

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

“Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de
xilanase”

ERICA APARECIDA DE OLIVEIRA SANTOS

ILHA SOLTEIRA

2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

“Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de xilanase”

ERICA APARECIDA DE OLIVEIRA SANTOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP - Campus de Ilha Solteira, para obtenção do título de Mestre em Agronomia: Especialidade: Sistemas de Produção.
Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado
Orientador
Prof. Dr. Miguel Luiz Menezes Freitas
Co-orientador

ILHA SOLTEIRA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

S237i Santos, Erica.
Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de xilanase /
Erica Santos. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2012
61 f. : il.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2012
Orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado
Inclui bibliografia
1. Enzimas microbianas. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Neosartorya spinosa.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de xilanase

AUTORA: ERICA APARECIDA DE OLIVEIRA SANTOS

ORIENTADORA: Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MIGUEL LUIZ MENEZES FREITAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA ,
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / Universidade Federal da Grande Dourados

Data da realização: 31 de julho de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico todo este trabalho ao Único que é digno de receber toda Honra, toda Glória e Todo louvo, ao qual eu nada teria feito se não por sua tão grande misericórdia, aquele que me deu a vida eterna. Ao nosso Senhor Jesus Cristo.

*“Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar,
e tempo de arrancar o que se plantou;
Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantejar, e tempo de dançar;
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar,
e tempo de afastar-se de abraçar;
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;
Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;
Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.
Que proveito tem o trabalhador naquilo em que trabalha?
Tenho visto o trabalho que Deus deu aos filhos dos homens,
para com ele os exercitar.
Tudo fez formoso em seu tempo; também pôs o mundo no coração do homem,
sem que este possa descobrir a obra que Deus fez desde o princípio até ao fim.
Já tenho entendido que não há coisa melhor para eles do que alegrar-se
e fazer bem na sua vida;
E também que todo o homem coma e beba, e goze do bem de todo o seu
trabalho; isto é um dom de Deus.
Eu sei que tudo quanto Deus faz durará eternamente; nada se lhe deve
acrescentar, e nada se lhe deve tirar; e isto faz Deus para que haja temor diante
dele.*

Eclesiastes 3: 1 - 14

AGRADECIMENTOS

Após uma jornada de lutas e provações vem à vitória, e neste momento tenho tanto a agradecer e a tantas pessoas homenagear. Quero dizer a todos que estiveram do meu lado, nos bons e nos maus momentos, sempre me dando apoio, muito obrigada pelo carinho e pelas orações de todos.

Primeiramente agradeço a Deus, porque ele é o único responsável pela minha vitória, por ter me consolado e me fortalecido nos momentos de dificuldade.

Ao meu namorado e companheiro, Mateus Prado Bistratini, por ter estado ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, me amparando nas horas difíceis, me dando conselhos e me ajudando sempre que eu precisava, e orando por mim.

Aos meus pais, Dalmir Luz dos Santos e Maria Margarida de Oliveira Santos pelo amor e por sempre se preocuparem comigo e me apoiarem.

As minhas irmãs, Fernanda Cristina dos Santos e Layla Gabriella dos Santos, por todo amor, carinho e companheirismo.

Aos meus sogros Mateus Antonio Bistratini e Denize Prado Bistratini pelo carinho e por sempre me colocarem em suas orações.

Ao meu Pastor Nelson Leomar Gewehr, e a todos os irmãos da Igreja Batista Central de Ilha Solteira, pelo apoio e pelas orações.

Aos meus amados amigos Samanta Cristiene de Oliveira, Patrick Roberto de Almeida, Heidi de Oliveira Batista, Sarah Caetano de Freitas Gewehr, Vania Batista Schunck Flose Jardim, Mariana Ceresini Teixeira Neto, Samuel Ceresini, Leonardo Zampelim, Mariel Vieira, Luciene Vitoriano, Milene Micheli Gewehr, Anderson Alves, Luciele Pascoaloto, Camila Pascoaloto, Victor Kondo, Vinicius de Souza Rezende da Silva, Eli Jorge da Cruz, Paulo Antonio da Silva, Daniele Penteado, muito obrigada pela amizade, pelo apoio e pelas orações, que foram essenciais nos momentos decisivos.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a.Heloiza Ferreira Alves do Prado, por ter me aceitado nesse desafio, pela orientação, pelos ensinamentos durante o mestrado pela paciência, pelo profissionalismo, confiança, amizade, pelas conversas descontraídas e pelo exemplo de pessoa e profissional.

A todos os meus companheiros de luta do laboratório de biotecnologia da Unesp de Ilha Solteira, Pedro, Carolina, Aline e Islaine por todo apoio e ajuda, nessa fase de tantos aprendizados.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS), em especial ao técnico do laboratório de Biotecnologia José Hernandez Correa pela ajuda e ensinamento.

A todos os professores da FEIS pelos ensinamentos passados.

Ao prof^o. Dr. e coordenador da sessão de pós-graduação Mario Luis Teixeira de Moraes, por toda ajuda e confiança durante todo o tempo de trabalho e por ter me dado a oportunidade de crescer e ampliar meus conhecimentos.

A CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao programa de pós-graduação da FEIS.

Há todos muito obrigada, pois cada um teve uma contribuição para que esse trabalho fosse concluído.

RESUMO

Celulose e hemicelulose são os polissacarídeos mais encontrados em todo o mundo. Em plantas, a celulose e a hemicelulose estão situados entre a lignina formando as fibras de celulose. As enzimas hemicelulolíticas produzidas por micro-organismos têm atraído uma grande atenção desde a década passada, particularidade devida as suas características biotecnológicas em vários processos industriais como indústrias de alimentos, ração animal, etanol e papel e celulose. Assim neste trabalho foram isoladas linhagens fungicas de duas regiões de Cerrado, na qual oito linhagens fúngicas foram analisadas quanto ao perfil de produção enzimática sob fermentação em estado sólido, utilizando resíduo agroindustrial como substrato. Foram determinadas atividade enzimática para xilanase e CMCase. A melhor atividade enzimática para xilanase obteve-se a partir do fungo mesofílico *Neosartorya spinosa* P2D19 com 20,6 U ml⁻¹ (133,0 U/g), após 72 horas de cultivo sob fermentação em estado sólido. A enzima mostrou-se mais ativa em pH 5,0, porém cerca de 85% da atividade foi mantida em pH 7,5. A temperatura ótima dessa xilanase foi em 60 °C.

Palavras Chave: Fungos. Enzimas microbianas. Resíduos agroindustriais. *Neosartorya spinosa*.

ABSTRACT

Cellulose and hemicellulose are polysaccharides found all over the world. In plants, the cellulose and hemicellulose are located between the lignin forming the cellulose fibers. Hemicellulolytic enzymes produced by microorganisms has attracted great attention over the past decade due to its special features in several biotechnological industrial processes such as food industries, animal feed, ethanol and pulp and paper. In this study, fungal strains were isolated from two Cerrado areas, from which eight fungal strains were analyzed for enzyme production profile in solid fermentation state using agro industrial residue as substrate. Enzyme activity was determined for xylanase and CMCase. The highest xylanase enzyme activity was obtained with fungi mesophilic *Neosartorya spinosa* strain P2D16 with 20.6 U.ml⁻¹ (133 U/g) after 72 hours of cultivation under solid fermentation state. The enzyme was more active at pH 5.0, although of its 85% activit was maintained at pH 7.5. The optimum temperature for xylanase activity was 60°C.

Keywords: Fungi. Microbial enzymes. Agroindustrial waste. *Neosartorya spinosa*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização do Cerrado. Fonte: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2009..... 15
- Figura 2.** Cerrado na região de Pirenópolis, Goiás. Fonte: WIKIPEDIA, 2011. 17
- Figura 3.** Esquema da célula vegetal com detalhes das diferentes camadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3), a parede primária e a lamela média entre as paredes primárias de células adjacentes. Fonte: KRETSCHMANN, 2003. 18
- Figura 4.** Parede celular primária e suas estruturas. Fonte: Estrutura da parede celular vegetal, 2012. 18
- Figura 5.** Estruturas parciais dos componentes lignocelulósicos e derivados. Fonte: Ferreira e Rocha, (2009) 20
- Figura 6.** Representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal: ligações entre moléculas de glucose (A) e interações entre as cadeias lineares adjacentes para a formação da fibrila elementar (B); associação entre quatro fibrilas elementares adjacentes (C), hemicelulose e lignina para a formação da microfibrila celulósica (D). Fonte: CARVALHO, et al., 2009 20
- Figura 7.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico. Fonte:Castro;Pereira Junior, (2010) 27
- Figura 8.** Planta hipotética da estrutura do xilano, mostrando os diferentes grupossustituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas. Fonte: BEG et al., 2001. 28

Figura 9. Disposição geográfica dos pontos de coleta das amostras. Fonte: SANTOS, 2012	34
Figura 10. Vista das áreas e pontos de coleta. a e b) FEPE-UNESP, Selvíria,MS; c, d, e, f) Fazenda São José, Inocência,MS. Fonte: SANTOS, 2012.....	36
Figura 11. Micro-organismos isolados de solo de Cerrado. Fonte: SANTOS, 2012	42
Figura 12. Perfil de produção de xilanase, CMCase e Avicelase produzida pelas linhagens P1-13, P1-15, P1-16 e P1-17 em fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como substrato. Fonte: SANTOS, 2012.....	44
Figura 13. Perfil de produção de xilanase, CMCase e Avicelase produzida pelas linhagens P2-1B, P1-21B, P2-2A e P2-D19 em fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como substrato. Fonte: SANTOS, 2012.....	45
Figura 14. Efeito do pH (a) e da temperatura (b) na atividade da xilanase produzida P2D19. Os tampões usados foram: MacIlvaine (pH 3.0-8.0) e glicine-NaOH (pH 8.0-10). Fonte: SANTOS, 2012.....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Comparação das características da fermentação no estado sólido (FES) e da fermentação submersa (FSm) (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010)..... 32
- Tabela 2.** Isolados fúngicos de áreas de Cerrado do Mato Grosso do Sul. 40
- Tabela 3.** Micro-organismos isolados de solo do Cerrado, Fazenda São José, município de Inocência/MS cultivado sob fermentação em estado sólido usando farelo de trigo como substratos, por 72 horas de fermentação..... 41
- Tabela 4.** Micro-organismos isolados de solo do Cerrado, da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), município de Selviria/MS, cultivado sob fermentação em estado sólido usando farelo de trigo como substratos, por 72 horas de fermentação..... 41
- Tabela 5.** Atividade enzimática produzida por P2D19 cultivado sob fermentação em estado sólido usando diferentes substratos, após 72 horas de fermentação. Fonte: SANTOS, 2012..... 46

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Bioma Cerrado	15
3.2. Parede celular vegetal.....	17
3.3. Fungos	22
3.4. Enzimas	25
3.4.1. Celulases	25
3.4.2. Hemicelulases	27
3.5. Aplicações biotecnológicas das enzimas Celulases e Hemicelulases	29
3.6. Produção enzimas	30
4.MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Área de Coleta.....	34
4.2. Isolamento das linhagens fúngicas.....	37
4.3. Produção Enzimática.....	37
4.4. Determinação da atividade enzimática.....	38
4.5. Características Físico-Químicas.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Isolamento das linhagens fúngicas.....	40
5.2. Perfil de produção enzimática.....	41
5.3. Efeito da fonte carbono na produção xilanase	45
5.4. Características Físico-Químicas.....	47
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia industrial é uma área em rápido desenvolvimento, que está sendo chamada de terceira onda da biotecnologia. Depois das aplicações farmacêuticas e agrícolas da biotecnologia, também chamadas de biotecnologias “vermelha” e “verde”, surge agora a biotecnologia “branca”, com um grande potencial para o futuro. A biotecnologia branca poderá desempenhar um papel vital ao promover processos industriais mais limpos, por exemplo, reduzindo a poluição e o consumo de matérias primas (SIMÕES, 2006).

