

Chadia Chahud Maestrello

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

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Araraquara/SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

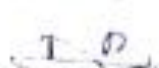
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Aspergillus fabryi* ITAL 22 223 cultivado em Fermentação em Estado Sólido utilizando resíduos agroindustriais"

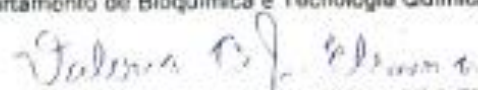
AUTORA: CHADIA CHAHUD MAESTRELLO

ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

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


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


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


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

Araraquara, 23 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Chadia Chahud Maestrello

Nome em citações bibliográficas: MAESTRELLO, C. C.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

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

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

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

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

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

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

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

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

2016 – Escrita Científica (Carga horária: 6h)

Universidade de São Paulo, USP, Brasil

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

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

PROJETOS DE PESQUISA/ATUAÇÃO PROFISSIONAL

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

Universidade de Araraquara, UNIARA.

2015 – 2016 – Bolsista FAPESP, treinamento técnico TT3

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

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

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

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

Apresentação de Trabalhos

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

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

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

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

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

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

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

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

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

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

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

DEDICATÓRIA

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao técnico Maurício pelo auxílio e apoio no laboratório.

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

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

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

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

Chico Xavier

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

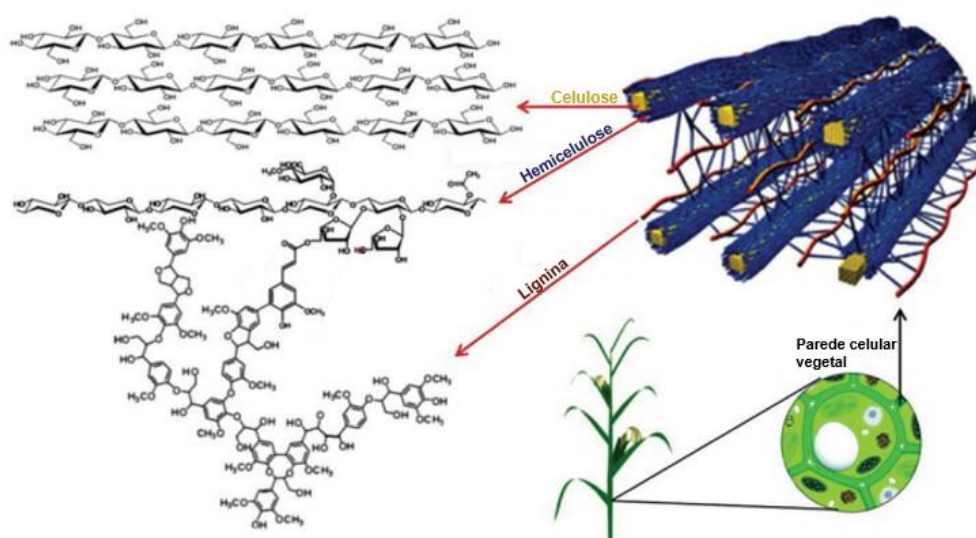
Além do bagaço de cana-de-açúcar, diversos resíduos e produtos agroindustriais como mandioca, soja, beterraba, batata doce, farelo e palha de trigo e arroz, casca de soja, milho e arroz, resíduos da indústria de processamento de café (polpa e casca), entre outros, são utilizados em pesquisas para aproveitamento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

1.1 Biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina

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

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

Figura 1. Esquema da parede celular vegetal.



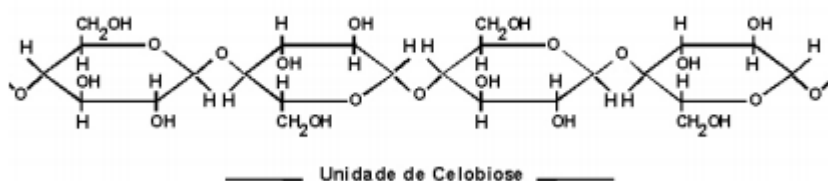
Fonte: Volynets, Ein-Mozaffari e Dahman (2017), adaptado pela Autora (2018).

1.1.1 Celulose

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

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

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



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

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

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

1.1.2 Hemicelulose

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

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

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

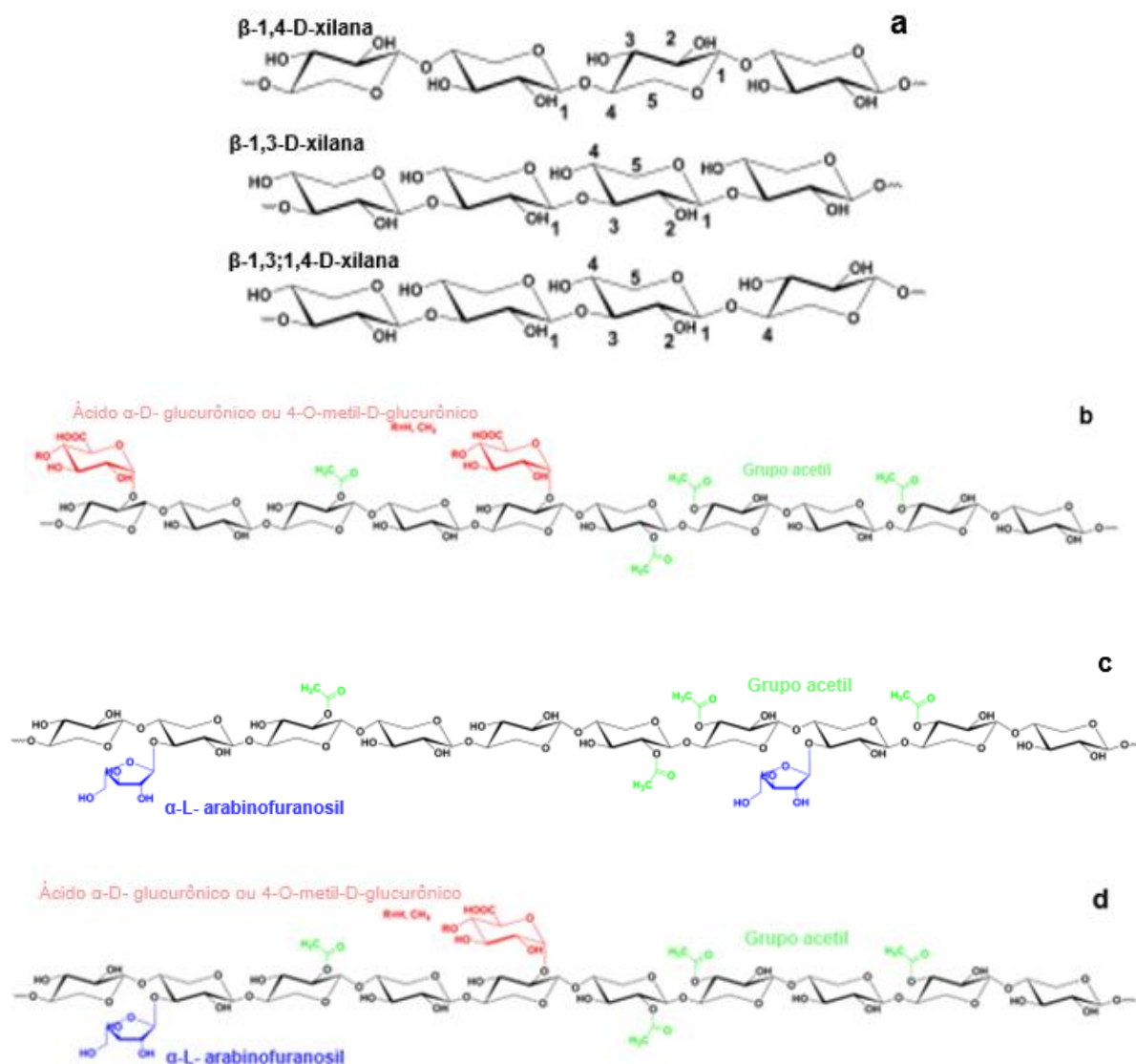
1.1.2.1 Xilanas

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

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

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

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



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

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

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

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

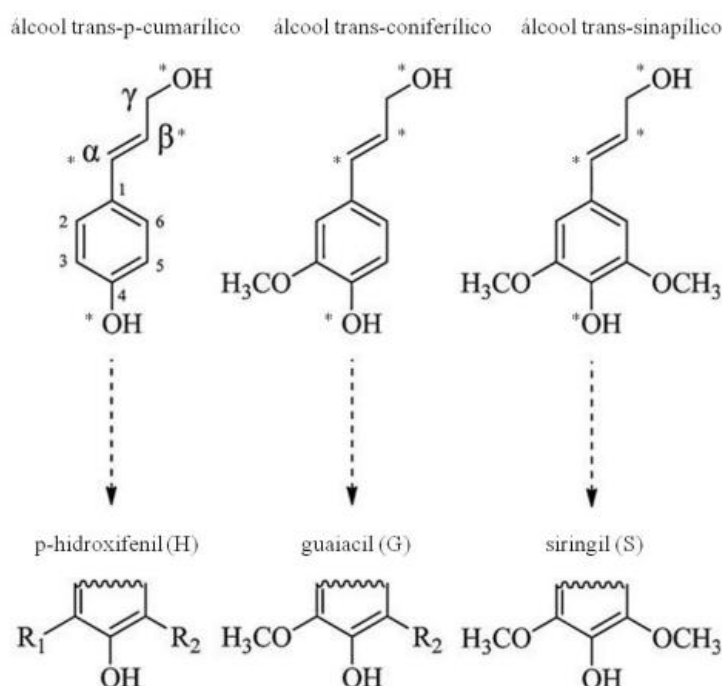
Devido à variedade e complexidade da cadeia de xilana, para sua hidrólise completa é necessária a ação sinérgica de enzimas que compõe o complexo hemicelulolítico (COLLINS et al, 2005; MICHELIN et al., 2008).

1.1.3 Lignina

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

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

Figura 4. Estrutura química dos precursores primários da lignina.

