	1,01	9,63
Farelo de trigo + Bagaço de cana-de-açúcar	4,98	0	1,30	2,96	1,68
Farelo de trigo + serragem	1,25	0	0,08	2,40	0,52

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 13 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP6B1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos à 45 °C, em 72 horas de cultivo.

<i>Aspergillus sp</i> 1IP6B1	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
	xilanase	avicelase	CMCase		
Farelo de trigo	0,73	0,10	0	8,33	0,09
Bagaço de cana-de-açúcar	8,03	0	1,05	1,30	6,18
Serragem	7,63	0	0,88	4,58	1,67
Sabugo de milho	11,22	0	0,86	1,48	7,58
Farelo de trigo + Bagaço de cana-de-açúcar	4,68	0,13	0,18	3,15	1,48
Farelo de trigo + Serragem	0,63	0	0,27	4,27	0,16

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 14 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP7B1 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos, à 45 °C, em 72 horas de cultivo.

<i>Aspergillus sp</i> 1IP7B1	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
	xilanase	avicelase	CMCase		
Farelo de trigo	0,76	0	0,34	2,42	0,31
Bagaço de cana-de-açúcar	5,22	0	0,22	0,91	5,74
Serragem	3,44	0,76	0,60	2,25	1,53
Sabugo de milho	8,66	0,43	0,92	1,02	8,49
Farelo de trigo + Bagaço de cana-de-açúcar	1,54	0	0,32	2,75	0,56
Farelo de trigo + Serragem	1,10	0,40	0	2,21	0,50

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 15 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP15B2 sob fermentação em estado sólido em diferentes substratos, à 45 °C, em 72 horas de cultivo.

<i>Aspergillus sp</i> 1IP15B2	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
	xilanase	avicelase	CMCase		
Farelo de trigo	0,80	0	0	3,95	0,20
Bagaço de cana-de-açúcar	7,46	0,21	0	1,86	4,01
Serragem	9,60	0,19	0,78	4,77	2,01
Sabugo de milho	7,27	0	0,50	1,49	4,88
Farelo de trigo + Bagaço de cana-de-açúcar	9,58	0,86	0,53	3,79	2,53
Farelo de trigo + Serragem	1,22	0	1,13	4,73	0,26

Fonte: Dados do próprio autor

APÊNDICE B

Tabela 16 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Penicillium sp* 1IP4-A2, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Serragem à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.

Tempo (horas)	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
		xilanase	avicelase	CMCase		
24	Farelo de trigo	2,39	0	0	4,33	0,55
	Serragem	4,91	0,21	0,30	3,27	1,50
48	Farelo de trigo	5,95	0,11	1,80	4,40	1,35
	Serragem	12,46	0	0,47	3,29	3,79
72	Farelo de trigo	3,08	0,55	0,55	2,92	1,05
	Serragem	13,81	0	0,30	2,04	6,77
96	Farelo de trigo	2,95	0,19	0,51	3,10	0,95
	Serragem	9,08	0	0,40	2,08	4,36

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 17 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP2B1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Sabugo de milho à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.

Tempo (horas)	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
		xilanase	avicelase	CMCase		
24	Farelo de trigo	1,58	1,31	0,94	3,15	0,50
	Sabugo de Milho	17,9	0,11	1,01	4,08	4,39
48	Farelo de trigo	4,86	0	0	2,67	1,83
	Sabugo de Milho	20,85	0,14	1,03	0,90	23,17
72	Farelo de trigo	3,59	0,24	0,62	2,00	1,79
	Sabugo de Milho	26,00	0,32	1,22	0,89	29,21
96	Farelo de trigo	6,05	0,26	0,44	2,98	2,03
	Sabugo de Milho	37,05	0,16	0,63	1,00	37,05

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 18 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP8-A1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Serragem à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.