A celulose é o principal componente estrutural da parede celular de plantas, sendo um polímero linear composto por unidades de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4. A síntese coordenada das cadeias de glicose é orquestrada por complexos específicos ligados a membrana plasmática que auxiliam a formação das microfibras. A degradação da celulose ocorre com a ação sinérgica de um complexo de enzimas, formado por endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21). (POLIZELI et al., 2005; POLIZELI, 2009). β -glucosidase é muito importante nesse processo porque hidrolisa a celobiose e outras celodextrinas em glicose, reduzindo o efeito inibidor das celobioses nas outras celulasas (BHATIA, 2002; PALMA-FERNANDEZ, 2002; LEITE, 2008). β -Glucosidase pode também ser usada na indústria alimentícia e indústria química para melhorar a composição aromática de sucos e vinhos (BHATIA, 2002; LEITE, 2008).

Hemicelulose pertence a um grupo de polissacarídeos heterogêneos que são relativamente fácil de ser hidrolisado por ácidos. Os principais componentes da hemicelulose são monômeros de xilose, manose, glucose, galactose, arabinose e pequenas quantidades de ramnose. A xilana é o principal carboidrato encontrado nas hemicelulose. As principais xilanases podem ser classificadas como endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) gera oligossacarídeos a partir da clivagem da xilana e 1,4- β -xylosidase (EC 3.2.1.37) produz xilose de oligossacarídeos (SÁNCHEZ, 2009; PÉREZ, 2002). As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas, galactomananas, arabinoxilanas, arabinoglucurono xilanas, arabino-4-metilglucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas, galacto-arabino-glucuronoxilana, são diferentes denominações em

função da estrutura química que as compõem. A xilana é o principal heteropolissacarídeo das hemiceluloses. (POLIZELI et al., 2005; POLIZELI, 2009).

Os micro-organismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (JAYANI et al., 2005).

Trabalhos anteriores mostram um grande número de bactérias e fungos isolados de diferentes lugares, os quais apresentaram boa produção de xilanase (SÁNCHEZ, 2009; POLIZELI et al., 2005).

Os micro-organismos do Cerrado não tem sido alvo de grandes discussões dentro da biodiversidade do Cerrado o que resulta em um desconhecimento ainda acentuado sobre o assunto. Dentro das informações existentes, merece destaque a detecção da ocorrência de 419 espécies de fungos associados a 4700 espécies de plantas fanerógamas, isto no Distrito Federal (ALHO; MARTINS, 1995). Considerando o bioma Cerrado como um todo, existe a expectativa de se encontrar entre 60 e 100 mil espécies de fungos o que corresponderia entre 5 e 7% da micobiota do globo terrestre (DIANESE et al., 2001).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana incluem, entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por exemplo, as plantas e animais. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos (SIMÕES, 2006).

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada pelos custos dos meios de cultivo de micro-organismos produtores de enzimas. A utilização de substratos de baixo custo tais como resíduos agrícolas, tem sido sugerido como uma alternativa para reduzir os custos de produção de enzimas (PANDEY et al., 2000).

Atualmente, o uso resíduos agroindustriais nos processo fermentativos, tanto no estado sólido como no submerso tem sido empregado no cultivo de bactérias ou fungos, tais como *Aspergillus foetidus* MTCC4898 (SHAH et al., 2005), *Trichosporon cutaneum* SL409 (LIU et al., 1998), *Alternaria* sp ND-16 (LI et al., 2009), *Chaetomium thermophile* NIBGE (LATIF et al., 2006), *Aspergillus tamari* (KADOWAKI et al., 1997), *Thermoascus aurantiacus* (LEITE et al., 2007; DaSILVA et al., 2005).

O Brasil é um país com uma grande extensão territorial e com uma grande área agrícola. Assim, os resíduos agrícolas e/ou agro-industrial, tais como bagaço de cana, farelo de trigo, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho, efluentes de indústria de papel, cascas de frutas e sementes estão disponíveis para uso. Em alguns casos, estes resíduos podem causar problemas ambientais devido à sua grande quantidade e o não reaproveitamento. Sendo assim, esses resíduos representam fontes de carbono alternativas para o crescimento microbiano, visando a produção de biomassa ou enzimas. Celulose e hemicelulose podem ser convertidas em açúcares solúveis a partir desses resíduos por hidrólise ácida ou enzimática. Assim, eles podem ser utilizados como uma fonte abundante e barata de energia renovável no mundo (DaSILVA et al., 2005; SÁNCHEZ, 2009; KADOWAKI et al., 1997).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho propõem isolar micro-organismos em áreas de Cerrado, com intuito de se estudar produção de enzimas xilanolíticas produzidas pelos mesmos. Dessa forma, os objetivos são:

- a) isolar linhagens fungicas produtoras de xilanase e/ou celulasas;
- b) selecionar as linhagens que apresentem maiores atividades enzimáticas;
- c) estudar o perfil de produção das enzimas por fermentação em estado sólido (FES), visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais;
- d) caracterizar física e quimicamente a enzima de interesse.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Bioma Cerrado

O Bioma Cerrado possui uma área de aproximadamente 203 milhões de hectares, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE (2004), ocupando porção central do Brasil (Fig. 1). É o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando cerca de 25% do território nacional. A sua área continua incide sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas (Fig. 1). Neste espaço territorial encontram-se as nascentes das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata), o que resulta numa grande disponibilidade de recursos hídricos. Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando nos diversos ecossistemas uma flora com mais de 11.000 espécies de plantas nativas (MENDONÇA et. al, 2008), das quais 4.400 são endêmicas (MYERS et al.,2000).

Figura 1- Localização do Cerrado.



Fonte: Ministério do Meio Ambiente (2009)

O clima típico da região do cerrado é quente, semi-úmido notadamente sazonal, com verão chuvoso e inverno seco. A temperatura média anual fica em torno de 22-25° C, podendo chegar a marcações de até 40° C na primavera. As mínimas registradas podem chegar a valores próximos de 10° C ou até menos, nos meses de maio, junho e julho. A precipitação média anual varia entre 1200 e 1800 mm. No período de maio a setembro, os índices pluviométricos mensais reduzem-se bastante e a umidade relativa do ar permanece entre 10 e 30%, podendo ocorrer secas prolongadas. (BIBLIOTECA VIRTUAL DO AMAZONAS, 2011; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2009).

Os solos são geralmente muitos antigos, quimicamente pobres e profundos. A paisagem do cerrado é caracterizada por extensas formações savânicas, interceptadas por matas ciliares ao longo dos rios, no fundo de vale. Entretanto, outros tipos de vegetação podem aparecer na região dos cerrados, tais como: os campos úmidos e as veredas de buritis, onde o lençol freático é superficial. Os campos rupestres podem ocorrer nas maiores altitudes e as florestas mesófilas situam-se sobre os solos mais férteis. Mesmo as formas savânicas exclusivas não são homogêneas, havendo uma grande variação no balanço entre a quantidade de árvores e de herbáceas, formando um gradiente estrutural, que vai do cerrado completamente aberto (o campo limpo – vegetação dominada por gramíneas sem a presença dos elementos lenhosos, árvores e arbustos) ao cerrado fechado (o cerradão com grandes quantidades de árvores e aspectos fisionomicamente florestal). As formas intermediárias são o campo sujo, o campo cerrado e o cerrado stricto sensu, de acordo com uma densidade crescente de árvores (BIBLIOTECA VIRTUAL DO AMAZONAS, 2011).

O relevo é um tanto acidentado, com poucas áreas planas (Fig. 2). Nos morros mais altos são encontrados pedregulhos, argila com inclusões de pedras e camadas de areia (WIKIPEDIA, 2011).

Os solos apresentam-se intemperizados, devido à alta lixiviação e possuem baixa fertilidade natural. Apresenta pH ácido, variando de 4,3 a 6,2. Possui elevado conteúdo de alumínio, baixa disponibilidade de nutrientes, como fósforo, cálcio, magnésio, potássio, matéria orgânica, zinco, argila, compondo-se de caulinita, goetita e gibsitita. O solo é bem drenado, profundo e com camadas de húmus (WIKIPEDIA, 2011).

Figura 2- Cerrado na região de Pirenópolis, Goiás.



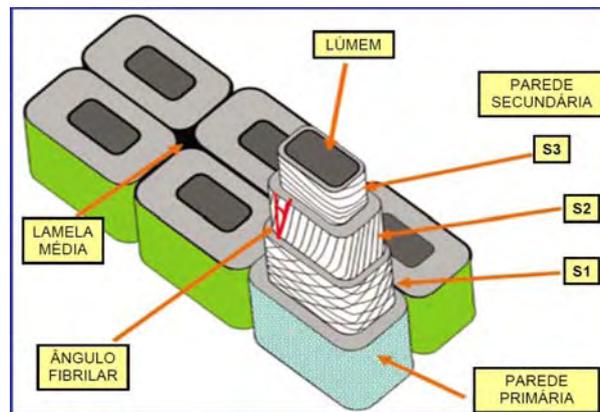
Fonte: Wikipédia (2011)

3.2. Parede celular vegetal

A parede celular é uma das principais estruturas da célula vegetal, constituída por agrupamentos de moléculas heterogêneas. Sua composição é muito diversificada. Além dos polissacarídeos, existem também pequenas quantidades de proteínas e substâncias fenólicas. As proporções destes componentes químicos na parede celular sofrem significativas alterações durante a vida da planta. A parede celular é uma estrutura muito complexa que possui diversas funções. Proporciona às células rigidez mecânica, mantêm a sua morfologia, controla a expansão celular e transporte intercelular, protege a célula contra uma grande quantidade de organismos potencialmente patogênicos e predadores, e também participa na comunicação intercelular. Como muitas destas funções são exigidas ao mesmo tempo em vários estágios de desenvolvimento do vegetal, a parede celular possui simultaneamente, grande flexibilidade com um máximo de resistência, devido a um sofisticado controle metabólico, com regiões de extrema complexidade, com altos conteúdos de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos. (RAVEN et al., 2001; BRAGATTO, 2007)

Morfologicamente, a parede celular é dividida em três regiões distintas, a lamela média, parede primária e parede secundária (Fig. 3). A lamela média é a região de intersecção entre duas células. Esta camada intercelular é rica em substâncias pécicas mergulhadas em um meio aquoso (BRAGATTO, 2007).

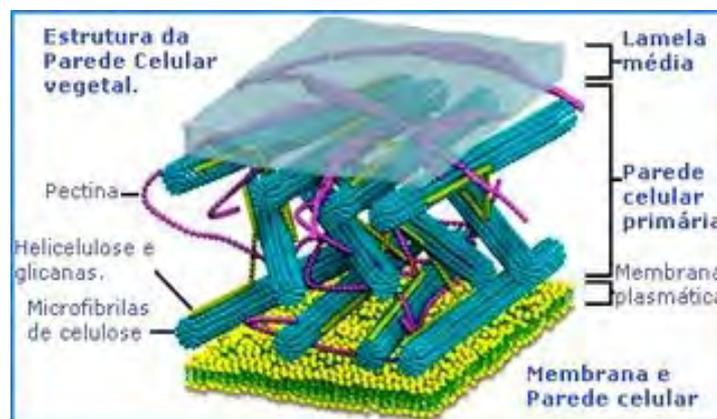
Figura 3- Esquema da célula vegetal com detalhes das diferentes camadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3), a parede primária e a lamela média entre as paredes primárias de células adjacentes.