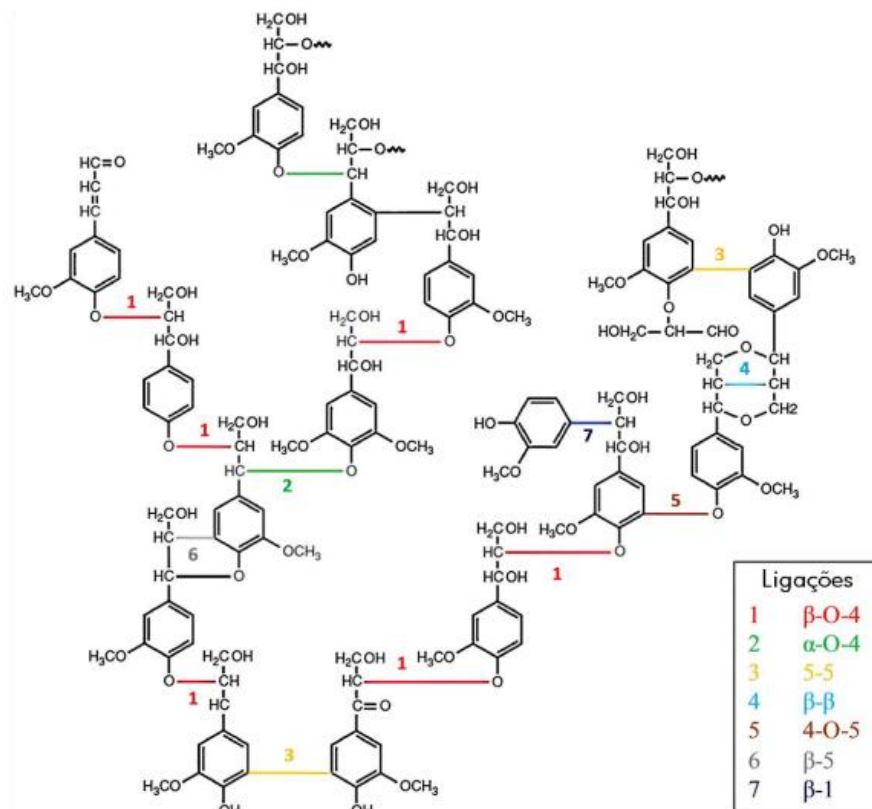


Fonte: Calvo-Flores et al. (2015).

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

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

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



Fonte: Laurichesse e Avérous (2014).

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

1.2.1 Complexo celulolítico

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

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

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

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

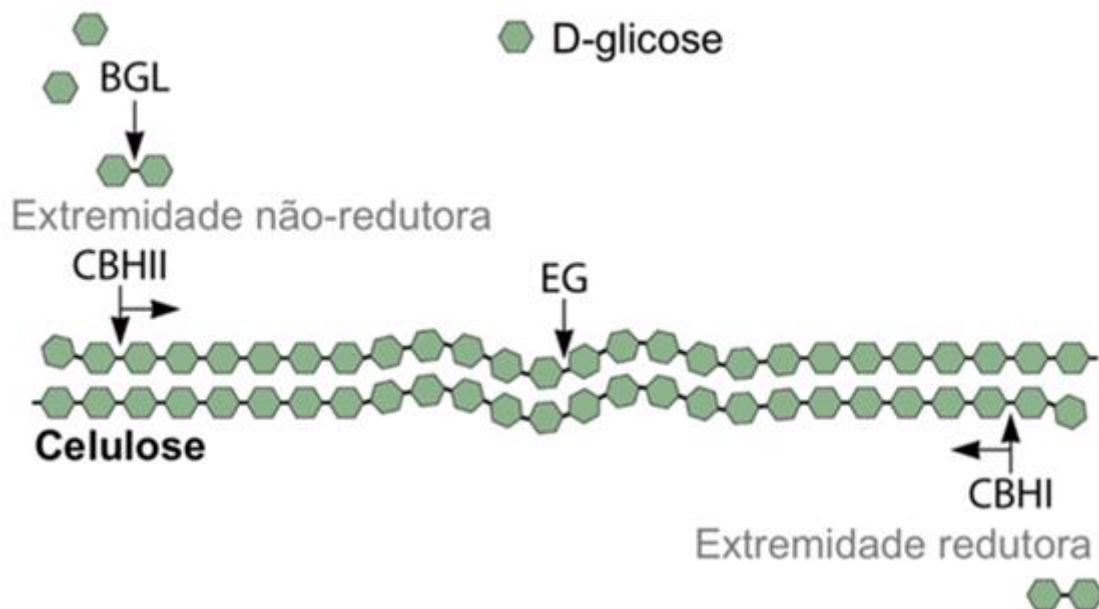
- Endo- β (1-4) glucanase ou CMCase (EC 3.2.1.4) (EG): responsável por iniciar o processo de hidrólise. Hidrolisando randomicamente as ligações β (1-4) no interior da estrutura amorfa da fibra da celulose liberando oligossacarídeos com terminais redutores (quando a glicose apresenta hidroxila heterosídica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

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

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

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

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



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

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

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

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

1.2.2 Complexo hemicelulolítico

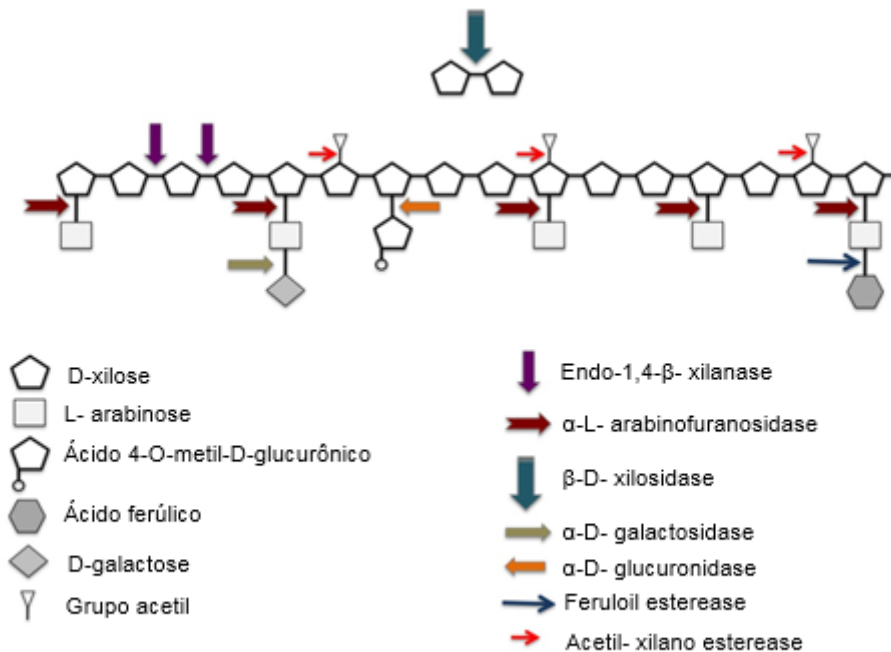
As propriedades químicas e estruturais da hemicelulose pode ser influenciada pela presença de diversos resíduos, e para que ocorra sua hidrólise completa é necessária a ação de diversas enzimas que possam clivar as cadeias principais e as cadeias laterais existentes. Essas enzimas compõem o complexo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

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

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

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

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



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

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

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

1.2.2.1 Aplicações biotecnológicas das xilanases

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

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

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

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

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

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

1.3 Fungos filamentosos

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

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

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

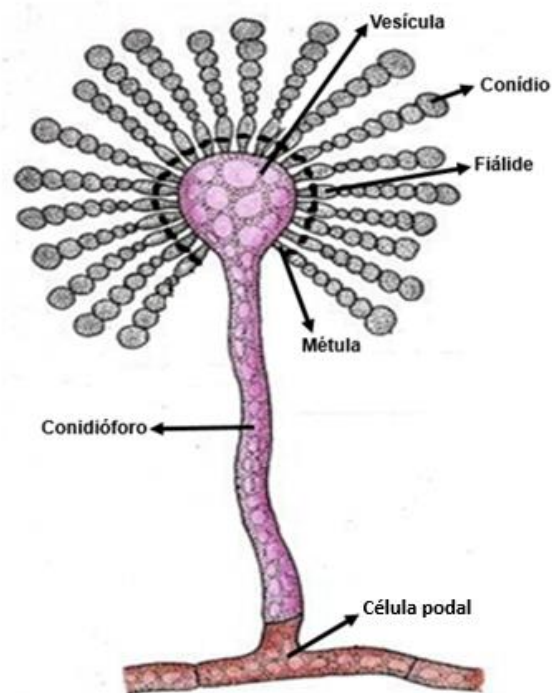
1.3.1 *Aspergillus*

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

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

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

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



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

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

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

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

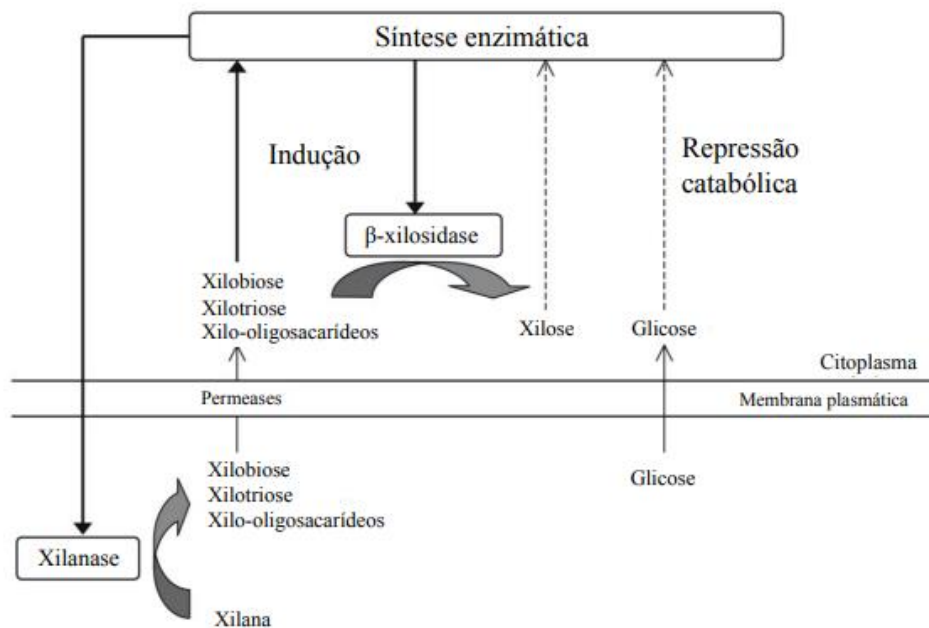
1.3.2 Regulação de enzimas xilanolíticas por *Aspergillus*

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

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

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

Figura 9. Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico.



