

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis**  
**Gessica Oliveira Marinho**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASES**  
**PRODUZIDAS PELO FUNGO ISOLADO EA 1.3.1.**

**Diamantina**

**2019**

**GESSICA OLIVEIRA MARINHO**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASES  
PRODUZIDAS PELO FUNGO ISOLADO EA 1.3.1.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vivian Machado Benassi  
Co-orientador: David Lee Nelson

**Diamantina**

**2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M388p

Marinho, Gessica Oliveira

Produção e caracterização bioquímica de xilanases produzidas pelo fungo isolado EA 1.3.1 / Gessica Oliveira Marinho, 2020.

88 p. il.

Orientadora: Vivian Machado Benassi

Coorientador: David Lee Nelson

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Enzimas. 2. Fungos filamentosos. 3. Resíduos agroindustriais. I. Benassi, Vivian Machado. II. Nelson, David Lee. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 662.669**

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641

Gessica Oliveira Marinho

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASES  
PRODUZIDAS PELO FUNGO ISOLADO EA 1.3.1.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vivian Machado Benassi  
Co-orientador: David Lee Nelson

Data de aprovação 26/07/2019



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vivian Machado Benassi  
Instituto de Ciências e Tecnologia –UFVJM



---

Prof. Dr. Juan Pedro Bretas Roa  
Instituto de Ciências e Tecnologia –UFVJM



---

Dr. Tássio Oliveira Brito  
Universidade de São Paulo – USP

Diamantina

2019

**Dedico**

Ao meu Paizinho, por tudo o que representa para mim! Por ser o maior responsável pelos meus sonhos e entusiasmo.

## AGRADECIMENTOS

Acredito que nada acontece por acaso, temos um Pai maior que nos guia e nos permite aquilo que pedimos com fé. Portanto, obrigada Senhor, toda essa história “louca” foi benção Tua, sou grata por me proporcionar sonhos, condições e coragem de realizá-los.

Ao meu amado Paizinho, sou grata pela sua vida, e por sempre me olhar com amor. E que lá atrás pediu para eu ir, para conquistar o meu mundo. Talvez hoje esteja arrependido, pois eu não quis mais voltar. E mesmo sem entender o porquê das minhas escolhas, afirma que sempre vai escolher me ver sonhar e voar.

Ao meu querido Tio, agradeço por ser meu segundo pai, por sempre ajudar, por sempre estar lá. Aquele que no início falou que ‘biólogo e professor também podem crescer, basta insistir’. Obrigada Tio Non, sua ajuda, força e confiança sempre irá me mover.

As minhas mães, que pedem sempre para eu voltar, que afirmam que já chega! Obrigada mamãe e Tia Ana. Irei retornar, antes disso preciso me construir para agradecer todo o esforço que tiveram até aqui para me tornar mulher.

As minhas irmãs, Pollyana e Gardênia, por dividirem a vida comigo, por mostrar que é preciso insistir, mesmo quando a luta nos parece perdida. Obrigada Polly, por sempre falar VAI, e por me permitir ser Tia. Obrigada Gard, o melhor sorriso, mesmo em lágrimas.

Às minhas pequenas Valentina, Malu e Alice. Obrigada por me oferecerem o riso mais real e a espera mais gostosa.

Ao melhor namorado, aquele que acredita e ver um potencial onde eu vejo apenas impossibilidades. Aquele que nunca desistiu de nós e de mim, mesmo quando eu nunca acreditei. Obrigada, Paixão! A credibilidade que você deposita em mim me impulsiona.

Meu carinho, respeito e agradecimento a Prof. Vivian, por me permitir fazer parte da sua equipe, mesmo sem entender o que eu vim fazer aqui. A sua insistência em nos mostrar que podemos crescer, em mostrar que existe um mundo lá fora que exigirá e nos permitirá muito mais, nos instiga a insistir e buscar mais enzimas por aí. Sou grata pela confiança e por ainda não ter me matado.

Agradeço a melhor família que eu poderia ter nessa cidade, a melhor turma de laboratório, os melhores amigos, o melhor sorriso, a melhor partilha, desde já a maior saudade: menina Jade com o nosso pequeno e esperado Tomás, Ingrid (a desbocada), Eloísa (a mais calma), Tarcísio (o filho mais velho), Gabi e Jojo, com aquela tranquilidade absurda, Alice (a refinada com a sua mais gostosa criança), Bumba (o maior amor da vida da Tia).

Temos as conversas mais incríveis e sem lógica, as melhores risadas, os melhores 'shows', as comidas mais estranhas, o ataque das marmitas e a exploração sem limites.

Aos agregados: Menina Júnia, Maria Emília, Larissa, Isabela, Carol; Amigo Agnaldo Guilherme (melhor congresso ever) o mais rico e fino da Unifesp; Guilherme, um anjo que sempre me salva; Naty, a melhor visita do laboratório, minha querida companhia.

Aos amigos de turma, Tati a maravilhosa; Míriam, Paula, Cris, Lucas, o Calouro. Obrigada por tornar as aulas divertidas, mesmo sendo aulas.

Às amigas de república, por me enlouquecerem sempre, mas deixam a minha vida sempre agitada, minha pequena Thayná, Lannea, Jéssica, Luana, Fernada e Carl, o errado e entrosado.

À Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri por minha formação acadêmica e pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

As biotecnologias relacionadas com as energias renováveis, tais como os biocombustíveis obtidos de fontes residuais, de baixo custo, e que representam tecnologias limpas, tornaram uma solução para os problemas ambientais. Assim, objetivou-se desenvolver um bioprocessamento para obtenção de um extrato rico em xilanases fúngicas, determinando seus parâmetros físico-químicos de cultivo do microrganismo, além de caracterizar bioquimicamente o extrato bruto obtido. A otimização da produção xilanolítica foi obtida analisando o desenvolvimento do fungo diante das variações dos recursos disponíveis e com análise bioquímica do extrato bruto. Variou-se os meios de cultivo e tempo de crescimento, fonte de nitrogênio, de carbono, solução de sais, concentração de esporos e pH inicial do meio. A atividade xilanásica foi determinada pela formação dos açúcares redutores pela hidrólise do substrato xilana beechwood 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, à 55 °C, utilizando-se o ácido 3',5'-dinitrosalicílico como agente colorimétrico. A produção xilanolítica máxima foi obtida pelo fungo *EA 1.3.1* em meio de cultura líquido Khanna enriquecido com solução de sais CP, durante quatro dias de forma estacionária, utilizando-se extrato de levedura como fonte de nitrogênio. A produção xilanolítica apresentou maiores níveis de atividade quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo farelo de trigo com 25,63 U.mL quando comparada com as outras fontes testadas. Vale citar que, a palha de cana-de-açúcar e semente de abóbora também favoreceram a síntese enzimática e, portanto, podem ser utilizadas como fontes alternativas para a produção de xilanases. O pH inicial do meio de cultivo foi de 8,5 e a concentração ideal de inóculo tem ordem de grandeza de 10 esporos/mL. Após a otimização de cultivo, realizou-se a caracterização bioquímica das xilanases, observando-se que a temperatura e pH ideais de ensaio enzimático foram 65 °C e 6,5, respectivamente. Visualizou-se que à 50 °C o extrato enzimático apresentou-se estável, perdendo apenas 8% da sua atividade após 90 minutos de incubação e diminuindo sua atividade com exposição a temperaturas mais elevadas. As enzimas se apresentaram estáveis à pH 5,0, durante 90 minutos. Concluiu-se, assim, que o fungo isolado demonstrou elevada atividade xilanolítica, podendo ser produzido com custo reduzido, devido às fontes de carbono de baixo custo, além de apresentarem características importantes em processos industriais, como atividade enzimática em ampla faixa de temperatura e pH e estabilidade a temperatura.