Fonte: Kretschmann (2003)

A parede primária de grande parte dos vegetais é composta por três estruturas independentes (Fig. 4), as microfibrilas de celulose (~30%), os polissacarídeos não-celulósicos, que incluem hemiceluloses (~30%) e pectinas (~30%) e as proteínas estruturais (~10%). (HAYASHI, 1989; MACCANN, ROBERTS, 1991; CARPITA; GIBEAUT, 1993; RAVEN et al., 2001; BRAGATTO, 2007).

Figura 4- Parede celular primária e suas estruturas.



Fonte: Estrutura da parede celular vegetal (2012)

As paredes celulares secundárias contêm tipicamente 3 camadas distintas, S1, S2 e S3, que diferem em espessura, orientação de microfibrilas e composição. A camada exterior (S1) e a interior (S3) possuem microfibrilas orientadas aproximadamente de maneira transversal; a camada intermédia (S2) é muito mais grossa que as outras duas e apresenta microfibrilas orientadas longitudinalmente em relação ao comprimento da célula. Esta orientação proporciona à célula grande resistência à tensão e à compressão (SILVA, 1993).

Numa célula com parede celular secundária a camada que compreende a lamela média e a parede celular primária é rica em substâncias pécicas quando comparada com o restante material; S3 e a parte interior de S2 têm um conteúdo em celulose mais elevado enquanto S1 e a camada exterior de S2 são relativamente ricas em hemiceluloses (glucuronoxilanas) (SILVA, 1993).

Segundo o modelo clássico, estas estruturas estão divididas em duas fases, uma microfibrilar e outra matricial. A fase microfibrilar distingue-se da matricial pelo alto grau de cristalinidade visível ao microscópio eletrônico e por possuir uma composição química relativamente-homogênea, sendo constituída basicamente de microfibrilas de celulose, normalmente arranjadas em padrão helicoidal, ordenadas em estruturas longas e finas, unidas por pontes de hidrogênio (ROLAND et al., 1992; SILVA, 1993; BRAGATTO, 2007). Juntamente ao longo das microfibrilas de celulose estão os polissacarídeos não-celulósicos ou hemicelulósicos, localizados em zonas amorfas sem orientação regular. A fase matricial consiste numa variedade de polissacarídeos, glicoproteínas e compostos fenólicos, variando a sua composição com as diferentes camadas da parede, tipos de células e diferentes fases do ciclo celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993; TAIZ, ZEIGER, 2004; SILVA, 1993; BRAGATTO, 2007).

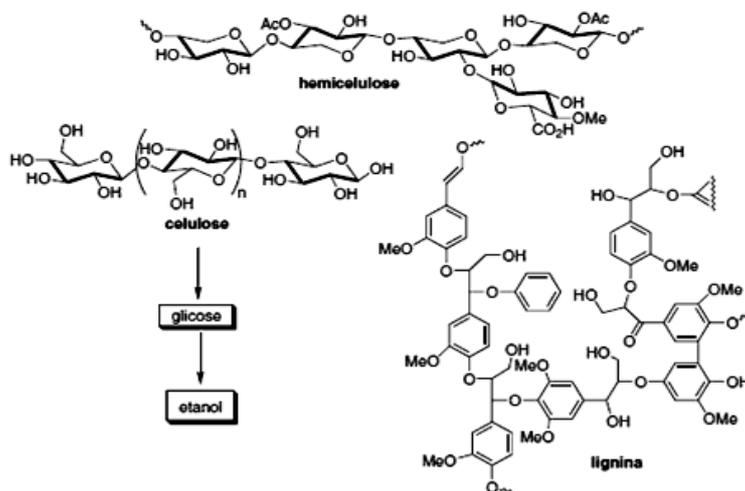
A composição química, a parede celular vegetal é constituída principalmente, por celulose, hemicelulose e lignina (Fig. 5).

A celulose encontrada na parede celular das plantas é a biomolécula mais abundante na natureza. Todos os anos as plantas produzem aproximadamente 180 bilhões de toneladas de celulose. Esta biomolécula tem enorme valor comercial para diversos setores industriais, em particular pode-se destacar o setor de produção de celulose e papel (FRY, 1988; ENGLEHARDT, 1995; BRAGATTO, 2007).

A celulose é produzida na forma de microfibrilas de celulose, (semi)-cristalina em cadeias lineares de β -1,4 D-Glicose ligadas por pontes de hidrogênio (Fig. 6) (DELMER, 1999; BRAGATTO, 2007). Cada microfibrila de celulose consiste de

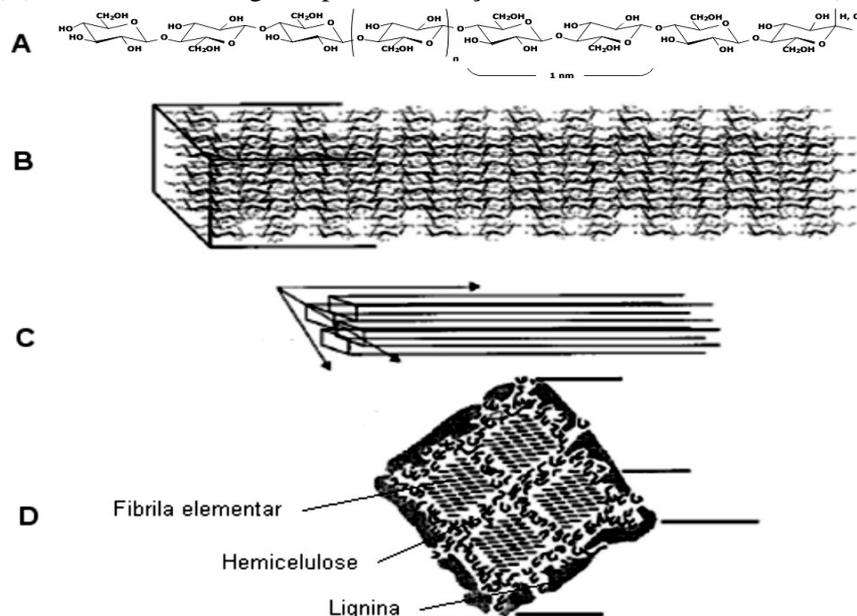
aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promovem o suporte e resistência à parede celular (FRY, 1988; EMONS; MULDER, 2000; EMONS et al., 2002; BRAGATTO, 2007). Em geral, a parede primária contém de 10 a 40% de celulose e a secundária aproximadamente 40 a 60% (McNEIL et al., 1984; BACIC et al., 1988; BRAGATTO, 2007).

Figura 5- Estruturas parciais dos componentes lignocelulósicos e derivados.



Fonte: Ferreira e Rocha (2009)

Figura 6- Representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal: ligações entre moléculas de glucose (A) e interações entre as cadeias lineares adjacentes para a formação da fibrila elementar (B); associação entre quatro fibrilas elementares adjacentes (C), hemicelulose e lignina para a formação da microfibrila celulósica (D).



Fonte: Carvalho et al. (2009)

O termo hemicelulose é utilizado coletivamente para denominar grupos distintos de polissacarídeos constituídos por açúcares pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glucose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila (FENGEL; WEGENER, 1989; CARVALHO et al., 2009). São heteropolissacarídeos complexos compostos por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico (SANTOS et al., 2012).

As hemiceluloses estão intimamente associadas à celulose, definindo as propriedades estruturais na parede celular além de desempenhar funções na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Os xiloglucanos (Xg) e os galactomananos são hemiceluloses presentes tanto em parede primária (função estrutural) como em parede de reserva em sementes de algumas espécies (função de reserva). O grau de ramificação e o tamanho da cadeia afetam a interação entre Xg e a celulose. Enquanto os graus de galactosilação e fucosilação estão relacionados com a força de ligação entre os polissacarídeos, o tamanho da molécula do Xg afeta a sua capacidade (quantidade) de interação à celulose, conseqüentemente a autointeração (FERREIRA; ROCHA, 2009).

As estruturas das hemiceluloses apresentam ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Esta reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante, superado apenas pela celulose. É um componente fundamental da madeira, representando cerca de 15 a 35% de seu peso seco. A lignina é um complexo polimérico com caráter fenólico que é resistente à hidrólise. Sua rigidez e hidrofobia são importantes para o suporte mecânico. Característica que provavelmente permitiu a melhor adaptação das plantas. A complexidade deste polímero na célula, lhe confere alta eficiência na condução de água da base até o topo do vegetal e também na defesa ao ataque de patógenos. A distribuição do conteúdo de lignina é diferente para cada região da célula. A maior concentração da lignina está localizada na região da lamela média. Já no interior da parede celular secundária a concentração é menor (RAVEN et al., 2001).

A lignina é biossintetizada nas plantas vasculares em um complexo processo de reações, iniciado pelo metabolismo do ácido shiquímico, seguido da via do aminoácido aromático L-fenilalanina. A fenilalanina amônialiase (PAL), é uma enzima que regula o metabolismo fenólico nas células vegetais, convertendo o aminoácido L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que posteriormente é hidroxilado para ácido ρ -coumárico. Esse último, pela ações de enzimas específicas produz os três principais componentes da lignina, o ρ -coumarílico, coniferílico e sinapílico. Portanto por definição, lignina é um complexo de biopolímeros com estrutura de natureza aromática, com alto peso molecular, composto por várias combinações de três tipos de ligninas, a lignina ρ -hidroxi-fenila, lignina guaiacila e siringila, tendo como precursores os três álcoois do tipo fenilpropanóides (ρ -coumarílico, coniferílico e sinapílico), respectivamente. A deposição dos monômeros da lignina na parede celular vai depender da espécie vegetal, tipo de célula e estágio do desenvolvimento do tecido. No complexo polimérico da lignina ocorre uma variedade de ligações, incluindo ester, éter e carbono-carbono. A ligação éter é dominante, representando aproximadamente 2/3 das ligações. O restante das ligações são do tipo carbonocarbono e éster. Como resultado destas ligações, ocorre a formação de uma complexa rede tridimensional hidrofóbica, com importantes ligações covalentes e não covalentes com a celulose e as hemiceluloses, em particular com as cadeias de xilanas (BRAGATTO, 2007).

A celulose e as hemiceluloses são os componentes da parede celular com maior importância econômica para o setor de papel e celulose. Portanto, conhecer o mecanismo de regulação da biossíntese da celulose e hemiceluloses é um pré-requisito para alterarmos as características das fibras e isto pode ser alcançado através de técnicas de biologia molecular (REITER et al., 1997; BRAGATTO, 2007).

3.3. Fungos

Os fungos são um grupo grande, diverso e amplamente diversificado de organismos, *bolores*, *cogumelos* e *leveduras*. Aproximadamente 100.000 espécies de fungos foram descritas, estimando-se a possibilidade de existirem até 1,5 milhões de espécies. Os fungos formam um grupo filogeneticamente distinto de outros organismos, sendo relacionados de forma mais estreita aos animais (MADIGAN, 2010).