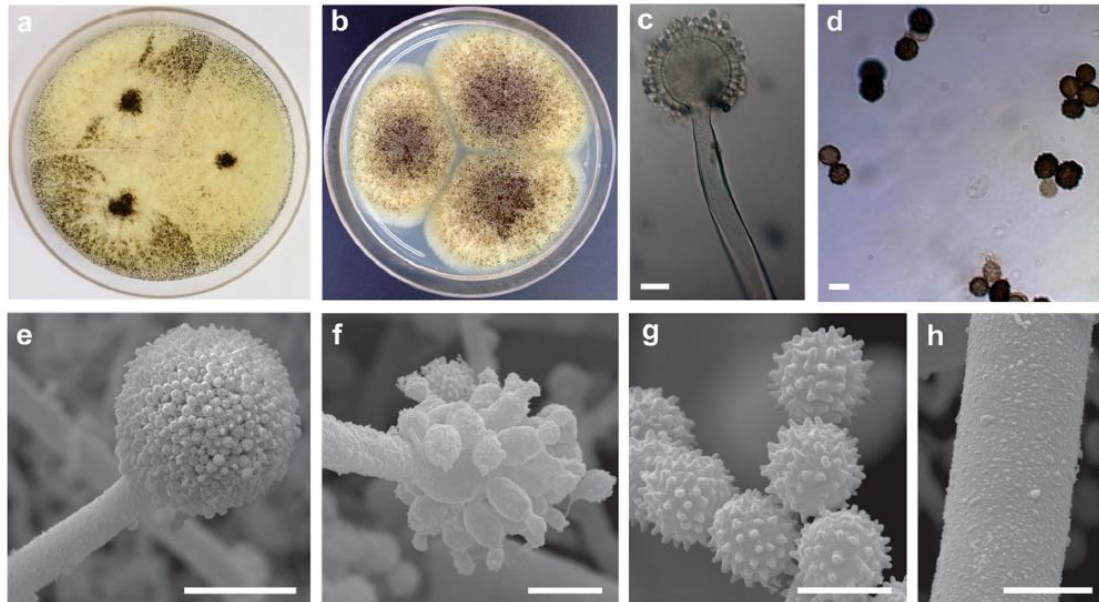
Fonte: Amorim (2017).

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

1.3.1.1 *Aspergillus labruscus*

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

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



Fonte: Fungaro et al. (2017).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fonte: Autora.

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

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

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

Fonte: Autora.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi analisar a produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanases a partir do cultivo do fungo *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223, em Fermentação em Estado Sólido (FES) na presença de resíduos/produtos agroindustriais.

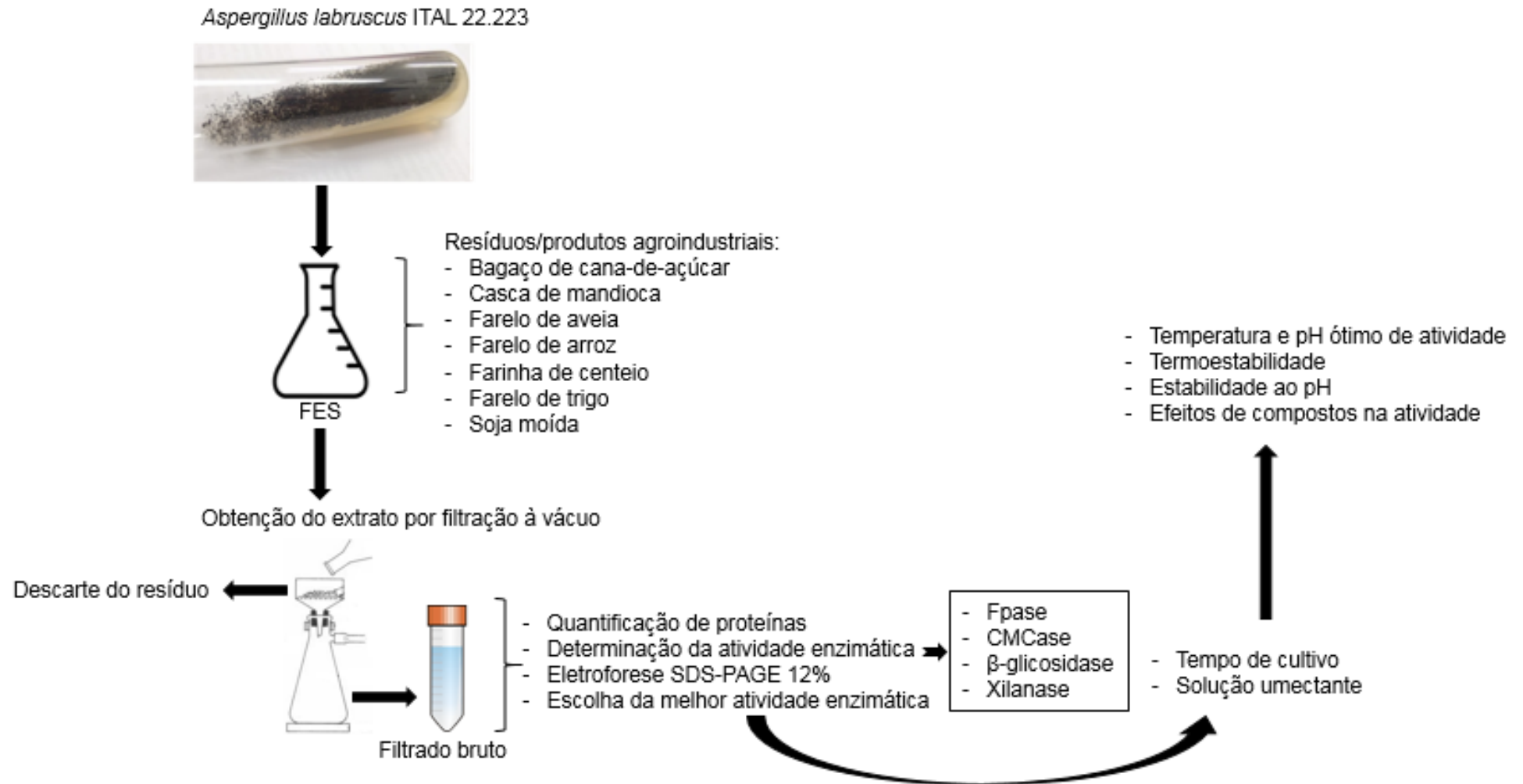
2.2 Objetivos específicos

- Analisar a influência do meio de cultivo para bioprospecção de enzimas celulolíticas e xilanases;
- Selecionar a enzima de maior atividade enzimática obtida na FES;
- Padronizar as melhores condições de cultivo para produção desta enzima;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima selecionada, em extrato bruto, frente a determinação de temperatura e pH ótimo, termoestabilidade e estabilidade ao pH, e resistência a solventes orgânicos e sais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos apresentados neste trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, sob coordenação e orientação do Professor Doutor Luis Henrique Souza Guimarães. A Figura 11 descreve, simplificada, os procedimentos realizados no presente trabalho

Figura 11. Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.



Fonte: Autora.

3.1 Microrganismo e manutenção da linhagem em laboratório

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo filamentoso *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223, gentilmente cedido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas-SP (ITAL). Esta linhagem foi isolada da superfície de uvas Baga (*Vitis labruscas* L) cultivadas no município de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil.

O repique de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 foi realizado em tubos de ensaio contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA) inclinado (Figura 12) por 15 dias em estufa a 30° C e, posteriormente, armazenado em geladeira a 4° C até a sua utilização.

Figura 12. Crescimento do fungo *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 em meio BDA inclinado



Fonte: Autora.

3.2 Coleta e preparo dos resíduos/produtos agroindustriais

Para a Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizou-se os substratos bagaço de cana-de-açúcar, casca de mandioca, soja moída, farelo de aveia, farelo de trigo, farinha de centeio e farelo de arroz.

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado junto a um microempreendedor no município de Araraquara/SP. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, em Ribeirão Preto/SP. Inicialmente, o bagaço de cana-de-açúcar foi lavado extensivamente com água destilada com o propósito de retirar o açúcar residual presente. A redução da quantidade de açúcar residual foi analisada segundo a metodologia empregada por Miller (1959). A cada

lavagem, 0,5 mL da água residual foi acrescido de 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em tubos de ensaio. O volume obtido foi fervido a 100°C por 5 minutos e resfriado em banho de gelo. Para comparação visual, utilizou-se 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de DNS em tubos de ensaio, nas mesmas condições citadas anteriormente.

Após a lavagem, o material foi seco em estufa de circulação de ar por 24 horas à 100°C e encaminhado ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP para ser moído em moinhos de facas com peneira de 20 mesh, no laboratório multiusuário do Departamento de Química Orgânica.

Os pré-tratamentos utilizados para o bagaço de cana-de-açúcar foram: tratamento ácido, tratamento básico e explosão à vapor. Para tratamento ácido, em frasco Erlenmeyer de 500 mL, foi acrescido ao bagaço de cana-de-açúcar ácido sulfúrico 2% (v/v) na proporção 1:15 (m/v), de modo que o resíduo agrícola ficasse totalmente imerso na solução ácida; logo após, o frasco foi submetido a autoclavagem a 1,5 atm, por 20 minutos a 120° C conforme metodologia empregada por Campos, Silva e Silva (2011). Para tratamento básico, foi acrescido ao bagaço de cana-de-açúcar hidróxido de sódio 2% (m/v) na proporção de 1:15 (m/v) de modo que o resíduo agrícola ficasse totalmente imerso na solução alcalina, seguindo-se a mesma metodologia utilizada para a hidrólise ácida. Ambos resíduos tratados foram submetidos a lavagem com água destilada, até que o pH ficasse neutro (7,0). Para isso, amostras da água de lavagem foram retiradas para análise de pH. O bagaço tratado com explosão à vapor foi cedido gentilmente pela Usina Nardini, localizada no município de Monte Alto, no Estado de São Paulo.

A casca de mandioca foi obtida manualmente da raiz tuberosa, lavada com água destilada para retirada das impurezas, secas em estufa de circulação de ar por 24 horas à 100°C e moídas em moinho de facas com peneira de 20 mesh, no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

A soja foi adquirida comercialmente e moída em processador doméstico, e os produtos/resíduos farelo de aveia, farelo de trigo, farinha de centeio e farelo de arroz foram adquiridos no comércio local e não foram submetidos a pré-tratamentos.

3.3 Obtenção de culturas em Fermentação em Estado Sólido (FES)

As FES com bagaço de cana-de-açúcar foram preparadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 gramas do resíduo (*in natura* e pré-tratado), sendo adicionada água de torneira na proporção 1:2,8 (m/v), procedimento padronizado em nosso laboratório, devido a necessidade de evitar a presença de água livre no meio para caracterizar a FES.