Tempo (horas)	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
		xilanase	avicelase	CMCase		
24	Farelo de trigo	1,63	0,12	0,36	3,94	0,41
	Serragem	0,92	0,19	0,21	2,65	0,35
48	Farelo de trigo	0,57	0,20	0,73	4	0,14
	Serragem	1,47	0,12	0,28	5,75	0,25
72	Farelo de trigo	0,56	0	0,26	4,17	0,13
	Serragem	1,44	0	0,33	3,79	0,38
96	Farelo de trigo	0,37	0,10	0,34	4,04	0,09
	Serragem	2,01	0,10	0,19	6,19	0,32

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 19 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína para linhagem 1IP16-A1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Sabugo de milho à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.

Tempo (horas)	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
		xilanase	avicelase	CMCase		
24	Farelo de Trigo	2,11	0,08	0,57	4,73	0,45
	Sabugo de Milho	1,66	0,12	0	0,67	2,48
48	Farelo de Trigo	0,78	0,17	0,39	2,31	0,34
	Sabugo de Milho	1,87	0,16	0,47	0,64	2,92
72	Farelo de Trigo	0,55	0,16	0,38	5,35	0,10
	Sabugo de Milho	2,92	0,08	0,47	1,02	2,86
96	Farelo de Trigo	0,46	0,08	0,25	5,06	0,09
	Sabugo de Milho	2,67	0,08	0,47	1,48	1,80

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 20 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP6B1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Sabugo de milho à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.

Tempo (horas)	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
		xilanase	avicelase	CMCase		
24	Farelo de trigo	1,78	0,26	0,12	2,88	0,62
	Sabugo de milho	1,17	0	0,18	0,65	1,80
48	Farelo de trigo	0,51	0,07	0	1,61	0,32
	Sabugo de milho	2,71	0,82	0,17	0,58	4,67
72	Farelo de trigo	0,39	0,32	0	2,28	0,17
	Sabugo de milho	1,46	0,08	0,19	0,53	2,75
96	Farelo de trigo	0,48	0,23	0,07	1,66	0,29
	Sabugo de milho	1,80	0,07	0,13	0,75	2,40

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 21 – Atividades xilanase, avicelase, CMCCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 1IP7B1, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Sabugo de milho à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.

Tempo (horas)	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
		xilanase	avicelase	CMCase		
24	Farelo de trigo	1,87	0,15	0,45	4,12	0,45
	Sabugo de Milho	1,93	0	0,37	0,59	3,27
48	Farelo de trigo	0,65	0	0,49	2,81	0,23
	Sabugo de Milho	2,62	0,08	0,57	0,69	3,80
72	Farelo de trigo	0,40	0	0,24	3,62	0,11
	Sabugo de Milho	2,77	0,13	0,34	0,94	2,95
96	Farelo de trigo	0,24	0,45	0,24	2,29	0,10
	Sabugo de Milho	3,02	0	0,38	1,69	1,79

Fonte: Dados do próprio autor

Tabela 22 – Atividades xilanase, avicelase, CMCase e proteína pelo fungo *Aspergillus sp* 11P15B2, cultivado sob fermentação em estado sólido em Farelo de trigo e Bagaço de cana-de-açúcar à 45 °C, ao longo do tempo de fermentação.

Tempo (horas)	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)			Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. específica (U mg ⁻¹)
		Xilanase	Avicelase	CMCase		
24	Farelo de trigo	1,38	0,29	0,15	2,78	0,50
	Bagaço de cana-de-açúcar	1,10	0,13	0	0,64	1,72
48	Farelo de trigo	0,41	0	0,23	1,75	0,23
	Bagaço de cana-de-açúcar	1,91	0,66	0,20	0,68	2,81
72	Farelo de trigo	0,26	0,37	0,18	1,92	0,13
	Bagaço de cana-de-açúcar	1,21	0	0,17	0,70	1,73
96	Farelo de trigo	0,29	0,23	0,10	1,16	0,25
	Bagaço de cana-de-açúcar	1,51	0,15	0,13	0,72	2,10

Fonte: Dados do próprio autor