Os habitats dos fungos são bastante diversos. Alguns fungos são aquáticos, vivendo principalmente em água doce, sendo também conhecidos alguns fungos marinhos. A maioria dos fungos, no entanto, é terrestre. Eles habitam o solo ou a matéria vegetal morta e desempenham papéis cruciais na mineralização do carbono orgânico. Inúmeros fungos são parasitas de plantas. De fato, os fungos acarretam várias doenças de importância econômica em grandes plantações. Alguns fungos causam doenças em animais, inclusive humanos, embora geralmente os fungos sejam patogênicos a animais de menor importância do que outros micro-organismos. Os fungos também estabelecem associações simbióticas com várias plantas, auxiliando-as na aquisição de minerais a partir do solo, e vários fungos contribuem benéficamente a vida humana por meio da fermentação e da síntese de antibióticos (MADIGAN, 2010).

Os fungos são micro-organismos unicelulares (leveduras) ou multicelulares (filamentosos), formados por células eucarióticas. A parede celular é rica em quitina, além de galactose e manana e alguns também podem apresentar celulose β -glucano (Oomycota). A membrana celular é rica em ergosterol. De modo geral, os fungos são aeróbios, entretanto alguns estão envolvidos nos processos fermentativos (NASCIMENTO, 2011).

As formas unicelulares podem formar estruturas alongadas, em condições especiais, denominadas de pseudo-hifas. As formas filamentosas, mais numerosas, apresentam as células tubulares, denominadas de hifas, sendo o conjunto de hifas denominadas de micélio. As hifas podem ser contínuas, simples ou ramificadas, sendo também não septadas (cenocíticas) ou septadas (apocíticas). Quando isolado em meio de cultura apropriado, os fungos formam colônias, como resultantes do crescimento concêntrico (crescimento em diâmetro e indeterminado) (NASCIMENTO, 2011).

O micélio dos fungos tem a função de absorver nutrientes e dá forma ao fungo, porém, algumas espécies formam estruturas especiais, com funções específicas, tais como: rizóides (fixação no meio), esclerócio ou escleroto e clamidósporo (resistência), rizomorfos (absorção), grampo de conexão (auxilia no processo de transferência de material genético). Os fungos unicelulares formam colônias pastosas, semelhantes às formadas por bactérias, com várias pigmentações ou também despigmentadas. Já as colônias dos fungos filamentosos são cotonosas ou em forma de pó (secas), também podem apresentar várias colorações, sendo estas distintas nos dois versos da placa de Petry (NASCIMENTO, 2011).

Os fungos são aclorofilados, heterotróficos (quimiorganotróficos), portanto incapazes de realizar fotossíntese ou sintetizar a matéria a partir de elementos simples. A nutrição dos fungos ocorre externamente, através da liberação de exoenzimas sobre a matéria pré-formada. As moléculas são “quebradas” em formas mais simples, de maneira que os fungos possam absorvê-las por qualquer parte do sistema vegetativo ou por estruturas especiais. Os fungos necessitam de C, N, P, K, Ca e Mg, além dos micronutrientes. Já entre os fungos micorrízicos ou os líquenes, que são considerados os mais evoluídos, ocorre uma troca de fotossintatos (macrossimbionte) e nutrientes (microsimbionte). As substâncias são armazenadas na forma de glicogênio no micélio ou em células especiais (clamidósporos, vesículas). Muitas espécies apresentam fototropismo (*Pilobolus*), necessitam de luz para o seu desenvolvimento, frutificação e pigmentação (NASCIMENTO, 2011).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana incluem, entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por exemplo, as plantas e animais. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos (SIMÕES, 2006).

Uma das áreas de interesse biotecnológico é a decomposição dos materiais celulósicos, devido ao importante papel no processo de reciclagem de nutrientes, em ambientes terrestres, especialmente no ciclo do carbono. Neste aspecto, destacam-se as atividades das comunidades fúngicas, das quais espécies celulolíticas e xilanolíticas têm sido muito investigadas, algumas já utilizadas industrialmente, outras com grande potencial para o mesmo fim (RUEGGER, 2001).

Em geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, a qual determina sobremaneira a ocorrência e a distribuição desses organismos (RUEGGER; TAVARES-TORNISIELO, 2004).

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a diversos substratos, entre os quais efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agroindustriais (TAVARES et al., 1998). Assim, são capazes de degradar a celulose e hemicelulose e utilizá-las como fonte de carbono e

energia; inclusive os fungos filamentosos, considerados uma classe de microorganismos de grande significado comercial e amplamente distribuídos na natureza, encontrados em solos, em vegetais e animais, podendo ter hábitos saprófitos ou parasitas (GRIMM et al., 2005). Também são capazes de viver como microrganismo endofítico, sistematicamente, no interior das plantas, sem causar danos.

3.4. Enzimas

3.4.1. Celulases

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações *O*-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

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

As celulases são enzimas que clivam as ligações β -1,4 da celulose. Elas podem ser produzidas por plantas, participando da formação e remodelamento da parede celular, e por bactérias e fungos, com intuito de despolimerizar a cadeia de celulose. As celulases são de vários tipos e elas operam sinergisticamente para a hidrólise da celulose (SANTOS, 2011)

Para a degradação completa da celulose são necessárias as atuações sinérgicas de quatro tipos de celulases. As endoglucanases (1,4- β -D-glicana-4-glicanohidrolase; EC 3.2.1.4) hidrolisam ligações β -(1 \rightarrow 4) internas da celulose (LYND, et al., 2002). Essas enzimas são inativas sobre a celulose cristalina como algodão, mas elas hidrolisam celulose amorfa e substratos solúveis como carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose. A atividade de endoglucanases é caracterizada por hidrólise aleatória de ligações β -glicosídicas, resultando em uma rápida diminuição da viscosidade acompanhada da taxa de aumento de grupos redutores. Os produtos incluem glicose, celobiose e celodextrinas de vários tamanhos (ALMEIDA, 2009).

O segundo grupo de enzimas são as celobiohidrolases (1,4- β -D-glicana celobiohidrolase; EC 3.2.1.91), que são exocelulases. Este grupo degrada celulose amorfa por remoção consecutiva de celobiose dos terminais não redutores do polissacarídeo. Quando puras podem degradar Avicel, porém o mesmo não acontece com algodão. Em relação às endoglicanases, as celobiohidrolases apresentam uma maior capacidade de redução da viscosidade. Celobiohidrolases e endoglicanases atuam sinergisticamente para degradação completa da celulose cristalina (ALMEIDA, 2009).

O terceiro grupo de enzimas são as exoglicohidrolases (1,4- β -D-glicana glicobiohidrolase, EC 3.2.1.74), que hidrolisam consecutivamente a remoção de unidades de glicose de terminais não redutores de celodextrinas. A taxa de hidrólise diminui proporcionalmente à diminuição do tamanho da cadeia (ALMEIDA, 2009).

O quarto grupo de enzimas são as β -glicosidases (β -Dglicosideoglicohidrolase; EC 3.2.1.21) que clivam celobiose em glicose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas. Ao contrário das exoglicosidases, a taxa de hidrólise das celobioses aumenta proporcionalmente à diminuição do tamanho do substrato. As β -glicosidases e as exoglicohidrolases têm em comum os substratos de cadeias de glicose de 2 até 6 unidades. Elas podem ser distinguidas baseadas na suas atividades relativas sobre os dois substratos celobiose e celohexose. As β -glicosidases hidrolisam muito mais rapidamente a celobiose do que as celobiohexoses, enquanto o oposto ocorre com as exoglicohidrolases (WHITAKER, 1994).

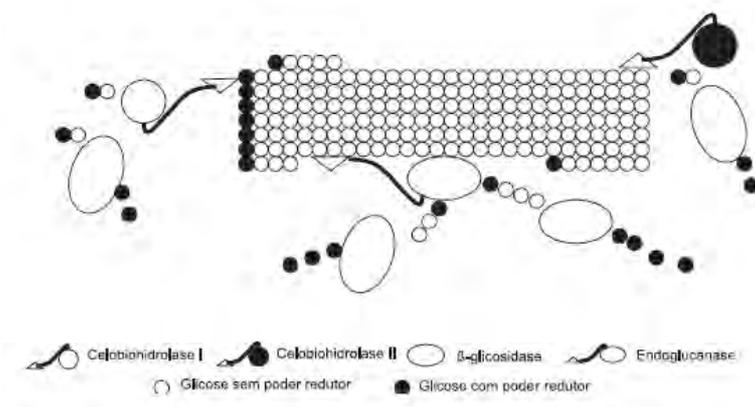
Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia. A Figura 7 ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e β -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

As celulases produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos. Como exemplo, Zhang e colaboradores também trabalharam com uma linhagem de *Bacillus* sp., cultivando-a, para a produção de celulases, em pH 10,5 (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). Em relação às celulases de actinomicetos (especialmente do gênero *Streptomyces*), os resultados divulgados indicam que elas possuem melhor atuação em temperaturas por volta de 50 °C e valores de pH entre neutros e moderadamente ácidos (CASTRO; PEREIRA

JUNIOR, 2010). Já as temperaturas ótimas para atuação encontram-se em sua maioria acima de 40 °C.

Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (ROBSON; CHAMBLISS, 1989).

Figura 7- Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte:Castro e Pereira Junior (2010)

3.4.2.Hemicelulases

A xilana é o principal carboidrato encontrado nas hemicelulose. As principais xilanases podem ser classificadas como endo-1,4- -xylanase (EC 3.2.1.8) gera oligossacarídeos a partir da clivagem do xilano e 1,4- -xylosidase (EC 3.2.1.37) produz xilose de oligossacarídeos mostrada na fig. 8. (SÁNCHEZ , 2009; PEREZ, 2002).

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

Endo- -1,4-xilanases (1,4- -D-xilana xilanhidrolase; E.C. 3.2.1.8): clivam as ligações glicosídicas -1,4 internas das moléculas de xilana, liberando xilooligossacarídeos e conseqüentemente reduzindo o grau de polimerização do substrato. É uma das principais enzimas envolvidas na degradação deste polímero. De acordo com WONG et al. (1988) as endoxilanases podem ser de dois tipo, de acordo com o produto final da reação. Assim podem ser endoxilanases não desramificantes as quais

não conseguem hidrolisar o ponto de ramificação 1,3- -L-arabinofuranosil da arabinoxilana e as endoxilanases desramificantes as quais conseguem clivar essa ligação liberando arabinose.

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

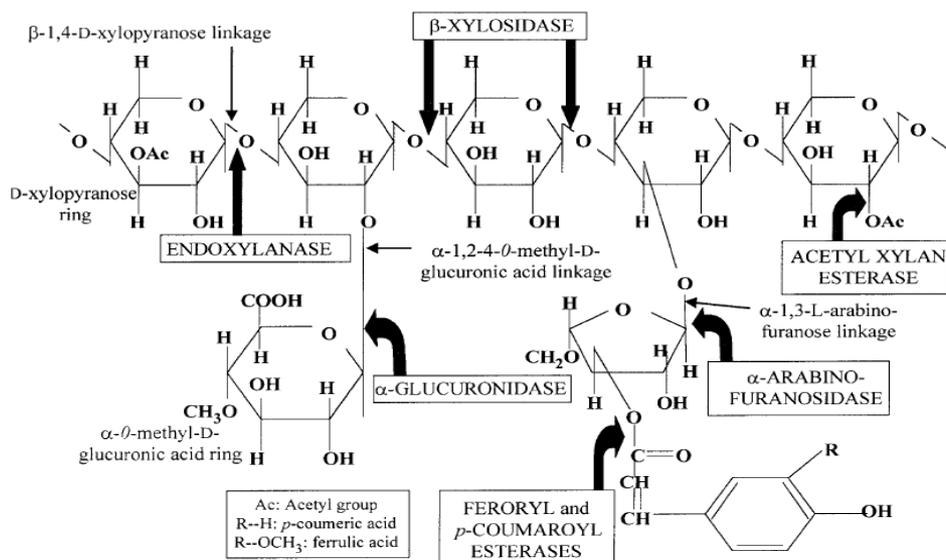
α -Glicuronosidase (E.C. 3.2.1.-): hidrolisa as ligações -1,2 entre o ácido glicurônico e o -D-xilopiranosil removendo os resíduos de α -4-O-metil (WONG et al., 1988);

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

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

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

Figura 8- Planta hipotética da estrutura do xilano, mostrando os diferentes grupossustituíntes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.