Os cultivos em FES dos resíduos/produtos agroindustriais, foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 gramas de substrato; os cultivos contendo casca de mandioca e farelo de trigo foram umedecidos com água de torneira e/ou água destilada na proporção de 1:1 (m/v); para os meios contendo farelo de aveia e farinha de centeio, a proporção foi de 1:1,4 (m/v); para o meio contendo soja moída, a proporção foi de 1:0,7 (m/v) e para o meio contendo farelo de arroz, a proporção foi de 1:1,5 (m/v). A diferença nas proporções de solução umidificante deve-se a diferença de absorção de água dos produtos/resíduos agrícolas, evitando-se a presença de água livre no meio. Foram avaliadas as influências de diferentes soluções salinas: solução de sais de Khanna (KHANNA et al., 1995), SR (RIZZATTI et al., 2001) e Vogel (VOGEL, 1964), em diferentes proporções (m/v) (1:0,5; 1:1; 1:1,5; 1:2), adicionados ao substrato, sobre a produção enzimática.

Todos os meios de cultivos foram autoclavados a 1,5 atm por 30 minutos a 120°C e, posteriormente, inoculados. Para a inoculação, o meio de manutenção (BDA inclinado) contendo o crescimento fúngico foi adicionado de 10 mL de água destilada estéril, agitado e submetido a raspagem do microrganismo com alça de platina, obtendo-se a suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/mL, de acordo com contagem realizada em contador automático TC20™ da Biorad®. A cada meio de cultivo em FES adicionou-se 1 mL da suspensão de esporos, obtendo-se uma concentração de 2×10^6 esporos/g de substrato. Todo procedimento foi realizado em fluxo laminar para manter a esterilidade e evitar contaminações. Os experimentos foram feitos em triplicatas. As culturas foram incubadas em estufas de 25-30 °C por períodos que variaram de 1 - 9 dias.

3.3.1 Composição das soluções salinas

Solução de sais Khanna (KHANNA et al., 1995)

• NH_4NO_3	2g
• KH_2PO_4	1,3g
• KCl	0,098g
• $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0138g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,007g
• $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0066g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,062g
• H_2O destilada	100mL

Solução de sais de Vogel (VOGEL, 1964)

• $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,5g
• KH_2PO_4	2,5g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g
• NH_4NO_3	1,0g
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05g
• Solução (traços elementos)	0,05mL
• Clorofórmio	0,02mL
• H_2O destilada	100mL

Solução dos traços elementos Vogel

• $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
• $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot (6\text{H}_2\text{O})$	1g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25g
• $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05g
• $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05g
• Clorofórmio	1mL
• H_2O destilada	100mL

Solução de sais SR [20x] (RIZZATTI et al., 2001)

• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,24g
• KH_2PO_4	0,3g
• $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1g
• H_2O destilada	100mL

3.4 Determinação da temperatura ótima de crescimento visual em FES

Os testes para identificar a temperatura ótima de crescimento visual do fungo foram feitos a 25°C, 30°C e 37°C para todos os meios de cultivos, por 9 dias.

3.5 Obtenção do extrato enzimático

Para obtenção do extrato enzimático, os cultivos foram retirados da estufa após o período de incubação, acrescidos de 50 mL de água destilada à temperatura de 4° C e levados à agitação em shaker rotacional à 200 rpm por 30 minutos à 4° C. Posteriormente, o material foi filtrado em bomba à vácuo, utilizando papel de filtro Whatman nº1 e gaze em um funil Buchner, e o filtrado obtido foi utilizado para a dosagem de proteínas e determinação das atividades enzimáticas. O resíduo retido no filtro foi descartado.

3.6 Quantificação proteica

A quantificação proteica foi realizada como descrito por Bradford (1976), utilizando o reagente comercializado pela Biorad®. Foi elaborada uma curva analítica utilizando Albumina Soro Bovino (BSA), na concentração de 2,5 µg/mL a 25 µg/mL, como padrão.

3.7 Eletroforese em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

Para análise eletroforética (SDS-PAGE 12%), as proteínas obtidas da FES foram dialisadas contra água destilada a 4° C por 24 horas, quantificadas pelo método de Bradford (1976), e submetidas a tratamento com caulin, adicionado na proporção de 1 g para cada 100 mL de amostra, agitadas em vortex e centrifugadas a 9681 x g

por 5 minutos, para retirada de pigmentos. Após o tratamento, a amostra proteica foi liofilizada.

As amostras liofilizadas foram diluídas em 20 μL de tampão Tris-HCl 100 mmol.L^{-1} , pH 6,8 adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20% e β -mercaptoetanol, obtendo-se uma concentração final de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tampão, fervidas a 100° C por 5 minutos e aplicados 100 μg de amostra por poço em gel de poliacrilamida 12%. A corrida foi realizada ajustando-se a fonte para 90 V, 40 mA e 8 W, e teve duração de 90 minutos. Ao final, o gel foi removido das placas de vidro e corado com corante Comassie Brilliant Blue R-250 por 30 minutos e descorado utilizando solução contendo 45% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial. Utilizou-se marcador molecular SDS7 (SIGMA®), com massa molecular variando de 14,2-66 kDa.

3.8 Determinação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram quantificadas pelo método dos açúcares redutores (MILLER, 1959), protocolo modificado, para celulase, xilanase e endoglucanase, e para β -glicosidase foi utilizado o reagente cromogênico *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NP β G) (Sigma®), como segue:

3.8.1 Celulase total – FPase

Para determinar a atividade enzimática total da celulase foi realizado o ensaio de FPase, proposto por Ghose (1987). Tiras de papel de filtro Whatman nº1, medindo 1 cm x 6 cm (50 mg), enroladas em formas de espiral foram colocadas em tubos de ensaio adicionando-se, em seguida, 1 mL tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} , pH 5,5. Os tubos foram colocados em banho termostático (50 °C), por 1 minuto para aquecer previamente e em seguida foi adicionado 0,5 mL da amostra enzimática, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente. Uma unidade da atividade enzimática (FPU) foi baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é,

2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação (GHOSE, 1987).

As reações foram conduzidas a 50 °C, em banho termostático, durante 60 minutos. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela adição de 0,5 mL de DNS. Posteriormente, os tubos foram fervidos a 100 °C, durante 5 minutos. Em seguida foram resfriados em banho de gelo. As amostras foram então acrescidas de 8 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Para cálculo da atividade utilizou-se uma curva analítica de glicose de 0,02 mg/mL a 0,1 mg/mL, previamente preparada. Para o tubo controle, foi adicionado 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, substrato (papel de filtro), 0,5 mL de DNS e, posteriormente, 0,5 mL da amostra enzimática.

3.8.2 Carboximetilcelulase (CMCase)

Para determinar a atividade enzimática de endoglucanase foi realizado o ensaio de CMCase. Foram colocadas em tubos de ensaio 0,1 mL de carboximetilcelulose (CMC) 1% em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 4 e 0,1 mL tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 4. Os tubos foram colocados em banho termostático (50 °C), por 1 minuto para aquecer previamente e em seguida foi adicionado 0,1 mL da amostra enzimática, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

As reações foram conduzidas em a 50 °C, em banho termostático, durante 60 minutos. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela adição de 0,1 mL de DNS. Para o controle, foi adicionado 0,1 mL de carboximetilcelulose (CMC) 1% em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 4 e 0,1 mL tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 4, 0,1 mL de DNS e 0,1 mL da amostra enzimática. Posteriormente, os tubos foram fervidos a 100 °C, durante 5 minutos. Em seguida foram resfriados em banho de gelo. As amostras foram então acrescidas de 1,6 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Para cálculo da atividade enzimática utilizou-se uma curva analítica de glicose de 0,02 mg/mL a 0,1 mg/mL, previamente preparada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar

reduzido por minuto nas condições de ensaio. As atividades enzimáticas foram expressas em U/g de substrato.

3.8.3 β -glicosidase

Para determinar a atividade β -glicosidásica foi utilizado o método de Coston e Loomis (1969), onde foram acondicionados em tubos de ensaios 0,09 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,5 e 0,01 mL de pNP β G (1mg/mL), e colocados em banho termostático de 50 °C, para aquecer previamente. Após o aquecimento, foi adicionado 0,1 mL da amostra enzimática, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

As reações foram conduzidas a 50 °C, em banho termostático, durante 60 minutos. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela adição de 1 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹. Para o controle, foi adicionado 0,09 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,5 e 0,01 mL de pNP β G, 1 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹ e, posteriormente, 0,1 mL da amostra enzimática. Após término da reação, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 405 nm. Para cálculo da atividade enzimática, utilizou-se uma curva analítica de p-nitrofenol de 0,02 μ mol/mL a 0,2 μ mol/mL, previamente preparada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de p-nitrofenolato por minuto nas condições de ensaio. As atividades enzimáticas foram expressas em U/g de substrato.

3.8.4 Xilanase

Para determinar a atividade xilanásica, foram acondicionados em tubos de ensaios 0,1 mL de substrato xilana “birchwood” (Sigma®) 1% em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,5, e colocados em banho termostático (40-70°C) para aquecer previamente. Após o aquecimento, foi adicionada 0,1 mL da amostra enzimática, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

As reações foram conduzidas em diferentes temperaturas (40-70 °C), em banho termostático, durante 60 minutos. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela adição de 0,1 mL de DNS. Para o controle, foi adicionado 0,1 mL de substrato, 0,1 mL de DNS e, posteriormente, 0,1 mL da amostra enzimática. Após o período reacional, os tubos foram fervidos a 100 °C, durante 5 minutos e em seguida resfriados em banho de gelo. As amostras foram acrescidas de 1,7 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Para cálculo da atividade enzimática, utilizou-se uma curva analítica de xilose de 0,2 mg/mL a 1 mg/mL, previamente preparada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. As atividades enzimáticas foram expressas em U/g de substrato.

3.9 Determinação da temperatura ótima de atividade xilanásica em extrato bruto

Para determinação da temperatura ótima de atividade xilanásica, as amostras do extrato bruto foram submetidas a análise de reação enzimática, como descrito no item 3.7.3, nas faixas de temperatura entre 40°C e 70°C. Atividade relativa 100% corresponde a 72,9 U/g de substrato.

3.10 Determinação do pH ótimo de atividade xilanásica em extrato bruto

Para determinação do pH ótimo de atividade xilanásica, as amostras do extrato bruto foram submetidas a análise de reação enzimática sob temperatura ótima, como descrito no item 3.7.3, em diferentes valores de pH (3 a 8), sendo que, para pH 3 a 4,5 foi utilizado tampão ácido cítrico 50 mmol.L⁻¹, para pH 5 a 6 foi utilizado tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ e pH 6,5 a 8 utilizou-se tampão Tris HCl 50 mmol.L⁻¹. Atividade relativa 100% corresponde a 72,9 U/g de substrato.