**Palavras chaves:** enzimas, fungos filamentosos, resíduos agroindustriais



## ABSTRACT

Renewable energy-related biotechnologies, such as biofuels from low-cost, residual sources that represent clean technologies, have become a solution to environmental problems. The objective of this work was to develop a bioprocess to obtain a concentrate rich in xylanases of fungal origin, determining its physicochemical parameters of microorganism cultivation for a higher xylanolytic activity, besides biochemically characterizing the crude extract obtained. The optimization of the xylanolytic production was obtained by analyzing the development of the fungus in face of the variations of available resources and with biochemical analysis of the crude extract. The means and time of culture, nitrogen source, carbon, salt solution, spore concentration and initial pH of the medium were varied. The xylanic activity was determined by the formation of the reducing sugars by the hydrolysis of the substrate xylan beechwood 1% (m / v) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, at 55 ° C using 3', 5' dinitrosalicylic acid as colorimetric agent. The maximum xylanolytic production was obtained by the fungus EA 1.3.1 in Khanna liquid culture medium enriched with CP salts solution, for four days in a stationary way, using yeast extract as a nitrogen source. The xylanolytic production showed higher levels of activity when the microorganism was grown in medium containing wheat bran with 25.63 U.mL<sup>-1</sup>, when compared to the other sources tested. It is worth mentioning that sugarcane straw and pumpkin seed also favored enzymatic synthesis and therefore can be used as alternative sources for the production of xylanases. The initial pH of the culture medium was 8.5, and the optimum inoculum concentration had an order of magnitude of 10<sup>5</sup> spores / mL. After optimization of the fungus culture, the biochemical characterization of the xylanases was performed, observing that the ideal temperature and pH of the enzymatic assay were 65 ° C and 6.5, respectively. It was observed that at 50 ° C the enzymatic extract was stable, losing only 8% of its activity after 90 minutes of incubation and decreasing its activity with exposure to higher temperatures. The enzymes were stable at pH 5.0 for 90 minutes. It was concluded that the isolated fungus showed high xylanolytic activity and can be produced on a large scale with low cost, due to the low cost carbon sources for microorganism cultivation, besides presenting important characteristics in industrial processes such as enzymatic activity in wide range of temperature and pH and stability to temperature.

Keywords: enzymes, xylanases, agroindustrial residues

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Esquematização de uma molécula de xilana  | 34 |
| Figura 2: Estrutura da xilana e as regiões de catálise de diferentes classes hemicelulolíticas, as endoxilanase, $\beta$ -xilosidase, $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e acetil xilana esterase. | 41 |
| Figura 3: Análise dos meios de cultivo e tempo de crescimento do fungo EA 1.3.1 para produção xilanolítica  | 55 |
| Figura 4: Análise do fungo EA 1.3.1 para produção xilanolítica em meio Khanna com diferentes fontes de nitrogênio   | 58 |
| Figura 5: Análise do fungo EA 1.3.1 para produção xilanolítica em meio Khanna com diferentes soluções de sais   | 60 |
| Figura 6: Análise do potencial de resíduos agroindustriais para produção xilanolítica pelo fungo EA 1.3.1   | 62 |
| Figura 7: Análise da diluição da solução de esporos do fungo EA 1.3.1 para produção xilanolítica  | 64 |
| Figura 8: Análise do pH inicial do meio de cultura Khanna para produção xilanolítica pelo fungo EA 1.3.1  | 65 |
| Figura 9: Superfície de resposta e curvas de contorno para as variáveis pH (X1) e temperatura (X2) para atividade xilanolítica do fungo EA 1.3.1  | 66 |
| Figura 10: Estabilidade à temperatura do extrato bruto solúvel  | 68 |
| Figura 11: Estabilidade ao pH   | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Composição química de fontes de biomassa lignocelulósica  | 30 |
| Tabela 2: Características encontradas entre celulose e hemicelulose   | 32 |
| Tabela 3: Diferentes estruturas das xilanas   | 34 |
| Tabela 4: As Endo- $\beta$ -1,4 xilanase, principais famílias glicosil hidrolase (GH) e microrganismos produtores | 42 |
| Tabela 5: As $\beta$ -1,4-xilosidase, principais famílias glicosil hidrolase (GH) e microrganismos produtores     | 44 |
| Tabela 6- Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo e atividade enzimática   | 52 |
| Tabela 7: Determinação do meio de cultivo e do tempo de crescimento para a produção de xilanases                  | 55 |
| Tabela 8: Determinação da fonte de nitrogênio do meio Khanna para produção da xilanase                            | 57 |
| Tabela 9: Análise do meio Khanna com diferentes soluções de sais no cultivo do fungo para produção de xilanase    | 59 |
| Tabela 10: Análise da melhor fonte de carbono para produção de xilanases  | 61 |
| Tabela 11: Efeito da concentração de esporos no inoculo do fungo em meio submerso para produção de xilanase       | 63 |
| Tabela 12: Análise do pH inicial do meio de cultura do fungo EA 1.3.1 na produção de xilanases                    | 64 |
| Tabela 13: Análise de variância para a atividade de xilanases   | 66 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|           |  |
|-----------|--|
| atm       | Atmosfera  |
| cm        | Centímetro   |
| Da        | Dalton   |
| DNS       | Ácido 3',5'-dinitrosalisílico                            |
| DCCR      | Delineamento Composto Central Rotacional                 |
| EUA       | Estados Unidos da América                                |
| EPS       | Exopolissacarídeos                                       |
| FSm       | Fermentação submersa                                     |
| g         | Gramas   |
| h         | Horas  |
| ICT       | Instituto de Ciência e Tecnologia                        |
| IBGE      | Instituto Brasileiro de Geografia e estatística          |
| LIPEVVALE | Laboratório Integrado de Pesquisa e Ensino Multiuso      |
| μmol      | Micromol   |
| mg        | Miligrama  |
| mL        | Mililitro  |
| nm        | Nanometro  |
| pH        | Potencial hidrogeniônico                                 |
| Pr.       | Presente   |
| q.s.p     | Quantidade suficiente para                               |
| UFVJM     | Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri |
| μ         | Micro  |
| °C        | Celsius  |
| T         | Temperatura  |
| %         | Porcentagem  |
| $\alpha$  | Alfa   |
| $\beta$   | Beta   |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introdução.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>Objetivos.....</b>  | <b>20</b> |
| 2.1 Objetivo geral.....  | 21        |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 21        |
| 3.1 Prospecção de fungos filamentosos.....   | 24        |
| 3.2 Biocombustíveis.....   | 26        |
| 3.3 Etanol de segunda geração.....   | 28        |
| 3.4 Biomassa lignocelulósica e a parede celular vegetal.....   | 29        |
| 3.4.1 Celulose.....  | 31        |
| 3.5 Otimização da produção de xilanases pelo fungo EA 1.3.1.....                                     | 48        |
| 3.5.1 Pectina.....   | 36        |
| 3.5.2 Lignina.....   | 36        |
| 3.6 Hidrólise da biomassa lignocelulósica.....   | 36        |
| 3.6.1 Complexo de enzimas celulolíticas.....   | 38        |
| 3.6.2 Complexo de enzimas xilanolíticas.....   | 39        |
| <b>Metodologia.....</b>  | <b>46</b> |
| 4.1 Manutenção do isolado.....   | 47        |
| 4.2 Inóculo e Contagem dos conídios em câmara de Neubauer.....                                       | 47        |
| 4.3 Obtenção da massa micelial e do extrato bruto enzimático.....                                    | 47        |
| 4.4 Dosagem da atividade enzimática por determinação de açúcares redutores.....                      | 48        |
| 4.5  |           |
| 4.5.1 Análise do melhor meio de cultura e efeito do tempo de cultivo na produção enzimática<br>..... | 48        |
| 4.5.2 Efeito da fonte de nitrogênio no cultivo do fungo para produção enzimática.....                | 50        |
| 4.5.3 Efeito da solução de sais do meio submerso para produção de xilanase.....                      | 50        |
| 4.5.4 Efeito da fonte de carbono no cultivo do fungo EA 1.3.1 na produção de xilanase.....           | 50        |