Fonte: Beg et al. (2001)

3.5. Aplicações biotecnológicas das enzimas Celulases e Hemicelulases

Há várias aplicações da celulase e hemicelulases em processos biotecnológicos em diversas indústrias como de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, etc. Para essas indústrias, a aplicação de tecnologia enzimática reduz custos operacionais, aumenta a qualidade do produto, utilizando processos limpos que contribuem para diminuir os impactos ambientais (MAYRINK, 2010).

Na indústria têxtil, as celulases são capazes de tornar os tecidos mais lisos e macios, degradando as fibras da superfície. Também usadas no tratamento de jeans para retirar o excesso de corante, dão a aparência de lavado, processo denominado bioestonagem (DIENES, 2003; LYND et al., 2002). Na indústria de papel e celulose, participam do refino da poupa, aumentado sua qualidade e modificam as propriedades das fibras, o que aumenta a velocidade de fabricação do papel e tem a função de colaborar no processo de despigmentação da matriz celulósica, favorecendo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para fabricação das folhas de papel reciclado (BHAT, 2000).

Na indústria de alimentos, as celulases participam na extração de compostos do chá-verde, proteína da soja, óleos essenciais, aromatizantes etc. Atuam também nos processos de produção de vinagre de laranja, inclusive, no processamento de sucos de frutas e vegetais, a ação combinada das hemicelulases e celulases apresenta um efeito

sinérgico que é vantajoso sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade do produto final (DaSILVA et al., 1997).

Quanto às hemicelulases, especialmente a xilanase, podem auxiliar na diminuição da poluição ambiental causada pelas indústrias de papel e celulose. Nestas indústrias, o cloro é usado na forma de agente químico branqueador mas resulta em produtos residuais chamados compostos orgânicos, nocivos ao meio ambiente (DaSILVA et al., 1997).

A xilanase vem sendo empregada no processo de biobranqueamento da polpa Kraft, a fim de diminuir a concentração do cloro utilizado no processo. Isto tem a função principal de diminuir a taxa de organoclorados produzidos nos efluentes desta indústria, que são lançados nos rios, poluindo-os. A xilanase degrada a xilana que liga a lignina à celulose e também a xilana que se deposita sobre a lignina após o cozimento com a redução do pH da pasta. Com esta ação, há uma melhor extração da lignina aderida à celulose, além de um favorecimento da acessibilidade do cloro à fração de lignina para oxidá-la, solubilizando-a e, conseqüentemente, levando à sua extração, deixando a polpa com grau de alvura adequada à fabricação do papel. O uso destas enzimas permite uma redução de 30% na quantidade de cloro usado (DaSILVA et al., 1997).

Nas últimas décadas, especial atenção tem sido dada aos processos de bioconversão da biomassa lignocelulósica, empregando processos enzimáticos microbianos, incluindo fungos, leveduras e bactérias, para despolimerização da celulose, conversão à glicose e posterior fermentação na produção de solventes e combustíveis como etanol (LEE, 1997; HOWARD, 2003).

3.6. Produção enzimas

Enzimas são proteínas que têm a propriedade de catalisar transformações de moléculas orgânicas em condições brandas de reação. A enzima, uma vez elaborada, poderá atuar independentemente da célula que a produziu, mesmo “in vitro”, desde que o pH, a temperatura e o substrato, entre outros fatores, sejam adequados. As enzimas apresentam características peculiares que favorecem seu emprego em processos biotecnológicos, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas nos processos industriais (COLEN, 2006).

A obtenção de enzimas é um dos principais exemplos de processos biotecnológicos industriais, em amplo desenvolvimento. Na maioria dos casos, as que são produzidas comercialmente pelas grandes indústrias da área, são de origem microbiana, devida principalmente à maior diversidade de enzimas que são possíveis de se obter pelos micro-organismos (SIMÕES, 2006).

Devido ao modo de nutrição por absorção, os fungos devem inicialmente liberar enzimas digestivas no ambiente externo. Estas enzimas quebram moléculas grandes e relativamente insolúveis como os carboidratos, proteínas e lipídios em moléculas pequenas e mais solúveis que podem ser absorvidas (RUEGGER, 2001).

As enzimas microbianas ocupam um papel crucial na ciclagem de nutrientes, realizando uma variedade de reações de fixação, oxidação, redução e hidrólise na conversão da matéria orgânica necessária para a manutenção de equilíbrio num ecossistema (RUEGGER, 2001).

A biomassa vegetal, constituída basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, é o único recurso natural que tem um ciclo de reposição suficientemente rápido para sustentar a demanda do mercado mundial de produtos bioquímicos e químicos, inclusive combustíveis. Os resíduos lignocelulósicos têm sido considerados como fonte promissora para produção de etanol, pela abundância e facilidade de serem encontrados na natureza e nos resíduos agroindustriais (KIM et al., 1997).

A degradação microbiológica da celulose constitui-se na maior fonte de carbono para o solo. Considerando-se os materiais naturais, a celulose compõe o biopolímero mais abundante do mundo, apresentando uma quantidade global estimada em $26,5 \cdot 10^{10}$ toneladas (TEUNISSEN; CAMP, 1993).

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada pelos custos dos meios para o cultivo de micro-organismos produtores de enzimas. A utilização de substratos de baixo custo, tais como resíduos agrícolas, tem sido sugerido como uma alternativa para reduzir os custos de produção de enzimas (PANDEY, 2000). O Brasil é um país com uma grande extensão territorial e com uma grande área agrícola. Assim, os resíduos agrícolas e/ou agroindustrial, tais como bagaço de cana, farelo de trigo, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho, efluentes de indústria de papel, cascas de frutas e sementes estão disponíveis para uso. Em alguns casos, estes resíduos podem causar problemas ambientais devido à sua grande quantidade e o não reaproveitamento. Sendo assim, esses resíduos representam fontes de carbono alternativas para o crescimento microbiano, visando a produção de biomassa ou enzimas. Celulose e

hemicelulose podem ser convertidas em açúcares solúveis a partir desses resíduos por hidrólise ácida ou enzimática. Assim, eles podem ser utilizados como uma fonte abundante e barata de energia renovável no mundo (DaSILVA, 2005; SÁNCHEZ, 2009; PANDEY, 2000).

As duas principais estratégias para a produção de celulases e hemicelulases por micro-organismos são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm). A tabela 1 apresenta algumas características comparativas desses dois processos fermentativos (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

Um dos parâmetros mais exaltados na diferenciação desses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional. Na FES há ausência ou quase ausência de água livre (PANDEY, 2003; CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30-85% e a atividade de água típica vai de 0,40-0,90, mimetizando condições encontradas na natureza e permitindo até que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação é pouco provável (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). A grande maioria dos microrganismos utilizados no processo de fermentação no estado sólido é de fungos filamentosos (SILVA, 2002). A quantidade reduzida de água no substrato limita bastante o número de micro-organismos capazes de se adaptar a este processo, porém os fungos se mostram bastante tolerantes a esse ambiente (FERNANDES, 2006).

Tabela 1- Comparação das características da fermentação no estado sólido (FES) e da fermentação submersa (FSm)

FES	FSm
Menor gama de produtos obtidos e de micro-organismos aptos a crescer nessas condições	Maior demanda energética associada à esterilização do meio e à remoção de produto do meio fermentado
Menor possibilidade de contaminação, pela ausência de água livre no sistema	Em que pese a menor concentração de produtos obtida pela FS, a purificação dessas moléculas é facilitada pela ausência ou baixa concentração de partículas de substrato
Menor disponibilidade de informações na literatura, no que tange a fenômenos de transporte e cinéticas de crescimento e de produção enzimática	O alto teor de água e a natureza diluída do meio facilitam o controle da temperatura de cultivo, reduzindo a degradação do produto, em especial enzimas com baixa

O extrato obtido é em geral de três a quatro vezes menos diluído que na FS, de forma que a produtividade e a concentração final de produto são maiores na FES	termoestabilidade Quando operando com elevadas concentrações de substrato, podem ocorrer problemas reológicos no sistema
Maior dificuldade no controle do processo e na adição de soluções desejadas	Processos difusionais e de mistura são facilitados devido ao caráter homogêneo do sistema
Menor volume de resíduos líquidos gerado	Tecnologias de monitoramento de variáveis <i>on line</i> mais amplamente disponíveis

Fonte: Castro e Pereira Junior (2010)

A FSm é tradicionalmente utilizada para produção de enzimas, pois há melhor controle de alguns parâmetros importantes do processo como pH e crescimento celular, além de ser facilitada a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação da biomassa. É principalmente utilizada em fermentações bacterianas (FERNANDES, 2006; OLIVEIRA, 2011).

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

4.MATERIAL E MÉTODOS

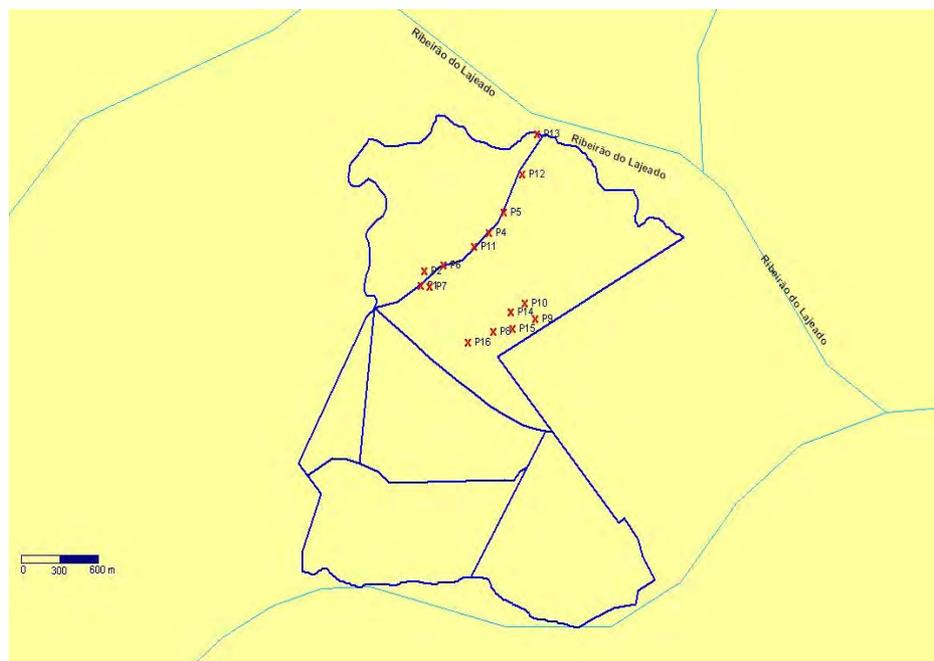
4.1. Área de Coleta

As coletas foram realizadas em duas áreas de Cerrado do estado do Mato Grosso do Sul, MS, próximas da divisa com o estado de São Paulo. Uma área está localizada no município de Selvíria, MS, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) da Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira – UNESP (20°20'38'' S; 51°24'36'' O). A outra área está localizada em uma propriedade particular, Fazenda São José, localizada no município de Inocência, MS. Foram realizadas coletas nas áreas de Cerrado da FEPE – UNESP – Campus de Ilha Solteira, em março de 2011 e na fazenda Santa Fé, em maio de 2011 e setembro de 2011.