3.11 Determinação da termoestabilidade das xilanases do extrato bruto

Para determinação da termoestabilidade das xilanases, as amostras do extrato bruto foram incubadas em diferentes temperaturas (45-65 °C) por diferentes períodos (20-180 minutos), sendo retiradas alíquotas a cada 10 minutos para análise de reação enzimática como descrito no item 3.7.3, sob condições de temperatura e pH ótimo. Atividade relativa 100% corresponde a 72,9 U/g de substrato.

3.12 Determinação da estabilidade ao pH das xilanases do extrato bruto

Para determinação da estabilidade ao pH das xilanases, as amostras do extrato bruto foram incubadas em diferentes valores de pH (3-8), utilizando-se os mesmos tampões descritos no item 3.9, sendo retiradas alíquotas em 1h, 3h, e 24h para análise de reação enzimática como descrito no item 3.7.3, sob condições de temperatura e pH ótimo. Atividade relativa 100% corresponde a 72,9 U/g de substrato.

3.13 Efeito de diferentes compostos na atividade xilanásica

A influência de compostos na atividade enzimática foi realizada utilizando os compostos AgNO₃, BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, CuSO₄, Fe₂(SO₄)₃, FeCl₃, MgCl₂, MgSO₄, MnCl₂, MnSO₄, NaCl, NH₄Cl, ZnSO₄, SDS, uréia e β-mercaptoetanol adicionados ao meio reacional, obtendo-se a concentração final de 1 mmol.L⁻¹. Foram avaliados ainda os efeitos da adição (v/v) de acetona 1%, acetonitrila 1%, butanol 1%, EDTA 1%, etanol 1%, isopropanol 1%, metanol 1% e Tween-20 0,01%, sobre a atividade enzimática, sendo a reação conduzida como descrito no item 3.7.3, sob condições de temperatura e pH ótimo. Atividade relativa 100% corresponde a 72,9 U/g de substrato.

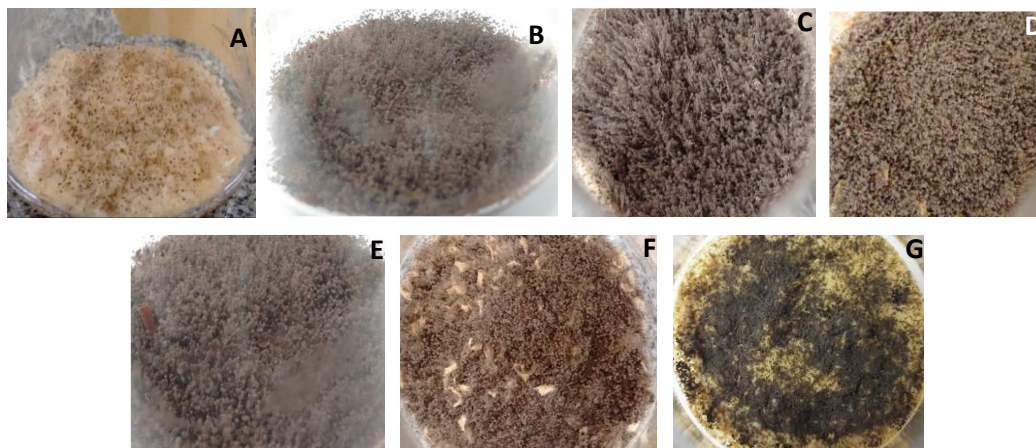
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)

O fungo filamentoso *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 apresentou melhor desenvolvimento quando cultivado à 25°C em casca de mandioca, farelo de aveia, farelo de arroz, farinha de centeio, farelo de trigo e soja moída por 7 dias, corroborando com a melhor temperatura de crescimento observada para este fungo pelos autores Fungaro et al. (2017) quando cultivado em meio Czapeck. Nas temperaturas de 30°C e 37°C, não foi possível observar o crescimento fúngico, como também verificado por Fungaro et al. (2017) quando o fungo foi submetido ao cultivo em meio Czapeck.

Após 20 dias (480 horas) de incubação a 25°C, período acompanhado diariamente até que se notasse crescimento, o fungo *A. labruscus* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* apresentou, visualmente, baixo desenvolvimento (Figura 13 A), se comparado aos cultivos utilizando casca de mandioca, farelo de aveia, farelo de trigo, farinha de centeio, soja moída e farelo de arroz por um período de 168 horas (Figura 13 B-G). Quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e bagaço de cana-de-açúcar explodido o fungo não foi capaz de se desenvolver. Estes resultados podem ser decorrentes dos efeitos do pré-tratamento. Se o pré-tratamento for muito drástico, ocorre a degradação da fração celulósica, além da formação de inibidores da fermentação, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), decorrente da reação de desidratação da xilose e da glicose, respectivamente. Esses compostos, quando presentes na fermentação, podem danificar a parede celular dos microrganismos bem como prolongar a fase “lag” de crescimento (SENDELIUS, 2005; MUSSATO et al., 2004; CHENG et al., 2008).

Figura 13. Crescimento do fungo *A. labruscus* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar (A) após 480 horas, casca de mandioca (B), farelo de aveia (C), farelo de trigo (D), farinha de centeio (E), soja moída (F) e farelo de arroz (G) por 168 horas a 25°C.



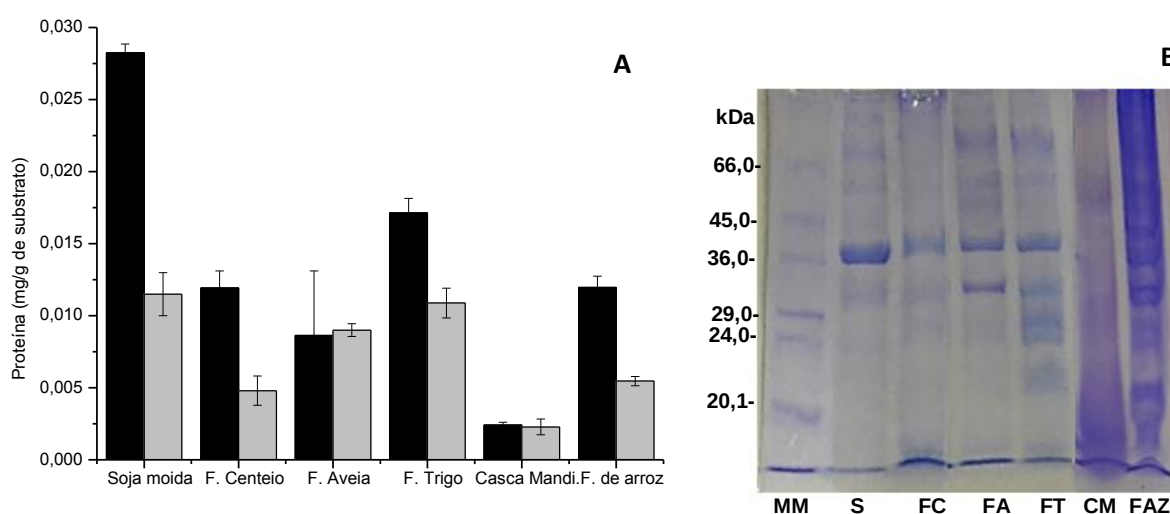
Fonte: Autora

Ao analisar os cultivos visualmente, é possível observar que os meios contendo casca de mandioca, farelo de aveia e farinha de centeio favoreceram o crescimento diferenciado (cobertura total do meio de cultivo pelo fungo *A. labruscus*), em comparação ao farelo de trigo, soja moída e farelo de arroz. Além disso, foi possível visualizar a esporulação do fungo em todos os cultivos analisados, apresentando coloração preta, conforme descrito por Fungaro et al. (2017).

Após a obtenção do extrato enzimático da FES com os substratos casca de mandioca, farelo de aveia, farelo de trigo, farinha de centeio, soja moída e farelo de arroz, nas condições de ensaios mencionadas anteriormente, as proteínas foram quantificadas. Cada experimento contou com a presença de um controle onde, paralelamente, os substratos foram incubados nas mesmas condições dos cultivos de *A. labruscus*, porém sem o fungo inoculado. Como é possível observar na Figura 14 A, *A. labruscus* apresentou baixa produção proteica, quando comparado aos seus respectivos controles (ausência de crescimento fúngico), com exceção do cultivo com farelo de aveia, para o qual obteve-se uma produção proteica ligeiramente maior que a obtida do seu respectivo controle. Uma possível explicação para esta baixa produção nos cultivos selecionados seria a possível presença da enzima protease secretada pelo fungo durante seu desenvolvimento, que hidrolisaria as proteínas presentes no meio, já que os substratos contêm alto níveis proteicos. Na Figura 14 B,

é possível analisar as bandas proteicas por SDS-PAGE (12%) obtidas após cultivos de *A. labruscus* em FES.

Figura 14. Quantificação de proteínas na presença (□) e ausência (■) de *A. labruscus* em FES com diferentes substratos (A) e eletroforese SDS-PAGE (12%) dos cultivos na presença de *A. labruscus* em diferentes substratos. S: soja moída, FC: farinha de centeio, FA: farelo de aveia, FT: farelo de trigo, CM: casca de mandioca, FAZ: farelo de arroz, MM: marcador de massa molecular.



Fonte: Autora.

Nota-se que na Figura 14 B existem bandas proteicas semelhantes para a maioria dos cultivos analisados, indicando que apesar da diferença de composição entre os substratos utilizados, proteínas similares são produzidas, porém com diferentes intensidades. Nota-se a presença de uma banda proteica mais intensa com massa molecular estimada em 36,8 kDa para o cultivo na presença de soja moída, uma de 39,06 kDa no cultivo com farinha de centeio e outras duas com massa molecular de 40,9 kDa para os cultivos na presença de farelo de aveia e farelo de trigo. Algumas bandas menos intensas, entre 24 e 36 kDa, foram também observadas. Algumas das bandas proteicas obtidas para os diferentes cultivos podem corresponder às enzimas dos complexos celulolítico e hemicelulolítico. Alguns estudos, como o realizado por Ito et al. (1992), apontam massas moleculares de xilanases de *A. kawachii* IFO 4308 variando de 26 a 35 kDa. Os autores Fernández-Espinar et al. (1992) relataram massas moleculares de xilanases produzidas por *A.*

nidulans de 22,9 kDa e 34,3 kDa. Já para as enzimas celulolíticas, a massa molecular pode variar de 42 a 200 kDa. Por exemplo, a endoglucanase de *Aspergillus niger* HO com massa molecular de 55 kDa (RAWAT et al., 2015) e as β -glicosidases de diferentes linhagens de *Aspergillus niger* com massas moleculares variando entre 68 a 220 kDa (NARASIMHA et al., 2015).