|              |  |
|--------------|--|
| 4.5.5        |  |
| 4.5.6        | Efeito do pH inicial do meio de cultivo para produção da xilanase.....51   |
| 4.6          | Caracterização bioquímica da enzima solúvel.....51   |
| 4.6.1        | Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática utilizando Delineamento Composto Central Rotacional DCCR <sup>2</sup> ..... 51 |
| <b>4.6.2</b> | <b>Termoestabilidade da xilanase produzida pelo fungo EA 1.3.1.....52</b>  |
| 4.6.3        | Estabilidade ao pH da xilanase produzida pelo fungo EA 1.3.1.....52  |
|              | <b>Resultados e Discussões.....53</b>  |
| 5.1.1        | Efeito da concentração de esporos no inoculo do meio submerso para produção enzimática.....51  |
| 5. 1. 1      | Análise do melhor meio de cultura e efeito do tempo de crescimento do fungo EA 1.3.1 na produção enzimática.....54                   |
| 5.1.2        | Efeito da fonte de nitrogênio.....57   |
| 5.1.3        | Efeito das soluções de sais.....58   |
| 5.1.4        | Efeito da fonte de carbono.....60  |
| 5.1.5        | Efeito da concentração de esporos no inóculo do fungo em meio submerso para a produção de xilanases.....62                           |
| 5.1.6        | Efeito do pH inicial do meio de cultivo do fungo EA 1.3.1 para produção de xilanase 64   |
| 5.2          | Caracterização bioquímica da enzima solúvel.....65   |
| 5.2.1        | Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.....65   |
| 5.2.2        | Efeito da estabilidade à temperatura e pH.....67   |
|              | <b>Conclusões.....71</b>   |
|              | <b>Referências.....73</b>  |

## 1. Introdução

Os processos biotecnológicos vêm conquistando um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, mostrando características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos convencionais, bem como a preocupação com as questões ambientais, que impulsionam pesquisas em busca de biotecnologias que não degradam e conservem o meio ambiente.

As tecnologias biológicas relacionadas com as energias renováveis, tais como os combustíveis obtidos a partir de fontes amplamente disponíveis, de baixo custo, e que representem tecnologias limpas, tornaram uma necessidade mundial, devido à alta demanda energética, o risco de redução das reservas fósseis, e, principalmente, a degradação ambiental que os combustíveis tradicionais provocam.

Nesse sentido, além de uma necessidade econômica, houve um interesse crescente no uso de resíduos agroindustriais como substratos para bioprocessos que contribuem para minimizar os problemas ambientais decorrentes do seu descarte na natureza. Como exemplos têm-se o etanol de segunda geração, ou seja, aquele obtido a partir da degradação de materiais lignocelulósicos.

Entretanto, a hidrólise desses materiais a açúcares passíveis de fermentação exige métodos eficientes, específicos e de baixo custo de modo a viabilizar economicamente o processo. Como alternativas para essa hidrólise destaca-se as enzimas, tais como as celulasas e hemicelulasas, destacando as xilanases, biocatalizadoras que atuam sobre o substrato xilana para formação de xilose.

Esses catalisadores podem ser sintetizados a partir de vários organismos vivos, como fungos, bactérias, células animais e vegetais. Os extratos enzimáticos obtidos de fungos possuem, geralmente, maior atividade do que aqueles provenientes do cultivo de bactérias. Além disso, esses microrganismos possuem a capacidade de produzir diferentes complexos de enzimas lignocelulósicas, permitindo hidrolisar não somente as cadeias principais que formam esses resíduos, mas também, as suas ramificações.

Os altos custos do processo de produção e a eficiência biotecnológica das enzimas impulsionam estudos sobre sua produção e ação, com o intuito de maximizar seus usos e facilitar a produção e disseminação dos produtos oriundos da sua aplicação. Dessa forma, cepas de microrganismos e sistemas de fermentação que atendam a essa necessidade biotecnológica precisa ser estudada.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver um bioprocesso para obtenção de um extrato bruto rico em xilanases de origem fúngica, determinando seus parâmetros físico-químicos de cultivo do microrganismo para uma maior atividade xilanolítica, além de caracterizar bioquimicamente o extrato bruto obtido.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Verificar o melhor meio de cultura para crescimento do fungo produção enzimática em relação ao tempo de cultivo;
- ✓ Analisar diferentes fontes de nitrogênio do meio;
- ✓ Verificar a melhor solução de sais do meio para maior atividade xilanolítica;
- ✓ Testar diferentes fontes de carbono, dentre as quais resíduos agroindustriais, indutoras ou repressoras da produção enzimática;
- ✓ Verificar o pH inicial do meio de cultura e a concentração de esporos do meio;
- ✓ Caracterizar o extrato enzimático bruto quanto à temperatura e pH ótimos, bem como, avaliar sua estabilidade frente a esses parâmetros.



### 3. Referencial Teórico

Os processos biotecnológicos vêm se destacando no desenvolvimento tecnológico mundial, mostrando características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos convencionais. Bem como a preocupação com as questões ambientais, que impulsionam pesquisas em busca de biotecnologias que não degradam e conservem o meio ambiente.

O aumento do preço do petróleo, a instabilidade política e econômica mundial e as crescentes preocupações ambientais têm conduzido a novos desafios em busca de biotecnologias relacionadas com as fontes renováveis de energia, e de alternativas ao uso do petróleo. Esta busca tem mobilizado, internacionalmente, setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais, com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos.

Assim, os combustíveis obtidos a partir de fontes disponíveis, de baixo custo, e que representam tecnologias limpas, tornaram-se uma necessidade mundial, nesse sentido, além de uma necessidade econômica, houve um interesse crescente no uso diversificado de resíduos agroindustriais, contribuindo para minimizar os problemas ambientais decorrentes do seu descarte na natureza.

Como exemplo têm-se o etanol de segunda geração, aquele obtido a partir da degradação de materiais lignocelulósicos (LCMs) (MASAMI *et al.*, 2008; SEDLMEYER, 2011). A utilização de LCMs para a produção de álcool etílico combustível tornou-se uma prioridade mundial dentro do contexto de energia renovável. Por se tratar de resíduos ricos em compostos potenciais para a produção de etanol, assim como outros produtos de alto valor agregado (HILL *et al.*, 2006, KANG *et al.*, 1999).

Entretanto, o uso desses resíduos envolve um processo ainda em desenvolvimento, pois a hidrólise desses materiais a açúcares fermentescíveis exige métodos eficientes, específicos e de baixo custo, de modo a viabilizar economicamente o processo.

Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos, utilizando-os como substrato para a produção de biomoléculas. Dentre estas destacam-se as enzimas microbianas, que são moléculas biologicamente ativas. Os microrganismos proporcionam uma produção maior, mais rápida e facilmente controlada de seus metabólitos e, por este motivo, essas enzimas são preferencialmente utilizadas na indústria. Além da facilidade de obtenção, os produtos de origem microbiana são independentes de condições geográficas/sazonais e são menos

onerosos, uma vez que se pode utilizar substratos baratos como os resíduos agrícolas.

Entre esses microrganismos, os fungos filamentosos são particularmente interessantes, apresentando-se como peças fundamentais para o desenvolvimento biotecnológico (BENNETT, 1998). Além da aplicação controlada de enzimas, esses microrganismos são também utilizados para a produção de muitos outros metabólitos de interesse para diferentes áreas da indústria biotecnológica.

Os fungos são capazes de produzir diferentes enzimas extracelulares e são biocatalizadores mais ativos em baixo pH (ALEXANDRINO *et al.*, 2007). Geralmente, os extratos enzimáticos obtidos destas culturas, possuem maior atividade do que aqueles provenientes do cultivo de bactérias.

Entre as enzimas produzidas pelos fungos, destacam-se as xilanases. Enzimas hemicelulolíticas que agem na degradação da hemicelulose, constituinte da biomassa lignocelulósica, liberando pentoses, principalmente D-xilose. As xilanases comerciais disponíveis são principalmente de origem fúngica e possuem atividade ótima acima de 50°C, temperatura mais alta do que a exigida pela sacarificação.

A importância de encontrar enzimas microbianas que possuem atividade ótima compatível com a degradação de hemiceluloses viabilizaria a produção de bioetanol de segunda geração. Além disso, esses micro-organismos possuem a capacidade de produzir diferentes complexos de enzimas lignocelulósicas, permitindo hidrolisar, não somente as cadeias principais que formam esses resíduos, mas também, as suas ramificações.

Contudo, a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, mesmo apresentando alta eficiência e especificidade, possuem um custo muito alto para a proposta de produção de biocombustíveis, exigindo um sistema de produção que permita um baixo custo do preparado enzimático final. Portanto, cepas de microrganismos e sistemas de fermentação que atendam a essa necessidade biotecnológica precisa ser buscada.

### **3.1 Prospecção de fungos filamentosos**

Durante anos estudiosos debateram sobre quais organismos deveriam ser classificados como integrantes do Reino Fungi. Análises morfológicas permitiram afirmar que são seres eucarióticos e quimioheterotróficos, sendo uni ou multicelulares (DEACON, 2006). Propagam-se por meio de esporos e armazenam glicogênio como fonte de reserva (GUERRERO & SILVEIRA, 2003). Apresentam uma diversidade metabólica alta, podendo

crescer nos mais diversos substratos, estando largamente distribuídos no ar, na água e no solo (TREVISAN *et al.*, 2004).

Eram inclusos no reino Plantae, deixando-o quando características distintas foram observadas em seus integrantes, tais como: ausência de pigmento fotossintético, o armazenamento do glicogênio como reserva energética (e não o amido), e a ausência de tecidos verdadeiros (BORZANI *et al.*, 2001).

Os fungos interagem com todos os principais grupos de organismos, pois compartilham características entre eles. Apresenta descendência de um ancestral compartilhado com animais há cerca de um bilhão de anos, mais ou menos 500 milhões (BERBEE & TAYLOR, 2010), os fungos constituem uma linhagem eucariótica maior, igual em número aos animais e superior às plantas. No grupo encontra-se bolores, leveduras, cogumelos, políporos, ferrugem e ferrugem parasita de plantas.

Morfologicamente os fungos podem ser divididos em dois grandes grupos: leveduras e fungos filamentosos (BORZANI *et al.*, 2001; MADIGAN, *et al.*, 2000). Deacon (2006) acrescentou um terceiro grupo, os fungos dimórficos, que podem apresentar-se na forma filamentosa ou leveduriforme dependendo da temperatura a qual sejam expostos. Em temperatura ambiente entre 25 °C e 28 °C apresenta-se como filamentosos e em temperaturas entre 37 °C e 39 °C, como levedura (WAKAI, *et al.* 2017).

As leveduras são unicelulares com células esféricas ou ovais, sua reprodução assexuada ocorre por brotamento ou fissão (MADIGAN; *et al.*, 2000). Enquanto, os fungos filamentosos são multicelulares. Nestes, suas células são conectadas na forma de filamentos microscópicos, denominados de hifas. Quando uma grande quantidade de hifas acumula-se em um substrato elas tornam-se visíveis a olho nu; esta massa de hifas recebe o nome de micélio (PELCZAR *et al.*, 1997; MADIGAN *et al.*, 2016;).

Classicamente, estudos sobre a evolução fúngica têm sido baseados em comparações morfológicas, composição da parede celular (GARCIA, 1970 e 1987), ensaios citológicos (TAYLOR, 1978), ultraestrutura (FULLER, 1976 e HEATH, 1980 e 1986), metabolismo celular (LÉJOHN, 1974 e VOGEL, 1964) e em registros fósseis (HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

Segundo Whittaker (1969), os fungos eram divididos em dois grandes grupos: o grupo *Myxomycota*, constituído por fungos inferiores, sem parede celular e que se caracterizam por não serem patogênicos ao homem e a outros animais, e o grupo *Eumycota*,

constituído por fungos verdadeiros, os quais apresentam parede celular e podem ser agentes patogênicos (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Por sua vez, os *Eumycota* eram subdivididos em cinco grandes Filos, baseados primariamente nas características da reprodução assexuada e sexuada. Os filios eram: Zigomicota (incluíam os Zigomicetos), Ascomicota (incluíam os Ascomicetos), Basidiomicotina (incluíam os Basidiomicetos), Deuteromicota (incluíam os Deuteromicetos) e Mastigomicota (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Com os avanços da biologia molecular, observou-se uma nova visão quanto à evolução do reino Fungi. O sequenciamento de DNA e os "primers universais", tão populares no início da década de 1990 para a reação em cadeia da polimerase (PCR), ferramentas projetadas para o estudo dos fungos (Taylor, 2011), permitiu o estudo minucioso dos organismos, fornecendo uma infinidade de novos caracteres para análise e identificando com eficiência os membros do reino monofilético Fungi.

Assim, problemas de poucos caracteres morfológicos (por exemplo, leveduras), caracteres não correspondentes entre os taxos (por exemplo, estados assexuados e sexuais) e morfologias convergentes foram subitamente superados. Foi, então, proposto por Tedersoon *et al.*, (2018) diversas mudanças no nível de filo, com base em exames de filogenias.

Muitos filios, anteriormente descritos, foram adequadamente classificados em nove sub-reinos e 18 Filios, são eles: sub-reino Dikarya (Basidiomycota, Ascomycota e Entorrhizomycota), Mucoromyceta (Calcarisporiellomycota, Glomeromycota, Mortierellomycota e Mucoromycota), Zoopagomyceta (Entomophthoromycota, Kickxellomycota, Zoopagomycota) e Chytridiomyceta (Chytridiomycota, Monoblepharomycota, Neocallimastigomycota) compreendem múltiplos Filios, enquanto Aphelidiomyceta, Basidiobolomyceta, Blastocladiomyceta, Olpidiomyceta, Rozellomyceta cobrem um único filo.

A importância econômica e científica relacionada com os fungos é decorrente da sua capacidade de produzir enzimas e metabólitos secundários, incluindo antibióticos, ácidos orgânicos, pigmentos e outros aditivos alimentícios (PUNT *et al.*, 2002). Destacando-se como organismos importantes na indústria alimentícia, na agricultura, como agente de controle biológico; em processos biotecnológicos, como produtor de catalisadores biológicos; entre muitos outros produtos úteis e ainda inexplorados pelo homem (MELO & AZEVEDO, 1998).