Na FEPE foram amostrados 7 pontos de coleta, localizados 5 metros da borda da mata, onde foram coletadas amostras de solo e serrapilheira em três posições diferentes em torno do ponto de coleta. Na fazenda Santa Fé, foram marcados 15 pontos de coleta e foram adotado os mesmos procedimentos que na FEPE. A figura 9 mostra a disposição geográfica destes pontos.

Figura 9- Disposição geográfica dos pontos de coleta das amostras.

a) Faz. Santa Fé, Inocência, MS



b) Faz. Santa Fé, Inocência, MS



c) FEPE, Selvíria, MS



Fonte: Santos (2012)

Na Figura 10 estão dispostas imagens dos locais de coleta, quando as mesmas foram realizadas. As amostras foram transportadas até o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira – UNESP, onde as amostras foram transferidas para frascos contendo meio nutriente.

Figura 10- Vista das áreas e pontos de coleta. a e b) FEPE-UNESP, Selvíria, MS; c, d, e, f) Fazenda São José, Inocência,MS.

a)



b)



c)



d)



e)



f)



Fonte: Santos (2012)

4.2. Isolamento das linhagens fúngicas

As linhagens de fungos filamentosos foram isoladas a partir de madeira e material orgânico em decomposição, serrapilheira das áreas de Cerrado. Aproximadamente 1,0 g de amostra de serrapilheira que foi transferida diretamente para frascos contendo 4 mL de meio nutriente, composto de: 0,5% xilano como fonte de carbono; 0,1% peptona; 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,20% K_2HPO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03% uréia; $1,60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $1,40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 ; $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5,0.

Após incubação a 30°C e 45°C por 12 a 24 h, o material líquido foi transferido por esgotamento em estria, com o auxílio de uma alça de inoculação, para placas de Petri contendo o meio nutriente, contendo 0,5% xilana, acrescido de 1,5% agar. Todas as colônias morfológicamente diferentes foram purificadas por estriamento em placas. As culturas puras foram estocadas em tubo inclinado com rosca contendo o mesmo meio e mantidas a 7°C , para os testes de produção. Os isolados fúngicos foram mantidos também em meio Sabourand.

4.3. Produção Enzimática

A produção das xilanases, CMCase e avicelases extracelulares foram analisadas utilizando-se a fermentação em estado sólido (FES). Como substrato foi adotado o farelo de trigo, o qual foi obtido no comércio local.

A fermentação em estado sólido foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 5,0 g de substrato, o qual foi umedecido com 10 ml de solução de minerais ($1,5 \text{ g l}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2,0 \text{ g l}^{-1}$ KH_2PO_4 , $0,3 \text{ g l}^{-1}$ uréia, $0,03 \text{ g l}^{-1}$ CaCl_2 , $0,2 \text{ g l}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), visando um teor de umidade inicial em torno de 75%. Após a esterilização dos frascos, esse material sólido foi umedecido com solução salina e inoculado com a cultura microbiana. O inoculo fúngico foi preparado a partir do cultivo em placa Petri contendo meio Agar Dextrose Sabourand por 48 h. Cinco discos (0,5 cm de diâmetro) do crescimento em placa de Petri foi utilizado como inoculo e transferido para frascos de Erlenmeyer contendo o substrato. Foi utilizado um bastão de vidro para homogeneizar o inoculo no substrato. Os frascos de erlenmeyer foram incubados em estufa a 30°C por 72h. O crescimento microbiano foi avaliado através da visualização

do crescimento micelial típico. A solução enzimática bruta foi obtida pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos com crescimento. Esse meio foi suavemente misturado usando um bastão de vidro e, em seguida, levado a agitação em shaker a 100 ciclos/min por 1 hora à temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada sob vácuo utilizando papel de filtro Whatman seguido por centrifugação a 10.000 rcf, 5 °C durante 15 min. O sobrenadante líquido foi utilizado como enzima bruta para a determinação das atividades enzimáticas.

4.4. Determinação da atividade enzimática

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

A determinação da atividade CMCCase, avicelase e xilanase foram determinadas pela formação de açúcares redutores a partir dos substratos carboximetilcelulose, celulose microcristalina (avicel) e xilana, respectivamente. A mistura de reação contendo 0,1 ml da enzima bruta foi incubada a 55°C em banho maria com 0,9 ml de uma solução contendo 1,0% de substrato em tampão acetato 100 mM a pH 6,0. Após incubação a 50 °C por 10 min, o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Os controles foram preparados com a adição da enzima após a adição do reagente DNS. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm. Uma unidade (U) de atividade de CMCCase ou avicelase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 µmol de glicose por minuto sob as condições de reação acima, utilizando uma curva padrão de glicose para CMCCase e avicelase, enquanto, uma unidade (U) de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 µmol de xilose por minuto sob as condições de reação acima, utilizando uma curva padrão de xilose.

4.5. Características Físico-Químicas

As propriedades físicas e químicas das enzimas bruta foram determinadas utilizando as maiores atividades enzimáticas obtidas para os isolados. Assim, a enzima

foi caracterizada usando a solução enzimática bruta produzida na fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo, como fonte de carbono.

Para determinação do pH ótimo da atividade enzimática foi utilizado o tampão McIlvaine 100 mM (pH 3,0-8,0) e tampão glicina-NaOH 100 mM (pH 8,0-10,5). A mistura de reação para determinação do pH ótimo da atividade enzimática foi realizada utilizando xilano 0,5% a 55 °C para a atividade da xilanase.

Em seguida, foram realizados os ensaios para determinar a temperatura ótima de atuação da atividade enzimática. As misturas reacionais foram incubadas em diferentes temperaturas, de 45 °C a 90 °C, por 10 min. em banho-maria. As temperaturas ótimas foram determinadas utilizando os substratos nas mesmas condições do pH ótimo, descrito acima.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento das linhagens fúngicas

A partir das amostras de serrapilheira coletada nas duas áreas de Cerrado em estudo, foram isoladas 65 linhagens de fungos filamentosos e 58 linhagens leveduriformes produtoras de xilanase e celulasas, as quais estão representadas na Tabela 2. Os micro-organismos foram selecionados através de análises morfológicas

Tabela 2- Isolados fúngicos de áreas de Cerrado do Mato Grosso do Sul.

Local	Fungo filamentoso		Levedura	
	30 °C	45 °C	30 °C	45 °C
Fazenda São José, Inocência, MS	39	2	25	15
FEPE-UNESP Selvíria, MS	16	8	13	5

Fonte: Santos (2012)

Algumas linhagens foram selecionadas de forma aleatória para os ensaios de produção das enzimas celulolíticas e hemicelulíticas. Assim, as linhagens foram cultivadas sob fermentação em estado sólido por 72 horas, utilizando farelo de trigo como fonte carbono. A tabela 3 apresenta as análises de atividade enzimática para alguns fungos filamentosos cultivado. A melhor atividade de xilanase foi obtida pelas linhagens P1-14, P5-2, P2-2A e P1-13. A atividade CMCase foi maior para as linhagens P5-2, P1-14, P2-2A, P1-2, P1-13 e P1-3. Para a atividade avicelase as atividades não foram superiores a 0,20 U ml⁻¹, sendo os isolados P1-13, P1-14, P1-14B, P5A-9 e P1-21A os que apresentaram as maiores atividades.

Na tabela 4 foram apresentados alguns isolados representativos de cada ponto de amostragem e as atividades xilanase foi inferior a encontrada pelos micro-organismos isolados na propriedade de Inocência, MS. As linhagens P2-16A e P2D19 foram as linhagens com as maiores atividades para xilanase.

Tabela 3- Micro-organismos isolados de solo do Cerrado, Fazenda São José, município de Inocência/MS cultivado sob fermentação em estado sólido usando farelo de trigo como substratos, por 72 horas de fermentação.

Linhagens	Atividade enzimática (U ml ⁻¹)			Linhagens	Atividade enzimática (U ml ⁻¹)		
	Xilanase	CMCase	Avicelase		Xilanase	CMCase	Avicelase
P1-2	33,26	0,497	0,068	P1-21B	2,335	0,107	0,084
P1-3	29,23	0,340	0,059	P2-1B	0,499	0,220	0,055
P1-11	0,974	0,092	0,076	P2-2A	76,43	1,213	0,119
P1-13	58,88	0,481	0,239	P2-3	0,836	0,105	0,093
P1-14	99,20	1,765	0,194	P2B-6.1	1,420	0,114	0,079
P1-14B	2,065	0,199	0,160	P2B-6.2	1,201	0,111	0,076
P1-15	0,452	0,231	0,061	P5-2	86,87	2,356	0,122
P1-16	0,542	0,276	0,057	P5-7	0,419	0,076	0,087
P1-17	0,400	0,063	0,074	P5A	0,400	0,076	0,084
P1-19	0,423	0,079	0,086	P5A-6	0,362	0,071	0,048
P1-21A	2,131	0,137	0,125	P5A-9	1,306	0,133	0,142

Fonte: Santos (2012)

Tabela 4- Micro-organismos isolados de solo do Cerrado, da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), município de Selviria/MS, cultivado sob fermentação em estado sólido usando farelo de trigo como substratos, por 72 horas de fermentação.

Linhagens	Atividade Enzimática (U ml ⁻¹)	
	Xilanase	CMCase
P2D19	5,6	0,15
P3.2	3,9	0,22
P4.3	1,1	0
P7.2	4,5	0,17
P2-16A	9,2	0,41

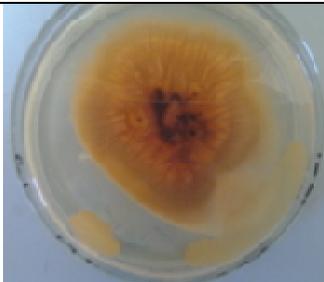
Fonte: Santos (2012)

5.2. Perfil de produção enzimática

Com base nos resultados apresentados na tabela 3, foram selecionadas as linhagens P1-2, P1-3, P-13, P1-14, P2-2A e P5-2 para os estudos de produção ao longo do tempo. No entanto, ao cultivar os isolados apenas as linhagens P1-13 e P2-2A

apresentaram crescimento, mas com atividade enzimática baixa para xilanase. Assim, foram selecionadas outras linhagens para realização desse ensaio. As linhagens P2-1B, P1-21B, P1-15, P1-16 e P1-17 foram selecionadas e cultivadas sob FES por 72 horas. A atividade xilanase não foi tão alta como os ensaios iniciais, apresentando entre 0,45 à 0,54 U ml⁻¹. Mesmo com esses resultados, sendo menor que os iniciais foi realizado um ensaio para avaliar a produção enzimática ao longo do tempo. Abaixo estão ilustrados o crescimento característico de cada um desses isolados, os quais foram submetidos ao estudo de produção enzimática ao longo do tempo (Fig 11).

Figura 11- Micro-organismos isolados de solo de Cerrado.