Na Figura 14 B é possível observar ainda massas moleculares acima de 66 kDa nos cultivos com soja moída (71,8 kDa), farelo de aveia (74 kDa) e farelo de trigo (74 kDa), as quais podem corresponder às β -glicosidases. A presença de uma banda proteica estimada em 47,03 kDa, sugere a presença de endoglucanase. No item 4.3 serão analisadas as produções enzimáticas de celulasas e xilanases para constatação da presença de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas secretadas por *A. labruscus* nos cultivos em FES.

4.3 Produção de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico por *A. labruscus*

Na Tabela 3 é possível verificar que a atividade celulásica total foi baixa em todas as condições de cultivo de *A. labruscus*, diferindo da atividade de endoglucanase, a qual foi maior quando o fungo foi cultivado em soja moída (5,1 U/g de substrato), seguido do cultivo em farelo de aveia (3,51 U/g de substrato) e em farelo de trigo (2,95 U/g de substrato). Os autores Zúñiga et al. (2011) obtiveram produção enzimática do fungo *Aspergillus niger* para celulase total e endoglucanase de 0,4 U/g de substrato e 13 U/g de substrato em farelo de trigo, respectivamente, em 72 horas de fermentação. Os autores Shamala e Sreekantiah (1986) obtiveram produção de endoglucanase, para o fungo *Aspergillus ustus*, de 11,8 U/g de substrato quando cultivado em farelo de trigo. Para *Aspergillus niger* (NCIM 548) cultivado em uma mistura de farelo de trigo, farelo de milho e polpa de tangerina, a produção de endoglucanases foi de 10,77 U/g de substrato (KUMAR; SHARMA; SARKAR, 2011).

Tabela 3. Produção de celulase total (FPase), endoglucanase (CMCase), β -glicosidase e xilanase pelo fungo *A. labruscus* cultivado em FES por 168 horas a 25°C utilizando diferentes substratos.

Substratos	Atividade enzimática U/g de substrato			
	FPase (FPU)	CMCase	β -glicosidase	Xilanase
Farelo de aveia	0,01*	3,51 $\pm$ 0,24	6,35 $\pm$ 0,32	35,44 $\pm$ 1,41
Farelo de Trigo	0,03 $\pm$ 0,01	2,95 $\pm$ 0,08	4,41 $\pm$ 0,01	74,83 $\pm$ 5,37
Soja moída	0,01*	5,1 $\pm$ 0,29	4,33 $\pm$ 0,21	37,44 $\pm$ 6,12
Casca de Mandioca	0,02 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,2	0,58 $\pm$ 0,02	12,38 $\pm$ 1,96
Farinha de centeio	0,02*	2,42 $\pm$ 0,44	2,11 $\pm$ 0,08	44,23 $\pm$ 5,16
Farelo de arroz	0*	0,44 $\pm$ 0,2	0,21 $\pm$ 0,08	6,35 $\pm$ 1,06

* Desvio médio padrão < 0,01

Fonte: Autora.

A maior produção xilanásica foi obtida a partir do cultivo em farelo de trigo (74,83 U/g de substrato), aproximadamente 65 vezes maior se comparada ao cultivo em farelo de arroz e cerca de 6 vezes maior se comparada ao cultivo em soja moída. De acordo com Zúñiga (2010), o fungo *Aspergillus niger* apresentou produção xilanásica de 23 U/g de farelo de trigo. Como descrito por Yamane et al. (2002), o fungo *Aspergillus oryzae* apresentou produção xilanásica de 60 U/g de farelo de trigo. De acordo com Sherief, El-Tanash e Atia (2010), o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou produção xilanásica, em farelo de trigo, de 32,7 U/g de substrato, enquanto para *Aspergillus niger* (2B.361 U2/1) a produção foi de 40,4 U/g de substrato quando cultivado em bagaço de uva (BOTELLA et al., 2005) e de 219 U/g de substrato quando *Trichoderma reesei* SAF3 (MTCC4876) foi cultivado em farelo de trigo (KAR et al., 2013). Desta forma, a atividade xilanásica obtida para *A. labruscus* em FES com farelo de trigo foi maior do que alguns dados reportados anteriormente para o mesmo gênero fúngico.

Possivelmente, a produção de xilanase por *A. labruscus* em farelo de trigo se deu pelo fato de que este resíduo, oriundo do processamento da farinha de trigo, é formado por tecidos botânicos distintos, como o pericarpo (película que recobre grão,

rico em pentosanas, celulose e cinzas), a testa (película que recobre a semente), a camada hialina e a aleurona (rica em cinzas, proteínas, lipídios, vitaminas e enzimas), que são as partes externas do endosperma (composto basicamente de amido) (EVERS; MILLAR, 2002). De forma geral, o farelo de trigo constitui-se de uma mistura heterogênea de compostos como celulose, hemicelulose, lignina e xilanos complexos (polissacarídeos constituídos por uma cadeia linear de resíduos de xilose) (LIU et al., 2011).

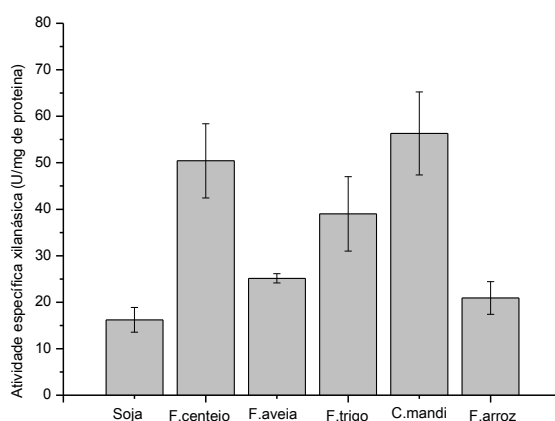
Para a β -glicosidase, foi possível constatar que as maiores produções foram as obtidas na presença do farelo de aveia e do farelo de trigo, 6,35 U/g de substrato e 4,41 U/g de substrato, respectivamente. Segundo os autores Nishida et al. (2013), a maior produção enzimática de β -glicosidase para *Aspergillus niger* cultivado em farelo de trigo foi de 7,62 U/g de substrato e para o *Aspergillus tamarii* foi de 6,48 U/g de substrato, com 7 dias de cultivo. A maior produção de β -glicosidase por *Aspergillus fumigatus*, na presença de farelo de trigo, foi de 6,1 U/g de substrato (SHERIEF; EL-TANASH; ATIA, 2010). O fungo *Acremonium zeae* (EA0802), quando cultivado em palha de milho, apresentou produção β -glicosidásica de 0,01 U/g de substrato (ALMEIDA et al., 2011) enquanto para *Fusarium oxysporum*, cultivado neste mesmo substrato, a produção foi de 0,14 U/g de substrato (PANAGIOTOU et al., 2003). *Trichoderma viride* (GIM 3.0010), quando cultivado em casca de banana, apresentou produção de β -glicosidase de 3,01 U/g de substrato (SUN et al., 2011). Portanto, a produção β -glicosidásica por *A. labruscus* apresenta-se próxima a alguns dos dados encontrados na literatura para o mesmo gênero fúngico e superior quando comparadas com outros gêneros fúngicos cultivados em biomassa lignocelulósica.

Os valores de atividades endoglucanásica e β -glicosidásica de *A. labruscus* cultivado em farelo de trigo estão próximos aos relatados por outros autores para diferentes espécies fúngicas. Por outro lado, a atividade xilanásica apresentou-se maior quando comparado ao reportado em outros trabalhos para espécies fúngicas do gênero *Aspergillus*. Vale ressaltar que estes são os primeiros dados, até o momento, da produção de celulasas e xilanases determinados para este fungo.

Considerando a maior atividade de xilanases por *A. labruscus* em FES utilizando farelo de trigo, voltou-se o foco do estudo para esta hemicelulase. Portanto, a partir deste momento serão apresentados apenas os resultados obtidos para xilanases. Na Figura 15 pode-se observar os valores de atividades específicas para as xilanases produzidas por *A. labruscus* nos cultivos em FES com diferentes

substratos. Apesar da maior produção xilanásica ter sido observada na presença de farelo de trigo, as maiores atividades específicas foram obtidas para o cultivo do fungo utilizando casca de mandioca (60 U/mg de proteína) e farinha de centeio (50 U/mg de proteína) como substratos. Contudo, o farelo de trigo foi escolhido como substrato para a produção de xilanases por *A. labruscus*, levando-se em consideração que o foco deste trabalho não considera a purificação, para a qual seriam interessantes condições que levassem a maior atividade específica.

Figura 15. Determinação da atividade específica xilanásica obtidas de diferentes cultivos de *A. labruscus* em FES.

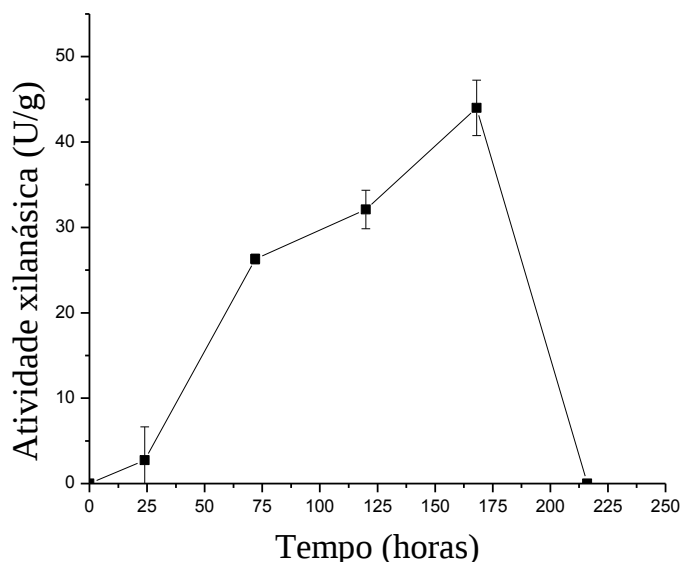


Fonte: Autora.

4.4 Produção de xilanase em função do tempo de cultivo utilizando farelo de trigo em FES

O tempo de fermentação necessário para obter a máxima produção de xilanase por fungos varia de uma espécie para outra. *A. labruscus* apresentou a maior produção de enzimas xilanolíticas (Figura 16) no período de 168 horas (7 dias), não apresentando atividade quando a fermentação se estendeu por 216 horas (9 dias).