### 3.2 Biocombustíveis

Quando se analisa as fontes de energia mundial, observa-se que os combustíveis fósseis representam a fonte mais importante de energia (FAO, 2005). O petróleo corresponde por mais de 35 % da energia primária mundial, seguido por carvão mineral ( $\approx 23$  %); gás natural ( $\approx 21$  %); lenha, carvão vegetal e outros biocombustíveis ( $\approx 10$  %), energia nuclear ( $\approx 7,6$  %), hidrelétrica ( $\approx 2,7$  %) e outras fontes de energia renováveis como a geotérmica, solar e eólica ( $\approx 0,7$  %).

A possível escassez e aumento de preço dos combustíveis fósseis e a sua direta influencia na emissão de gases poluente, juntamente com questões econômicas e políticas sobre o uso de fontes não renováveis, contribuem na busca por fontes renováveis de energia e sua viabilização econômica (BON *et al.*, 2008), ou seja, impulsiona o interesse pela bioenergia, termo que se refere as energias provenientes, direta ou indiretamente, de fontes renováveis derivadas de um processo fotossintético que podem ser usadas para a produção de combustíveis (CHEN *et al.*, 2016).

Esse cenário impulsiona e fortalece as bioenergias, proporcionando que os biocombustíveis surjam na forma de um bem, complementar e/ou substituto, permitindo a discussão e inserção de programas como o etanol e o biodiesel na matriz energética mundial e brasileira (KOHLHEPP, 2010; ROCHA *et al.*, 2014).

O etanol é o biocombustível mais consumido mundialmente. O Brasil juntamente com os Estados Unidos destaca-se na sua produção. De acordo com a *Renewable Fuels Association*, em 2012 a produção mundial de etanol foi de 82,5 bilhões de litros. Desse total, Estados Unidos e Brasil responderam, respectivamente, por 61 % e 26 %. Outros grandes produtores são a Índia, a China e a União Europeia, mas em menor escala (FAO, 2005; NOGUEIRA, 2008; EIA, 2015).

A produção comercial de etanol é obtida a partir de duas rotas tecnológicas: uma utiliza biomassas doces, diretamente fermentescíveis, como a cana-de-açúcar e a beterraba açucareira; e a outra, biomassas amiláceas, como o milho e a mandioca, cujo amido deve ser sacarificado antes da fermentação.

A produção de etanol aumenta a expectativa de redução das emissões de gases do efeito estufa, que são menores quando derivadas de combustíveis de origem agrícola (MACEDO, 2005). Por exemplo, o etanol produzido a partir de cana-de-açúcar apresenta uma redução de 80 % de gases poluentes, quando comparado com a gasolina (BRANDT *et*

*al.*, 2013), apresentar maior inflamabilidade, alta velocidade de chama e alto calor de vaporização (SANCHEZ, 2009; REZENDE *et al.*, 2011).

Contudo, a produção dos biocombustíveis enfrenta uma limitação fundamental. As biomassas utilizadas para sua produção originam-se, em geral, de vegetais que exigem extensas áreas de cultivo. Isso pode provocar conflito quanto ao uso da terra, principalmente se o volume de petróleo a substituir for significativo. Esse problema é particularmente verdadeiro para os biocombustíveis provenientes de vegetais utilizados na alimentação, como o etanol de milho.

O cenário energético e o conflito entre o uso da terra e da biomassa propõem um desafio para o mundo. Visando suprir o aumento da demanda e a exportação desse combustível renovável, para assegurar a preservação ambiental e biodiversidade, bem como o uso ordenado de terras para produção de alimentos, é fundamental o investimento no aproveitamento completo da biomassa, evitando a ocupação de mais terras agricultáveis.

Uma possibilidade para resolução desse conflito seria a utilização de outras biomassas que apresentam menor custo, tais como: resíduos agrícolas, industriais e florestais. O uso desses materiais caracteriza uma terceira rota que é voltada à produção de etanol de segunda geração, biocombustível produzido a partir de matéria de origem lignocelulósica (OGEDA e PETRI, 2010). Materiais quimicamente ricos em polímeros passíveis de fermentação e, conseqüentemente, produtor de bioetanol (BON *et al.*, 2008).

Esta nova tecnologia ganhou forças nos últimos 20 anos, pois permitiu atender as exigências do mercado de combustíveis, despertando grande interesse devido ao baixo custo da matéria-prima (NOGUEIRA, 2008). Embora existam expectativas para a viabilidade econômica deste novo mercado, essa rota de valorização energética da biomassa está disponível comercialmente em poucas unidades no mundo, a maior parte nos Estados Unidos, que vêm concedendo incentivos ao desenvolvimento de novas tecnologias para essa produção.

### **3.3 Etanol de segunda geração**

O etanol de segunda geração é o resultado de processos tecnológicos e biotecnológicos e seu desenvolvimento apresenta resultados promissores. Consistem na produção de bioetanol a partir de açúcares presentes nos resíduos lignocelulósicos, provenientes de polímeros como a celulose e a hemicelulose cuja associação forma a parede

celular vegetal (OTERO; NIELSEN, 2010).

A biomassa necessária para a produção do bioetanol de segunda geração possui baixo custo, o que o torna preferencial. Contudo, a obtenção dos açúcares fermentescíveis desses materiais apresenta-se como um fator limitante, pois a parede celular vegetal possui complexas e rígidas estruturas que atrapalham a sua hidrólise. Assim, uma etapa que prepara a matéria prima é adicionada no processo produtivo.

Um dos desafios da tecnologia de segunda geração reside na dificuldade em se obter os açúcares para fermentação devido às complexas e rígidas estruturas da parede celular, que atrapalham a hidrólise do material lignocelulósico (YANG e WYMAN, 2008). Essa etapa é denominada de pré-tratamento, uma etapa que altera sua estrutura nativa e permite a separação das cadeias da parede e aumentando da porosidade do bagaço, facilitando, assim, o acesso à celulose e as hemiceluloses para sua hidrólise em monossacarídeos, e a posterior fermentação alcoólica (BON *et al.*, 2008; MOSIER *et al.*, 2005). Dessa forma, a produção do bioetanol exige quatro etapas, sendo elas pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação (LYND *et al.*, 2005).

Com o avanço dos estudos, algumas etapas obtiveram grandes melhoramentos. Contudo, alguns aspectos ainda precisam ser otimizados para tornar a produção comercialmente competitiva. Por exemplo, necessita-se de um pré-tratamento mais eficiente que permita melhorar o rendimento das etapas subsequentes, reduzindo o teor de inibidores ao microrganismo fermentador; redução do custo das enzimas hidrolíticas, elas representam 20- 30 % do custo final; melhoramento das linhagens de leveduras, tornando-as mais resistentes aos inibidores formados durante o processo, suportarem temperaturas mais elevadas viabilizando o processo de sacarificação e fermentação, a temperatura ótima para a sacarificação é cerca de 55 °C e para a fermentação é 30 °C e, capazes de fermentar simultaneamente pentoses e hexoses (PALMQVIST *et al.*, 2000; MARTÍN *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010; TALEBNIA *et al.*, 2010; MU *et al.*, 2013).

### **3.4 Biomassa lignocelulósica e a parede celular vegetal**

A fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas métricas de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em produtos vegetais por ano, como a celulose e a hemicelulose. Esses dois grupos de polissacarídeos, conjuntamente, tornam os carboidratos as biomoléculas mais abundantes do planeta, devido principalmente à atividade anabólica que ocorre nas reações de fixação do

carbono da fotossíntese em plantas (NELSON; COX, 2011).