Local de coleta	Linhagem	Imagem do verso da placa	Imagem da frente da placa
Fazenda São José	P2-2A		
Fazenda São José	P1-21B		
Fazenda São José	P1-13		
Fazenda São José	P1-15		

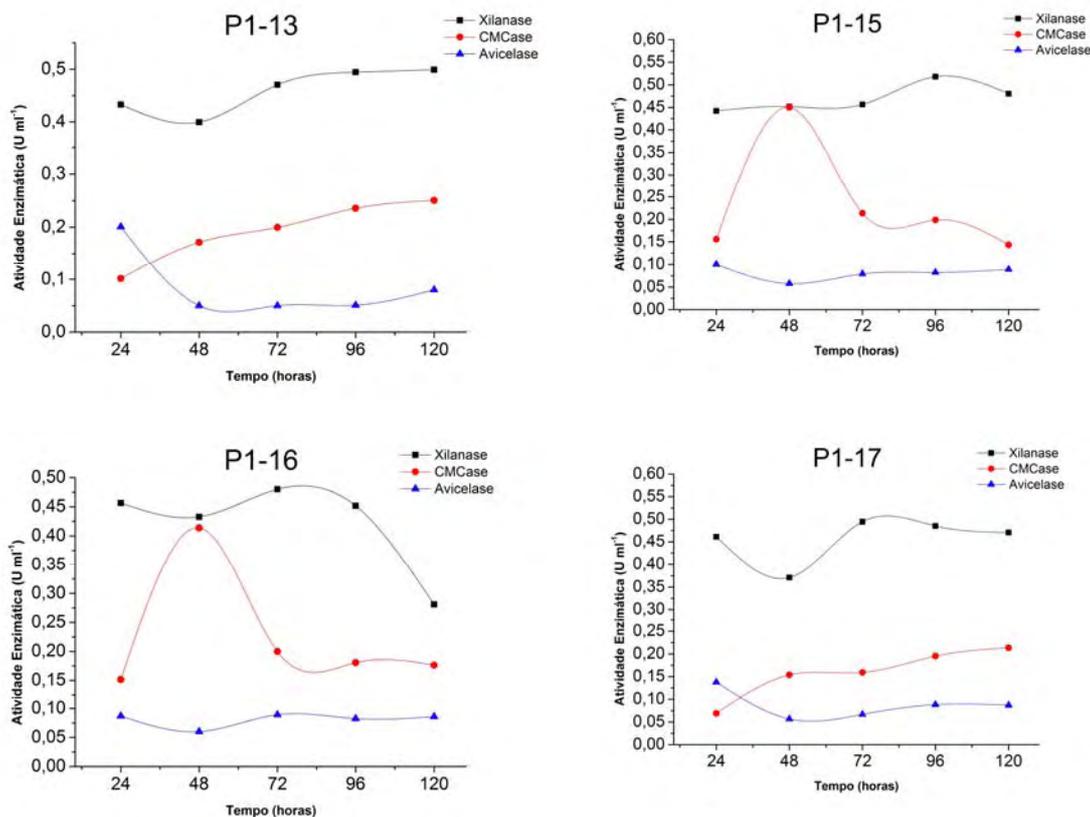
Fazenda São José	P1-16		
Fazenda São José	P1-17		
FEPE	P2-D19		

Fonte: Santos (2012)

Para determinação das atividades enzimáticas foram realizadas amostragens a cada 24 horas por um período de 120 horas. A Figura 12 está ilustrada a produção de xilanase, CMCase e avicelase produzida pelas linhagens P1-13, P1-15, P1-16 e P1-17.

Na figura 12 a atividade xilanase foi maior entre 72 e 120 horas para todas as linhagens avaliadas, de modo que as linhagens P1-13 e P1-15 foram as que mostraram maior atividade entre 96 e 120 horas, com 0,50 e 0,52 U ml⁻¹, respectivamente. Para a atividade de CMCase as linhagem P1-15 e P1-16 apresentaram maior atividade em 48 horas, com 0,45 e 0,41 U ml⁻¹, respectivamente. As atividades de Avicelase mostraram-se bem inferiores as das outras enzimas. A linhagem P1-13 apresentou maior atividade em 24 horas com 0,20 U ml⁻¹.

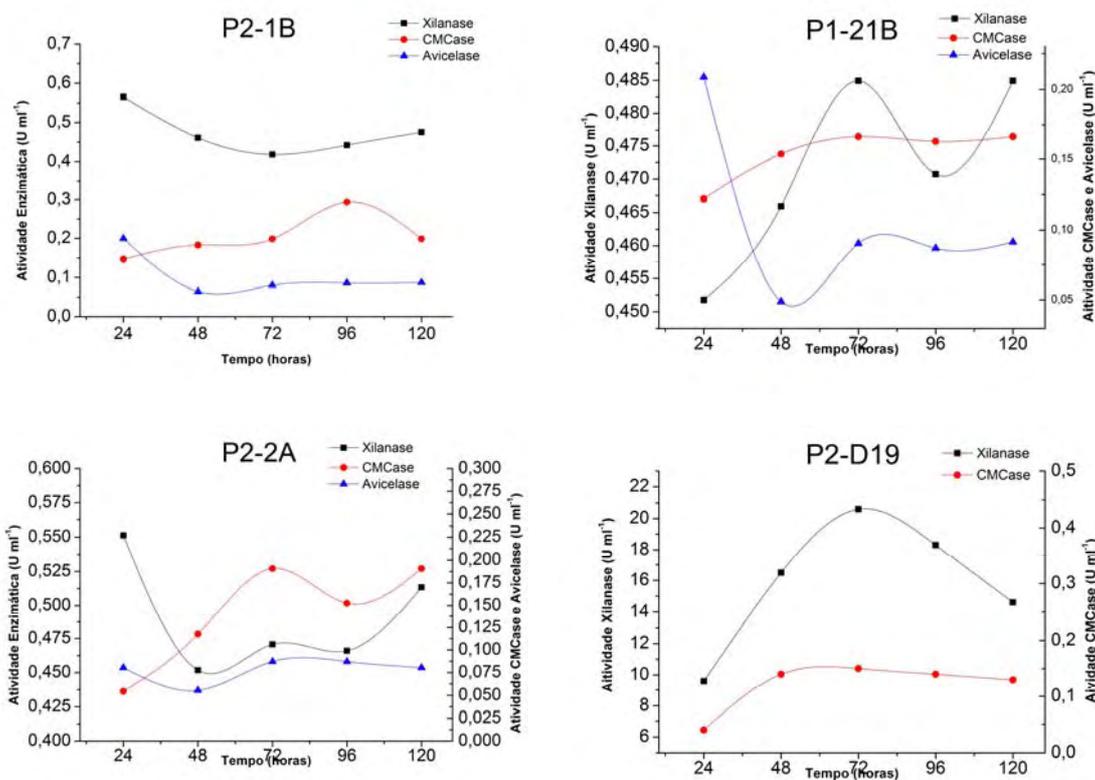
Figura 12- Perfil de produção de xilanase, CMCCase e Avicelase produzida pelas linhagens P1-13, P1-15, P1-16 e P1-17 em fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como substrato.



Fonte: Santos (2012)

Na figura 13 observa-se uma grande variação nas atividades da Xilanase. As amostras P2-1B e P2-2A mostraram uma atividade maior com 24 horas de cultivo com 0,57 e 0,55 U ml⁻¹, respectivamente. Porém as amostras P1-21B e P2-D19 mostraram maior atividade com 72 horas de cultivo, com 0,48 e 20,6 U ml⁻¹, respectivamente. Para a atividade de CMCCase todas as amostras apresentaram maior atividade entre 72 e 120 horas de cultivo, com 0,29 U ml⁻¹ para P2-1B com 96 horas de cultivo. Para as atividades de Avicelase as amostras P1-21B e P2-1B apresentaram melhor atividade em 24 horas de cultivo com 0,20 e 0,21 U ml⁻¹, respectivamente.

Figura 13- Perfil de produção de xilanase, CMCase e Avicelase produzida pelas linhagens P2-1B, P1-21B, P2-2A e P2-D19 em fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como substrato.



Fonte: Santos (2012)

Atividade enzimática de *Aureobasidium pullulans* cultivado sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono apresentou atividade xilanase de 5.0 U.mL^{-1} (LEITE et al., 2007).

Melhores resultados de produção de xilanase foram obtidos com *Thermoascus aurantiacus* sob FES com 107 U.mL^{-1} , 102 U.mL^{-1} e 97 U.mL^{-1} usando sabugo de milho, grama e palha de milho, respectivamente, como fonte de carbono (DaSILVA et al., 2005).

5.3. Efeito da fonte carbono na produção xilanase

Como a linhagem P2-D19 apresentou maior produção enzimática, foi realizado um estudo para a produção enzimática com diferentes fontes de carbono os quais estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5- Atividade enzimática produzida por P2D19 cultivado sob fermentação em estado sólido usando diferentes substratos, após 72 horas de fermentação.

Substratos	Atividade enzimática (U ml ⁻¹)	
	Xilanase	CMCase
Sabugo de milho	8,6	0,20
farelo de mandioca	0,7	0,73
farelo de trigo	20,6	0,15
ft + serragem	8,5	0,10
ft + bagaço de cana-de-açúcar	5,6	0,08

ft: Farelo de trigo.

Fonte: Santos (2012)

O farelo de trigo é um substrato complexo rico em proteínas (14%), carboidratos (27%), minerais (5%), gordura (6%) e vitamina B (ALVES-PRADO et al., 2010). Isto provavelmente contribui para um melhor crescimento e produção de enzimas por vários micro-organismos (LEITE et al., 2008; LEITE et al., 2007). Assim, as atividades enzimáticas foram melhores com a utilização do farelo de trigo como substrato com atividade enzimática de 20,6 U ml⁻¹.

A atividade enzimática para xilanase foi alta comparada às demais linhagens citadas neste estudo. Isto é um indicativo que P2-D19 tem um potencial para produzir bons níveis de xilanase.

Na literatura encontrou-se produção enzimática de xilanase inferior aos apresentados para P2-D19. A atividade enzimática de xilanase para *Aspergillus niger* ANL301 cultivado sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono foi de 6,47 U ml⁻¹ em 96 horas de cultivo, quando utilizado bagaço de cana como substrato a atividade enzimática foi de 0,95 U ml⁻¹ em 96 horas de cultivo (OKAFOR, 2007).

Gawande and Kamat (1999) obtiveram resultados semelhantes aos observados nos ensaios aqui apresentados, uma vez que a atividade xilanase produzida por *Aspergillus terreus quando* cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato foi de 21,2 U ml⁻¹. A atividade de CMCase foi de 0,48 U

ml⁻¹ obtendo uma baixa produção enzimática similar aos resultados apresentados neste trabalho. Os mesmos autores estudando a linhagem *Aspergillus niger* 44 nas mesmas condições de cultivo obtiveram uma atividade enzimática um pouco mais alta, sendo 26,7 U ml⁻¹ e 0,62 U ml⁻¹ para xilanase e CMCase respectivamente.

Utilizando bagaço de cana como substrato para fermentação em estado sólido para os fungos *A. terreus* e *A. niger* 44 a atividade enzimática de xilanase foi de 3,5 U ml⁻¹ e 18,0 U ml⁻¹ respectivamente. Para a atividade de CMCase nas mesmas condições de cultivo e para as mesmas linhagens os resultados obtidos foram de 0,13 U ml⁻¹ e 0,5 U ml⁻¹ respectivamente (GAWANDE; KAMAT, 1999).