Figura 16. Influência do tempo de cultivo de *A. labruscus* na produção de xilanase. Cultivo realizado em FES, tendo farelo de trigo como substrato a 25°C.



Fonte: Autora.

Sendo assim, o período de 168 horas foi fixado como o melhor tempo para produção de xilanase por *A. labruscus*. Este período, ou seja, 168 horas, foi semelhante ao obtido no estudo dos autores Fungaro colaboradores (2017) que observaram esse mesmo tempo de cultivo como o ideal para a produção de tanases e caseinases por *A. labruscus* na produção de tanases e caseinases em meio Czapeck ágar.

4.5 Efeito de diferentes soluções umectantes na produção xilanásica

Visando avaliar a melhor condição para a produção de xilanases em FES, na presença de farelo de trigo, diferentes soluções foram utilizadas para umidificar o substrato, nas proporções 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2 (m/v). Na Tabela 4 é possível observar que a maior produção de xilanase ocorreu na presença de água de torneira na proporção 1:2 (m/v) e a melhor produção da enzima na presença de soluções salinas ocorreu quando utilizou-se sais SR. Já a solução de sais de Vogel inibiu

completamente o crescimento fúngico. Este fato pode ser explicado, possivelmente, pela diferença de componentes presentes nas soluções salinas.

Nas três soluções salinas analisadas há a presença de fosfato monopotássico, em concentrações diferentes: 0,3% (sais SR), 1,3% (sais de Khanna) e 2,5% (sais de Vogel). Nas soluções de sais de Khanna e de Vogel há a presença de nitrato de amônio nas concentrações 2% e 1%, respectivamente, e na solução de sais de Vogel há a particularidade da presença de clorofórmio (0,05%), cloreto de cálcio (0,05%) e citrato de sódio (1,5%). Desta forma, pode ser possível que algum destes componentes, presentes exclusivamente na solução de sais de Vogel, tenha exercido ação inibitória sobre a produção enzimática pelo microrganismo.

Tabela 4. Efeito de diferentes agentes umectantes, em diferentes proporções, adicionadas à FES sobre a produção de xilanase por *Aspergillus labruscus* na presença de farelo de trigo.

Agentes umectantes	Atividade enzimática (U/g substrato)			
	Proporções (m/v)			
	1:0,5	1:1	1:1,5	1:2
Água de torneira	27,4 ± 5,7	32 ± 1	33 ± 0,8	53,3 ± 2,9
Água destilada	42,7 ± 0,8	45,5 ± 1,3	38,5 ± 1,5	33,1 ± 1,8
Sais de Khanna	22,1 ± 0,2	18,2 ± 5	34,2 ± 0,2	25,1 ± 0,1
Sais SR	24,2 ± 1,5	33,5 ± 0,5	37,9 ± 1	34,4 ± 0,5
Sais de Vogel	0	0	0	0

Os cultivos foram realizados por 168 horas à 25 °C.

Fonte: Autora.

A água de torneira é uma solução que contém sais e íons em baixas concentrações, como ppm (partes por milhão) e pode ter compostos que também contribuam para o desenvolvimento do microrganismo, e conseqüentemente, para a produção da enzima (GONÇALVES, 2013). De acordo com o Departamento de Águas e Esgotos de Ribeirão Preto, a composição da água de torneira utilizada é: Al (0,009 mg/L), Fe (0,008 mg/L), Fluoreto (0,2 mg/L), N (0,019 mg/L), Cl (1,15 mg/L).

4.6 Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade xilanásica

A determinação da temperatura e pH ótimo de reação enzimática é de extrema importância, pois estes dois fatores afetam diretamente na atividade enzimática. A velocidade de uma reação, dentro de certos limites, aumenta com o aumento da temperatura, pois este fator provoca maior agitação das moléculas aumentando as possibilidades delas se chocarem para reagir. Contudo, se determinada temperatura for ultrapassada, a agitação das moléculas se torna tão intensa que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se rompem e ela se desnatura (NELSON; COX, 2014).

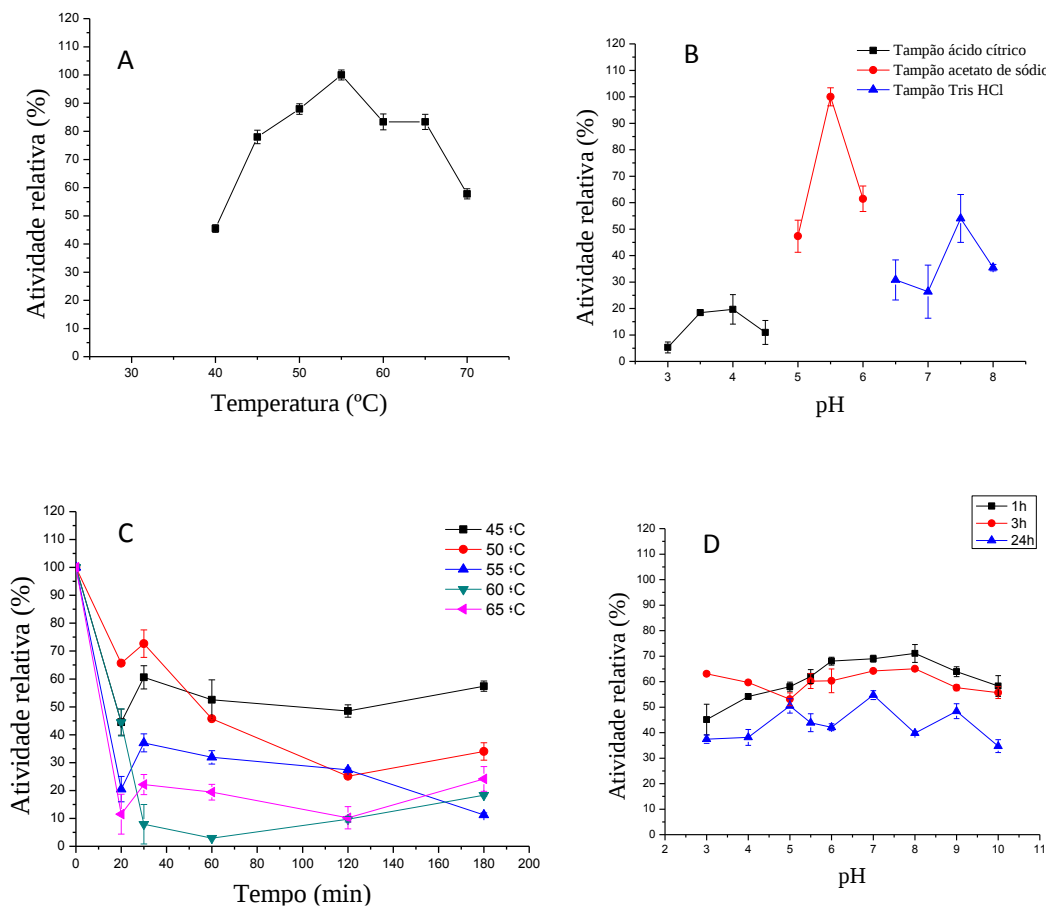
O grau de acidez do meio, pH, também afeta diretamente a molécula proteica pois as cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo podem funcionar como ácidos ou bases fracas em funções críticas que dependem da manutenção de certo estado de ionização, e em outras partes da proteína as cadeias laterais ionizáveis podem ter uma participação essencial nas interações que mantêm a estrutura proteica (NELSON; COX, 2014).

Considerando os níveis significativos de produção xilanásica obtidas nos cultivos contendo farelo de trigo, na Figura 17 A e B são apresentados os resultados obtidos para temperatura ótima e pH ótimo de atividade da xilanase produzida por *A. labruscus*. Como pode-se observar na Figura 17 A, a temperatura ótima de reação para a xilanase de *A. labruscus* foi de 55°C. Em temperaturas superiores, houve redução da atividade enzimática, chegando a 45% a 70°C, fator importante a ser considerado já que a enzima mantém mais da metade da sua atividade em temperaturas consideradas elevadas. Analisando estudos semelhantes, os autores Betini et al. (2009) obtiveram resultados de temperatura ótima de atividade xilanásica para *Aspergillus niveus* de 55-65°C, quando cultivados em FES na presença de farelo de trigo e Carmona et al. (1997) obtiveram temperatura ótima de atividade de 55°C para a xilanase produzida por *A. versicolor* quando cultivado em meio Vogel suplementado com farelo de trigo. Farinas et al. (2010) obtiveram, para a xilanase de *Aspergillus niger*, temperatura ótima de 55°C quando o fungo foi cultivado em FES na presença de farelo de trigo. Os autores Ahmad, Butt e Riaz (2013) analisaram a temperatura ótima de atividade de xilanases de *Aspergillus niger* quando cultivado em farelo de trigo e obtiveram os melhores resultados na temperatura de 60°C. Xilanases

extracelulares produzidas por *Aspergillus caespitosus* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar apresentaram temperatura ótima na faixa de 50-55°C (SANDRIM et al., 2005).

O pH ótimo de reação da atividade xilanásica foi de 5,5, ocorrendo queda até o pH 7,0, como pode ser observado na Figura 17 B. Contudo, há a presença de um segundo pico de atividade em pH 7,5, o que pode indicar a possível presença de uma isoforma, ou seja, outra xilanase, fenômeno já observado por outros autores como, por exemplo, para o fungo *Aspergillus niger* (AHMAD, BUTT e RIAZ, 2013). O mesmo valor de pH ótimo (5,5) obtido neste estudo pode ser observado nos estudos de Sandrim et al. (2005) para a enzima de *Aspergillus caespitosus* e nos estudos de Betini et al. (2009) para as xilanases de *Aspergillus niveus* (pH 5,0- 5,5) e de *Aspergillus niger* (pH 5,5 – 6,0).

Figura 17. Determinação de temperatura ótima (A), pH ótimo (B), estabilidade térmica (C) e estabilidade ao pH (D) para xilanase contida no extrato bruto obtido do cultivo de *A. labruscus* em FES utilizando farelo de trigo como substrato. 100% corresponde a 72,9 U/g de substrato.



Fonte: Autora.