Tais carboidratos são encontrados na parede celular das plantas, constituindo a maior fonte de biomassa lignocelulósica, (MATANO *et al.*, 2012; STICKLEN, 2008). As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais encontradas na natureza (MOOD *et al.*, 2013), representando 50 % da biomassa terrestre, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras.

A parede celular das plantas é constituída por uma matriz dura e fibrosa, nas quais fibras flexíveis de celulose, hemiceluloses e pectina, são envoltas por uma matriz de lignina. Além desses componentes, os materiais lignocelulósicos apresentam, em menor proporção, resinas, taninos, ácidos graxos e fenóis, bem como compostos nitrogenados, e alguns sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (MOREIRA *et al.*, 2012; BON *et al.*, 2008).

A forma e o tamanho da parede celular dos materiais lignocelulósicos variam entre as espécies, e sua composição química também é distinta entre representantes lignocelulósicos. De maneira geral, a celulose encontra-se em maiores proporções, seguida das hemiceluloses e da lignina, que são unidas entre si por ligações covalentes e não covalentes.

Os resíduos agroindustriais de composição lignocelulósica mais importantes são, segundo Bon *et al.*(2008), o bagaço e palha de cana-de-açúcar, sabugo e palha de milho, palhas de trigo e arroz, restos de madeira processada e lixos baseados em papel. No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é o principal subproduto da indústria sucroalcooleira (ALCARDE, 2011), e uma das biomassas residuais predominantes no país (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Na Tabela 1 observa-se a composição química de algumas fontes de biomassa lignocelulósica.



**Tabela 1 - Composição química de fontes de biomassa lignocelulósica**

| <b>MATERIAL</b>        | <b>CELULOSE</b> | <b>HEMICELULOSE</b> | <b>LIGNINA</b> |
|------------------------|-----------------|---------------------|----------------|
| <b>LIGNOCELULÓSICO</b> | <b>(%)</b>      | <b>(%)</b>          | <b>(%)</b>     |
| Bagaço de cana         | 40,2            | 26,4                | 25,2           |
| Palha de arroz         | 43,5            | 22,0                | 17,2           |
| Palha de trigo         | 33,8            | 31,8                | 20,1           |
| Sabugo de milho        | 31,7            | 34,7                | 20,3           |
| Folhas de milho        | 37,6            | 34,5                | 12,6           |
| Palha de sorgo         | 34,0            | 44,0                | 20,0           |
| Casca de aveia         | 30,5            | 28,6                | 23,1           |
| Farelo de cevada       | 23,0            | 32,7                | 24,4           |

Fonte: HAULI *et al.*, (2013)

### 3.4.1 Celulose:

A celulose, componente de 23 % - 50 % da matéria seca da biomassa lignocelulósica, é um homopolissacarídeo linear, formado por até 15.000 unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1,4). As longas cadeias celulósicas sem ramificações são unidas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e por forças de van der Waals (MOTTA *et al.*, 2013, SÁNCHEZ, 2009). Essa associação forma as fibrilas, altamente ordenadas, que por sua vez, formam as fibras de celulose.

As fibrilas apresentam regiões de alto grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicose encontram-se firmemente ligadas em paralelo, e de menor grau de ordenação, ou seja, amorfas (BON *et al.*, 2008; BROWN JR.; 2004). Essas são regiões onde a fibra de celulose possui sua maior flexibilidade e é mais suscetível a degradação enzimática (SÁNCHEZ, 2009; MOSIER *et al.*, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Na celulose nativa, o grau de polimerização varia conforme a origem, e fibras de diferentes plantas terão diferentes tamanhos e dimensões. A celulose apresenta regiões com falhas, poros, rachaduras e nós, que são mais suscetíveis ao ataque químico ou mecânico (IOELOVICH, 2008).

### 3.4.2 Hemiceluloses

Cerca de 40 % dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais refere-se à hemicelulose sendo, portanto, depois da celulose, o carboidrato mais abundante na natureza (WOODWARD, 1984; DA SILVA *et al.*, 1997). Constituindo de 20 a 50 % da biomassa lignocelulósica (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005)

As hemiceluloses não são quimicamente homogêneas, consistindo em cadeias heteropoliméricas ramificadas (FENGEL e WEGENER, 1984; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Essas cadeias se ligam, firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa (Figura 1).

As hemiceluloses são polissacarídeos de baixa massa molecular, apresentando entre 100 e 200 unidades de resíduos de açúcares monoméricos, como D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido D-galacturônico, ácido glucurônico e seus derivados (JANES, 1969).

A grande maioria das hemiceluloses apresentam ligações  $\beta$  (1,4) entre os seus componentes, exceto as que possuem galactose, cuja ligação é do tipo  $\beta$  (1,3) (PANDEY *et al.*, 2011). A variação de ligações e ramificações é responsável pelas conformações diferenciadas das moléculas das hemiceluloses, as quais fazem a ligação entre celulose e lignina.

O teor e a proporção dos diferentes componentes que formam a hemicelulose variam bastante de acordo com a fonte vegetal (JARDINE *et al.*, 2009). O material hemicelulósico constitui cerca de 30-35% das madeiras duras (angiospermas), 15-30% das gramíneas e 7-12% das madeiras macias (gimnospermas).

Em gimnospermas predominam as cadeias principais de  $\beta$ -manana, enquanto em dicotiledôneas predominam xiloglucanos. Já em monocotiledôneas, os  $\beta$ -xilanos são os principais constituintes da hemicelulose (KING *et al.*, 2011; DHIMAN *et al.*, 2008; JEFFRIES, 1994).

Diferente da celulose, as hemiceluloses não contêm em sua estrutura regiões cristalinas (BON *et al.*, 2008). Essa estrutura amorfa a torna mais suscetível à hidrólise química e enzimática sob condições relativamente brandas (PERVEZ *et al.*, 2014; MOTTA *et al.*, 2013; SÁNCHEZ, 2009). A Tabela demonstra as diferenças encontradas entre a celulose e a hemicelulose.

Contudo, devido à variedade de açúcares na sua composição, a degradação

enzimática completa desses polímeros requer a atuação de um número maior de enzimas, característica que difere da degradação enzimática da celulose (MALHERBE e CLOETE, 2002).

Esse polímero funciona como uma ligação entre a lignina e as fibras de celulose e sua presença confere mais rigidez a toda rede de celulose-hemicelulose-lignina (LAUREANO- PEREZ *et al.*, 2005).

A hemicelulose é um grupo complexo de estruturas formadas de diferentes resíduos. As cadeias principais e as ramificações laterais apresentam predominância de um dos açúcares, e são nomeados de acordo com esse resíduo principal no esqueleto polimérico: xilana (D-xilose), xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), glucomanana (D-glicose e D-manose), galactoglucomanana (D-galactose, D-glicose e D-ramanose) e arabinogalactano (D-galactose e arabinose) (POLIZELI *et al.*, 2005; PERVEZ *et al.*, 2014).