Alguns autores tem otimizado meios de cultura para cultivo sob FES utilizando alguns aditivos na fonte de carbono. Assim, o fungo termofílico *Paecilomyces thermophila* J18 apresentou um pico de produção de xilanase de 18.580 U g⁻¹ quando cultivado a 50°C por 192 h e utilizando palha de trigo enriquecido com extrato de levedura como fonte de nitrogênio (DAMIANO et al., 2006). *Aspergillus niger* B03 apresentou atividade xilanase com 996 U ml⁻¹, quando cultivado sob FES em uma mistura de substratos composta de 1,5% de farelo de trigo, 2,4% de sabugo de milho e 0,6% de cevada (MILLER, 1959). *Fusarium oxysporum* quando cultivado sob FES, usando 2% de sabugo de milho, como fonte de carbono apresentou atividade xilanase de 245 U ml⁻¹ (BERGMEYER; BERNT, 1974).

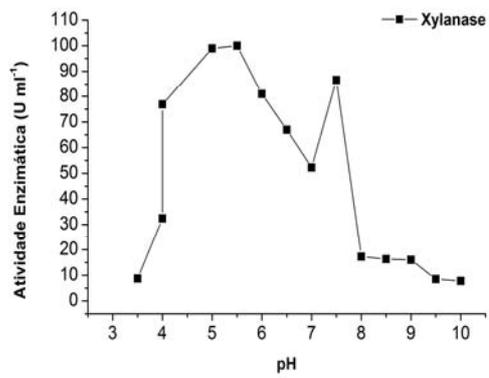
5.4. Características Físico-Químicas

As características físico-químicas foram avaliadas para enzima bruta produzida por P2-D19, sob FES utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono, no tempo de 72 horas para produção de xilanase.

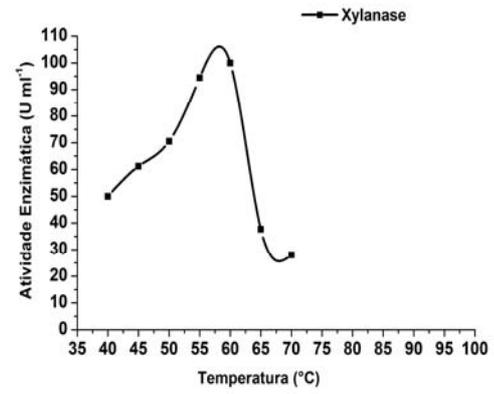
A xilanase produzida por P2D19 foi mais ativa em pH 5,0. Cerca de 85% da atividade foi mantida em pH 7,5 (Fig. 14a). A temperatura ótima dessa xilanase foi em 60 °C (Fig. 14b). Estes dados corroboram com os resultados anteriores para P2-D19 (ALVES-PRADO et al., 2010). O pH ótimo e temperatura ótima obtida para a xilanase produzida por *Aureobasidium pullulans* foi respectivamente, pH 5,0 e 50 °C (LEITE et al., 2007). A xilanase produzida por *Thermoascus aurantiacus* apresentou pH ótimo entre 5,0-5,5 e a temperatura ótima de 75 °C (DaSILVA et al., 2005), sendo superior ao obtido no presente estudo.

Figura 14- Efeito do pH (a) e da temperatura (b) na atividade da xilanase produzida P2D19. Os tampões usados foram: MacIlvaine (pH 3.0-8.0) e glicine-NaOH (pH 8.0-10).

a)



b)



Fonte: Santos (2012)

6. CONCLUSÃO

As áreas amostradas de Cerrado nativo tem uma grande diversidade de micro-organismos os quais mostraram-se com um alto potencial biotecnológico.

Neosartorya spinosa P2D19 apresentou com uma alta produção enzimática quando cultivada em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

Outro fator importante no perfil de produção da *N. spinosa* P2D19 é a baixa atividade celulase produzida por esse fungo em presença de resíduos agroindustriais rico em fibras. Tal característica pode ser interessante quando da aplicação de xilanase fúngica na indústria de papel e celulose.

7. REFERÊNCIAS

ALHO, C. J. R.; MARTINS, E. de S. (Ed.). **De grão em grão, o cerrado perde espaço: cerrado - impactos no processo de ocupação**. Brasília: WWF-Brasil: PRÓ-CER, 1995. 66 p.

ALI, S.; HOSSAIN, Z. Characteristics for glucoamylase from *Aspergillus terreus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Bangladesh, v. 71, n.1-6, p. 144-146, 1991.

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

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 161, n.1-8, p. 333-346, Maio 2010.

BACIC, A.; HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. In: PRIESS, J. (Ed.). **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1988. p. 297-371.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their applications: a review. **Applied microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n.1-6, p. 326-338, 2001.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. **Determination with glucose oxidase and peroxidase**. In: BERGMEYER H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974. p. 1205-1215.

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

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial α -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Ratan, v. 22, n.1-4, p. 375–407, 2002.

BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugd* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

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

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

CERRADO. **Manaus**: biblioteca virtual do Amazonas. Amazonas: Governo do Estado do Amazonas, 2004. Disponível em:
<http://www.bv.am.gov.br/portal/conteudo/meio_ambiente/cerrado.php> Acesso em: 14 set. 2011.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lípases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

DASILVA, R.; FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v.31, n.2, p. 249-260, 1997.

DASILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1-4, p. 235-241, 2005.

DAMIANO, V. B.; WARD, R.; GOMES, E.; ALVES-PRADO, H. F.; DASILVA, R. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 129, n. 1-3, p. 289-302, 2006.

DELMER, D. P. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 245-276, 1999.

DIANESE, J. C.; CHAVES, Z. M.; SANCHEZ, M. Micobiota das Matas de Galeria. In : RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L. da; SOUSA-SILVA, J. C. (Ed.). **Cerrado: matas de galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. p. 637 - 662.

DIENES, D. Treatment of recycled fiber with trichoderma cellulases. **Industrial Crops and Products an International journal**, [S.l.], v. 20, p. 11- 21, 2003.

EMONS, A. M. C.; MULDER, M. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 1-12, p. 35-40, 2000.

EMONS, A. M. C.; SCHEL, J. H. N.; MULDER, M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, New York, v. 4, n. 1-6, p. 22-26, 2002.

ENGLEHARDT, J. Sources, industrial derivatives and commercial applications of cellulose. **Carbohydrates in Europea**, Amsterdam, v. 12, p. 5-14, 1995.

SO BIOLOGIA. **Estrutura da parede celular vegetal**. Porto Alegre: Porto Alegre. 1998, Disponível em:
<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia_vegetal/morfovegetal15.php
>. Acesso em: 5 julh. 2012.

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

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2006. 130 f. Tese (Doutorado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 623-638, 2009.

FRY, S. C. **The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis**. London: Longman Scientific and Technical, 1988. 246 p.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application, **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 1-6, p. 511-519, 1999.

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

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

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and production of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, n. 1-6, p. 375-384, 2005.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary-cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 139-168, 1989.

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

JAYANI, R. S.; SAXENA, S. E.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, Londres, v. 40, n. 9, p. 2931 - 2944, 2005.

KADOWAKI, M. K.; SOUZA, C. G. M.; SIMÃO, R. C. G.; PERALTA, R. M. Xylanase production by *Aspergillus tamari*., **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 66, n. 2, p. 97-106, 1997.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 59, n. 1, p. 63-67, 1997.

KLEMAN-LEYER, K. M.; SIIKA-AHO, M.; TEERI, T. T.; KIRK, T. K. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 1-12, 1996. 2883.

KILIKIAN, B. V. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n. 1-4, p. 10-12, 1996.

KRETSCHMANN, D. Velcro mechaniscs in wood. **Natural Materials**, Madison, v. 2, n. 12, p. 775-776, 2003.

LATIF, F.; ASGHER, M.; SALEEM, R.; AKREM, A.; LEGGE, R. L. Purification and characterization of a xylanase produced by *Chaetomium thermophile* NIBGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 1-12, p. 45–50, 2006.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 1–24, 1997.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; DASILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation, **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v. 137-140, n. 1-12, p. 281-288, 2007.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DASILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 43, n. 1-5, p. 391–395, 2008.

LI, Y.; LIU, Z.; CUI, F.; PING, L.; QIU, C.; LI, G.; YAN, L. Isolation and identification of a newly isolated *Alternaria* sp. ND-16 and characterization of xylanase, **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v. 157, n. 1-3, p. 36–49, 2009.

LIU, W.; ZHU, W.; LU, Y.; KONG, J.; MA, G. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n. 1-8, p. 331-336, 1998.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MACCANN, M. C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wal. In: LLOYD, C. W. (Ed.). **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 109-129.

MACNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C. ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; CLARK, D. P. **Microbiologia de brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MENDONÇA, R. C.; FEFILII, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do bioma cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. v. 2, 1279 p.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Relatório técnico de monitoramento do desmatamento no distrito federal**. Brasília: Centro de Sensoriamento Remoto - CSR/IBAMA, 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6765-6776, p. 853-58, 2000.

NASCIMENTO, J. S. **Noções básicas sobre fungos**. [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/labfitop/2011-1/Fungos%20-%20No%E7%F5es.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2011.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para produção de α -amilases por *Penicillium* sp. e caracterização da enzima. **Revista Eletronica Biociências, Biotecnologia e Saúde**, Paraná, n. 1, jan-abr., 2011.

OKAFOR, U. A.; OKOCHI, V. I.; ONYEGEME-OKERENTA; B. M. AND NWODO-CHINEDU, S. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro – wastes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6 , n. 14, p. 1710-1714, July 2007.

PALMA-FERNANDEZ, E. R. D.; GOMES, E.; DASILVA, R. Purification and characterization of two α -glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Folia Microbiol.**, New York, v. 47, n. 1-6, p. 685–690, 2002.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 1-10, p.1153-1169, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE-LA-RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53–63, 2002.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 1-6, p.577–591, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M. . Properties and commercial applications of xylanases from fungi. In: M.K.Rai. (Org.). **Advances in fungal biotechnology**. Nova Delhi: International Publisher, 2009. p. 82-101.

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

REITER, W. D.; CHAPPLE, C.; SOMERVILLE, C. R. Mutants of *arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 335-345, 1997.

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 11, p. 626-644, 1989.

ROLAND, J. C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. **Tissue and Cell**, Siena, v. 24, n. 3, p. 335-345, 1992.

RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido -Linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP.** 2001. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

RUEGGER, M. J. S.; e 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**, São Paulo, v.27, n. 1-4, p. 205-211, 2004.

SAHA, B. C. -L- Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p.403–423, 2000.

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

SANTOS, C. R., **Expressão, purificação e ensaios de cristalização de celulases fúngicas.** Campinas: Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, 2011.

SANTOS, E. A. O. **Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de xilanase.** 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Ilha Solteira, 2012.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, p. 1-7, 2012.

SHAH, R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochem.**, London, v. 40, n.1-12, p. 1763–1771, 2005.

SILVA, M. A. C. R. da. **Isolamento e caracterização dos polissacarídeos das paredes celulares da azeitona**. 1993. 205f. Tese (Doutorado em Química - ramo de Bioquímica)- Universidade de Aveiro, Portugal. 1993.

SIMÕES, M. L. G. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga**. 2006. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

SILVA, A. R. Z. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de fitase por aspergillus niger em fermentação no estado sólido utilizando subprodutos agrícolas para aplicação como aditivo na alimentação de aves e suínos**. 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estruturas, biogênese e expansão. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p. 339-364.

TAVARES, V. B., SIVIERI, K., CERON, C. R., DA SILVA, R., TRABUCO, E. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.1-6, p. 722-725, 1998.

TEUNISSEN, M. J.; CAMP, H. J. M. O. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 63-76, 1993.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 12, n. 1-6, p. 413-35, 1992.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for food sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1972. 636 p.

WIKIPÉDIA. **Cerrado**. [S.l.: s.n.],1990. Disponível em:
<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cerrado>>. Acesso em: 14 set. 2011.