A estabilidade térmica e ao pH foram verificadas para a xilanase contida no extrato bruto. Com relação à estabilidade térmica, é possível observar que a atividade xilanásica manteve-se acima dos 50% na temperatura de 45°C ao longo de todo tempo analisado (Figura 17 C) e, quando mantida em sua temperatura ótima de reação (55°C), a enzima apresentou tempo de meia vida (T_{50}) de 20 minutos, sendo que o mesmo pode ser observado nas temperaturas de 60°C e 65°C. A xilanase de *Aspergillus casielus* foi estável na temperatura de 45°C, perdendo apenas 18% de sua atividade aos 90 minutos (KRONBAUER et al., 2007) e a de *Aspergillus fumigatus* SK1 apresentou-se estável a 40°C, ficando a atividade enzimática acima de 80% por 120 minutos (ANG et al, 2013). A xilanase de *Aspergillus awamori* IOC-3914 foi estável entre 30°C e 40°C, mantendo sua atividade acima de 90% por 240 minutos (AMORIM et al., 2017).

Para estabilidade ao pH (Figura 17 D), foi obtido T_{50} de 3 horas quando a amostra enzimática foi mantida entre pH 5,5 e 10,0. Quando a xilanase foi incubada por 24 horas, sua atividade manteve-se entre 35% e 50% para a maioria dos valores de pH analisados. Amorin et al. (2017) verificaram que a xilanase de *Aspergillus awamori* IOC-3914 foi estável nos pH 5,0-7,0 por um período de até 3 horas de incubação. Segundo Polizeli et al. (2005), a maioria das xilanases de diferentes espécies de *Aspergillus* mantém estabilidade entre pH 4,0 e 6,0. Portanto, as xilanases de *A. labruscus* apresentam estabilidade em maior faixa de pH do que os reportados pela literatura para este gênero.

4.7 Efeito de diferentes compostos na atividade xilanásica

O efeito da adição de diferentes compostos na atividade xilanásica foi analisado em condições ótimas de temperatura e pH ótimo da atividade da enzima. De maneira geral (Tabela 5), a atividade enzimática da xilanase foi reduzida pela maioria dos diferentes sais e compostos utilizados na reação, destacando-se a utilização de FeCl_3 (1 mmol.L^{-1}) que reduziu a atividade enzimática para cerca de 6%, se comparada a condição na ausência de sais, diferindo do reportado para atividade da xilanase de *Bacillus* sp., onde este mesmo sal, na mesma concentração, não inibiu a atividade enzimática (BATAILLON et al., 2000). Para xilanase de *Aureobasidium pullulans*, o cloreto de ferro reduziu a atividade em 30%, segundo estudos de Yegin (2017). Cloreto de bário e cloreto de magnésio reduziram a atividade enzimática cerca de 65%, diferindo do sulfato de manganês, que possibilitou a manutenção da atividade enzimática

Os compostos que afetaram, de forma menos drástica, a atividade catalítica foram MnCl_2 e MnSO_4 , ambos na concentração de 1 mmol.L^{-1} , mantendo a atividade acima de 80%, sendo encontrado na literatura que a utilização de íons de magnésio e manganês, na concentração de 10 mmol.L^{-1} , aumentaram a atividade relativa de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* HML 366 em 46% e 22%, respectivamente (HE et al., 2015). Para xilanase de *Aureobasidium pullulans*, quando utilizado cloreto de magnésio na concentração de 5 mmol.L^{-1} , a atividade aumentou em 12% (YEGIN, 2017) e, para xilanase de *Aspergillus nidulans*, a atividade foi

aumentada em 13,6% quando utilizada a concentração de 2 mmol.L⁻¹ e 30% quando a concentração estava em 10 mmol.L⁻¹ (MAITAN-ALFENAS et al., 2016).

Tabela 5. Efeito de diferentes compostos na atividade xilanásica de *A. labruscus*. 100% corresponde a 72,9 U/g de substrato.

Compostos	Atividade relativa (%)
Controle	100
Sais (1 mmol.L⁻¹)	
AgNO ₃	69,96 ± 4,93
BaCl ₂	36,15 ± 5,22
CaCl ₂	47,60 ± 2,32
CoCl ₂	72,70 ± 5,62
CuCl ₂	49,79 ± 3,10
CuSO ₄	60,77 ± 1,16
Fe ₂ (SO ₄) ₃	53,64 ± 2,32
FeCl ₃	6,04 ± 2,52
MgCl ₂	36,63 ± 0,58
MgSO ₄	35,12 ± 1,35
MnCl ₂	82,72 ± 1,87
MnSO ₄	105,83 ± 7,55
NaCl	58,98 ± 3,47
NH ₄ Cl	68,72 ± 5,71
ZnSO ₄	55,69 ± 6,20
Detergentes	
SDS (1 mmol.L ⁻¹)	24,01 ± 2,32
Tween-20 (0,01%)	49,04 ± 9,40
Solvente (1%)	
Acetona	37,11 ± 8,43
Acetonitrila	33,13 ± 4,94
Butanol	24,42 ± 5,39
Etanol	44,10 ± 9,79
Isopropanol	42,94 ± 3,38
Metanol	51,71 ± 3,19
Outros	
EDTA (1%)	34,09 ± 1,64
Ureia (1 mmol.L ⁻¹)	35,60 ± 3,28
β-mercaptoetanol (1 mmol.L ⁻¹)	41,36 ± 4,17

Fonte: Autora.

Quando submetida à presença de sulfato de cobre, a atividade xilanásica de *Aspergillus labruscus* foi reduzida em 40%. Segundo Maitan-Alfenas et al. (2016), uma das xilanases (XlnB) de *Aspergillus nidulans* foi completamente inativada na presença deste sal na concentração de 2 mmol.L⁻¹, enquanto que uma segunda

xilanase (XlnC) produzida pelo mesmo fungo teve sua atividade reduzida em apenas 6%, indicando que existem diferentes isoformas de xilanases que diferem quanto sua resistência à presença de íons.

Possivelmente, as inibições decorrem do fato de que as enzimas podem ser moduladas pelas interações de cátions com resíduos de aminoácidos no sítio ativo da molécula. Estas interações podem aumentar (modulação positiva) ou diminuir (modulação negativa) a atividade enzimática ao interagir com a amina ou o grupo ácido carboxílico dos aminoácidos (DAMASO; ANDRADE; PEREIRA Jr, 2002. ISHIDA et al., 1980).

Na presença de SDS (1 mmol.L^{-1}) a atividade xilanásica foi reduzida em torno de 75%, diferente de alguns dados encontrados na literatura. A xilanase de *Aspergillus nidulans* foi inativada completamente quando submetida à adição deste composto na concentração de 2 mmol.L^{-1} (MAITAN-ALFENAS et al., 2016) e as xilanases de *Aureobasidium pullulans* foram, também, inativadas com a concentração de 5 mmol.L^{-1} de SDS (YEGIN, 2017). O SDS interfere nas regiões hidrofóbicas das proteínas, alterando sua estrutura tridimensional podendo causar a desnaturação (NELSON; COX, 2014). Assim como o SDS, Tween-20 também é um surfactante que pode causar desnaturação enzimática, e para as xilanases de *A. labruscus* foi o responsável por diminuir em 50% sua atividade catalítica.

Com relação à adição de EDTA, este é um agente quelante composto por pares de elétrons disponíveis que podem complexar e inativar íons metálicos, como cálcio, ferro, cobre e magnésio (PEREIRA et al., 2017; FRANÇOSO, 2013). Quando na formação de complexos, estes podem bloquear os sítios ativos das enzimas, podendo reduzir a atividade enzimática (SANTOS, 2009). A presença de íons metálicos formam ligações cruzadas internas na proteínas que estabilizam a estrutura terciária e, quando removidos, podem comprometer a estrutura e levar a desnaturação (MOTTA, 2007). No entanto, algumas enzimas podem não ser dependentes de íons metálicos durante a catálise (DO et al. 2013). Pode-se observar que a atividade xilanásica de *A. labruscus* não apresentou resistência ao EDTA, por consequência, tendo sua atividade diminuída em 65%. A xilanase de *Aspergillus niger* sofreu ativação na presença de EDTA (5% v/v), aumentando em 28% a atividade relativa (DO et al., 2013). As xilanases, Xyl I e Xyl II de *Aspergillus caespitosus* mantiveram suas atividades relativas em 98% e 99%, respectivamente, na presença de EDTA 1 mmol.L^{-1} (SANDRIM et al., 2005). Essa diferença de resistência para essas xilanases se

devem a existência das formas múltiplas da enzima, ou seja, isorfomas de xilanases, que são capazes de catalisar a mesma reação, mas podem diferir entre si na estrutura primária, afinidade pelo substrato, velocidade máxima de reação e/ou propriedades reguladoras (NELSON; COX, 2014).

Na presença do agente redutor β -mercaptoetanol (1% v/v), a atividade xilanásica foi reduzida em 60%, devido a possível ruptura das ligações dissulfetos, resultando em grupamentos dissulfidricos, comprometendo a estrutura terciária da proteína (CHEN et al., 2011). Do et al. (2013) analisaram a resistência da xilanase de *Aspergillus niger* frente ao β -mercaptoetanol (5% v/v) e obtiveram uma redução de 25% na atividade relativa. Sandrim et al. (2005) observaram estimulação da atividade enzimática para as xilanases de *Aspergillus caespitosus* na presença de β -mercaptoetanol 0,25 mmol.L⁻¹, tendo suas atividades relativas aumentadas em 8% para Xyl I e 58% para Xyl II. As xilanases de *A. labruscus* não foram resistentes a este agente redutor, se comparado com os dados mencionados na literatura para linhagem do mesmo gênero fúngico.

Na presença de uréia, a xilanase de *A. labruscus* teve sua atividade reduzida em 65%. A uréia é um composto que altera a conformação da estrutura tridimensional da proteína, podendo levar a desnaturação da mesma (ALVES, 2017).

Na presença de solventes (butanol, etanol, isopropanol e metanol, na concentração de 1% v/v), a atividade xilanásica de *A. labruscus* manteve-se abaixo dos 50%. Do et al. (2013) observaram que a atividade relativa da xilanase de *Aspergillus niger* foram mantidas entre 40% e 60% na presença de butanol, etanol e metanol (2% v/v). Os autores Hmida-Sayari et al. (2012) relataram que a adição de etanol, isopropanol, butanol e metanol, na concentração de 1% (v/v), estimularam o aumento da atividade relativa da xilanase de *Aspergillus niger* em 26%, 24%, 23% e 17%, respectivamente. Solventes orgânicos são utilizados para solubilizar substratos hidrofóbicos, com a finalidade de facilitar a hidrólise enzimática (DO et al., 2013), entretanto, as xilanases de *A. labruscus* apresentaram baixa resistência a estes solventes, se comparados com os dados citados na literatura.

5 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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