#### 3.4.1.1 Xilana

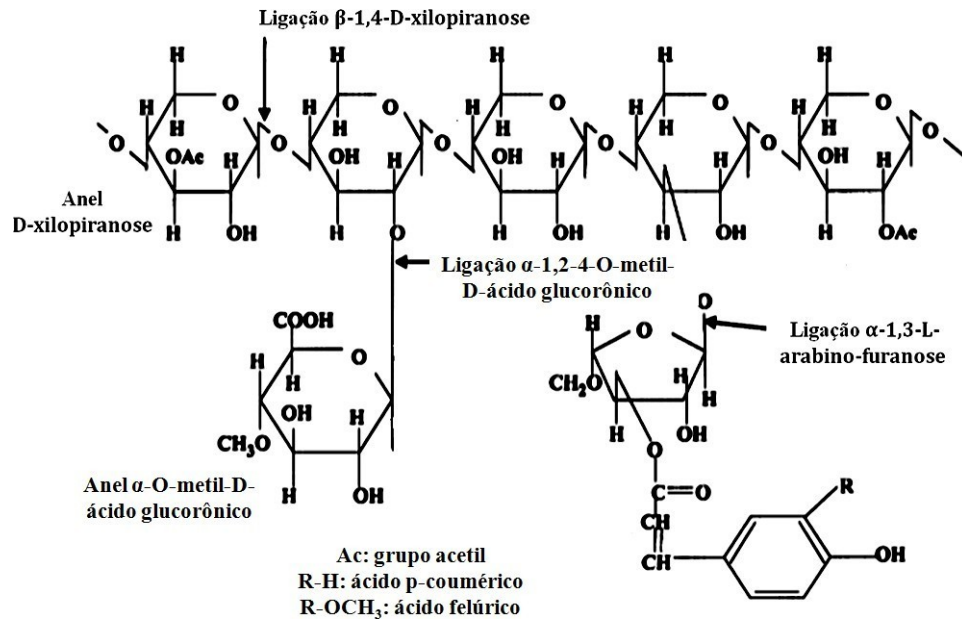
A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses, corresponde a um terço do carbono renovável disponível na terra (PURI *et al.*, 2013). É um heteropolíssacarídeo linear cuja cadeia principal é constituída por resíduos do monossacarídeo xilose. A xilose é um poli-hidroxialdeído de cinco carbonos (aldopentose) encontrada mais comumente na natureza em sua configuração piranosídica (QI *et al.*, 2011).

Os monossacarídeos constituintes da xilana são unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1,4). A cadeia  $\beta$ -(1-4)-xilano quando comparada com  $\beta$ -(1-4)-celulose, apresenta-se mais flexível. Isso ocorre porque apenas uma ligação de hidrogênio é formada entre os resíduos xilosil adjacentes, enquanto na celulose duas ligações de hidrogênio são formadas (ROJAS-REJÓN *et al.*, 2011).

Na natureza a cadeia principal pode ter acréscimo de unidades de ramificações como 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucuronopiranosil, acetil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil, as ramificações e suas proporções variam de acordo com vegetal em que se encontra (POLIZELI *et al.*, 2005; DHIMAN *et al.*, 2008; MOTTA *et al.*, 2013).

Esse polímero apresenta grande diversidade em termos de molecularidade e grau de polimerização (MELO, 2010). Isso permite a sua classificação com base nos substituintes ligantes da cadeia principal, de acordo com a Tabela 3.

**Figura 1 - Esquemática de uma molécula de xilana**



Fonte: BEG *et al.*, (2001)

No caso de madeiras duras nas quais a xilana corresponde de 20 a 35 % do peso seco da biomassa, o grupo substituinte predominante é O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana com substituições principalmente no C2 através de ligações  $\alpha$ -1,2 do ácido 4-O-metil glucurônico (10 a 35 %) e 70 % dos C2 e C3 acetilados (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

Em madeiras moles o principal componente é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana, sendo que essa hemicelulose contém maiores proporções de manose e galactose. Neste caso, a fração de xilana corresponde, em média, à 8 % do peso seco da biomassa. Resíduos de ácido ferúlico e cumárico podem ainda apresentar-se esterificados aos substituintes do tipo L- arabinose (WONG *et al.*, 1988; HALTRICH *et al.*, 1996).

Este heteropolímero forma uma interface entre a lignina e outros polissacarídeos, estando presente principalmente na parede celular secundária e ligada covalentemente com resíduos fenólicos da lignina e outros polissacarídeos como pectinas e glicanos (DHIMAN *et al.*, 2008).

A utilização de xilana pura, ou de seus derivados de baixa massa molecular, é uma excelente opção para a produção de xilanasas, o que vem sendo feito, frequentemente, em pequena escala (HALTRICH *et al.*, 1996). Entretanto, para a produção em escalas maiores, a utilização destes materiais, de elevado custo, torna o processo inviável economicamente.

Para solucionar esta questão, a utilização de resíduos agroindustriais e de exploração

florestal como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar (PALMA *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1999), sabugo de milho (DAMASO *et al.*, 2000; BAKIR *et al.*, 2001) e farelo de trigo (GOMES *et al.*, 1994; RIDDER *et al.*, 1999; BAKIR *et al.*, 2001), dentre outros, tem sido a solução mais empregada.

Estes resíduos são fontes de xilana e xilo-oligômeros, podendo ser utilizados, na forma natural, como é o caso dos processos em estado sólido, ou após pré-tratamentos (químicos, físicos ou enzimáticos), que se fazem necessários para a sua utilização nos cultivos submersos e, em alguns casos (KULKARNI *et al.*, 1999).

### 3.4.3 Pectina

A pectina é o polissacarídeo mais complexo na parede celular vegetal, constituindo 15% da matéria seca de biomassa. Biologicamente, apresenta função na defesa da planta, crescimento, morfologia e desenvolvimento. Podendo ser utilizado na indústria como polímero de gelificação e estabilização em diversos alimentos (ROBL *et al.*, 2015).

A pectina é uma família complexa de polissacarídeos que contém resíduos de  $\alpha$ -1,4-D-galacturônico, sendo as principais cadeias a homogalacturonana (homopolímero linear de  $\alpha$ -1,4-D-galacturônico, onde os grupos carboxilas estão parcialmente metil-esterificados ou O acetilados) e a ramnogalacturonana I (cadeia principal constituída de um dissacarídeo ligados  $\alpha$ -1,4-D-galacturônico- $\alpha$ -1,2-L-ramanose) e as galacturonanas substituídas, como ramnogalacturonana II (consiste de um esqueleto de homogalacturonana de no mínimo oito unidades monoméricas, contendo cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de açúcares) e xilogalacturonana (homogalacturonana substituída com xilose) (CANTERI *et al.*, 2012; ROMANI, *et al.*, 2010; IRFAN *et al.*, 2012).

### 3.4.4 Lignina

A lignina constitui 10-25 % do material lignocelulósico seco (STICKLEN *et al.*, 2008). Combinado a hemiceluloses e pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, atuando como ligante entre componentes da parede celular. Agindo como um suporte estrutural, impermeável e resistente contra-ataque microbiano e *stress* oxidativo (SÁNCHEZ, 2009), apresentando grande resistência microbiana (BON *et al.*, 2008).

É um heteropolímero amorfo, insolúvel em água, formado por componentes aromáticos, com valioso potencial de aplicação na indústria química, as unidades de *p*-

propilfenol. Que se apresentam unidas por ligação não hidrolisáveis do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si (SÁNCHEZ, 2009).

Presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, e confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material (MANSFIELD *et al.*, 1999; CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

### 3.5 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

A hidrólise da biomassa lignocelulósica pode ser realizada com processos distintos, ácido ou enzimático. A hidrólise ácida gera produtos de degradação e aldeídos devido a significativa desidratação química dos monossacarídeos formados (SUN; CHENG, 2002).

Por outro lado, a utilização de enzima na hidrólise dos polissacarídeos apresenta vantagens, utilizam condições mais brandas de pressão, temperatura e pH quando comparados com os processos químicos. São moléculas que apresentam elevada especificidade com o seu substrato, eliminando a formação de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) às células microbianas que serão utilizadas nos processos seguintes (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Na hidrólise enzimática as moléculas de celulose e hemicelulose são digeridas a monômeros de glicose e xilose, respectivamente. Tal processo é conhecido como sacarificação e é importante para que os microrganismos consigam realizar a fermentação. Para que isso ocorra, é necessário ações de diversas classes enzimáticas, pois elas atuam de forma sinérgica e diferem entre si pela região em que hidrolisam as moléculas dos seus substratos (ZHANG *et al.*, 2006).

A ação sinérgica das enzimas é necessária como consequência da diversidade de monossacarídeos e das diversas ligações glicosídicas entre eles. Portanto, uma diversidade de glicosídeo hidrolases, enzimas que catalisam a clivagem entre dois açúcares, ou entre um açúcar e outro grupo, com diferentes especificidade e modos de ação faz-se necessário para uma eficiente hidrólise. Foi demonstrado que o uso de coquetéis enzimáticos em determinadas proporções pode duplicar a atividade enzimática medida (GOTTSCHALK, *et al.*, 2010).

Para a desconstrução enzimática da cadeia dos polímeros da parede celular vegetal é necessário a atuação de diversas enzimas. Os complexos enzimáticos de celulasas e xilanases são os principais, sendo responsáveis pela hidrólise da celulose e xilana,

respectivamente. Contudo, para total hidrólise dessa biomassa outras hemicelulases podem ser exigidas, tais como: mananases (EC 3.2.1.78), beta-xilosidases (EC 3.2.1.37), beta manosidases (EC 3.2.1.25), alfa-arabinosidases (EC 3.2.1.55), alfa-glucuronidases (EC 3.2.1.139), feruloil esterases (EC 3.1.1.73) e acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72). (SIPOS *et al.* 2010).

Dependendo da caracterização química do resíduo a ser hidrolisado, enzimas acessórias e proteínas acessórias também serão necessárias para uma hidrólise total. São elas as lacases, peroxidases, galactanase, mananases, liase e pectinase (BANERJEE *et al.*, 2010). Como exemplo de proteínas acessórias temos as expansinas (EXP). São moléculas que promovem o afrouxamento da parede celular vegetal rompendo as pontes de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e açúcares adjacente. Apesar da expansina não apresentar atividade hidrolítica, a presença dessa enzima acessória melhora a hidrólise da celulose, uma vez que torna a fibra mais acessível ao ataque enzimático (COSGROVE, 2000).

### **3.5.1 Complexo de enzimas celulolíticas:**

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas. As celulasas são biocatalisadores específicos que agem sobre a molécula de celulose para a liberação de açúcares (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Podendo ser divididas em dois grupos de acordo com seu sítio de ação: endoglucanases e exoglucanases (ou celobiohidrolases) (Bon *et al.*, 2008).

As endoglucanases (EC 3.3.1.4) são enzimas responsáveis pelo início da hidrólise dessa molécula, reduzindo o grau de polimerização da molécula de celulose (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Elas hidrolisam de maneira randômica as regiões internas na molécula de celulose, com mais afinidade por regiões amorfas. Atuam na formação de celooligosacarídeos com graus variados de polimerização e formação de um novo terminal redutor e outro não redutor (BON *et al.*, 2008).

O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase e glucanohidrolase. A glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, devido a sua capacidade de liberar glicose diretamente do polímero. A celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) participa da hidrólise primária da fibra de celulose e é responsável pela amorfogênese, um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando a desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais.

As celobiohidrolases podem ser divididas em dois tipos: I e II, as tipo I hidrolisam terminais redutores, e do tipo II, terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição pelo produto da sua hidrólise, no caso, a celobiose (BON *et al.*, 2008).

A degradação da celulose é completada com a degradação da celobiose, um dímero de glicose. Essa degradação ocorre com a ação da celobiase ( $\beta$ - glucosidase (EC 3.2.1.21) A celobiase pode ter sua atividade inibida com o acúmulo do seu produto de hidrólise, a glicose. O nível correto dessa enzima em uma preparação enzimática evita a inibição das celobiohidrolases, bem como a liberação do produto de interesse, a glicose, na maior quantidade possível (BON *et al.*, 2008; ZHANG, *et al.*, 2010).

A hidrólise da celulose pelas celulasas envolve a adsorção das enzimas à superfície do substrato e a hidrólise do substrato propriamente dita em açúcares fermentescíveis. Uma enzima do complexo celulolítico sozinha é incapaz de realizar tal hidrólise, sendo necessária a ação sinérgica das demais enzimas celulolíticas, bem como a  $\beta$ -glucosidase (BON *et al.*, 2008).

### 3.5.2 Complexo de enzimas xilanolíticas:

As xilanases são hemiceluloses extracelulares produzidas, principalmente por fungos, leveduras e bactérias. São enzimas que formam o complexo xilanolítico responsável pela hidrólise da xilana. Um material composto por unidades de D-xilopirranose com graus variáveis de substituições em suas ramificações. Localiza-se principalmente na parede celular secundária, formando uma interfase entre a lignina e a celulose (BIELY, 1997; GOMES *et al.*, 2007).

Por se tratar de um polissacarídeo heterogêneo e complexo exige a atividade de várias enzimas com diversas especificidades, sequências primárias e conformações tridimensionais para hidrolisar completamente as xilanas (SCHELLER e ULVSKOV, 2010). Tais enzimas são responsáveis pela hidrólise das ligações  $\beta$ -(1→4) da xilana, produzindo xilooligossacarídeos de variados tamanhos e xilose (POLIZELI *et al.*, 2005).

Então, xilanases são as glicosidases (O-glicosídeo hidrolases, EC 3.2.1.8) responsáveis pela catálise da endo-hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-D-xilosídica da xilana e são oficialmente denominadas endo- $\beta$ -1,4-xilanases (COLLINS *et al.*, 2005). Apesar das enzimas terem como importante característica a especificidade pelo substrato, diversos autores apontam para a ação promíscua de algumas xilanases, capazes de atuar não



somente sob hemiceluloses, mas também sobre celulosas (KELLETT *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 2011).

Inicialmente as enzimas foram classificadas pela União Internacional de Bioquímica (1961). Agruparam as enzimas em seis classes, baseando-se na reação que catalisam. Para as xilanases foi designado o código EC 3.2.1.8, onde 3 corresponde à classe das hidrolases; 2 à sua subclasse, caracterizada por hidrolisar ligações glicosídicas; 1 à sua sub-subclasse, que corresponde à natureza do substrato – O-glicosidase e 8 ao número da enzima na subclasse (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010). Essa classificação tornou-se ineficiente para as glicosil- hidrolase, devido à identificação de diversas xilanases com especificidade, sequência primária e enovelamento variado (COLLINS *et al.*, 2005).

Então, Wong *et al.*, (1988) classificou as xilanases em dois grupos com base em suas propriedades físico-químicas: (i) que possuem massa molecular baixa (< 30 kDa) e pI básico, e (ii) com massa molecular elevada (> 30 kDa) e pI ácido. Segundo Biely e colaboradores (1997), a maioria das xilanases já estudadas apresentam massa molecular variando de 6 a 80 kDa, são ativas na faixa de pH 4,5 a 6,5 e estáveis entre 40 e 60 °C. Com estudos de novas xilanases não foi possível adequá-las a esta classificação.

Um novo sistema de classificação foi montado, permitindo a classificação das glicosil- hidrolases, baseando-se na estrutura primária dos domínios catalíticos (HENRISSAT, 1991). A similaridade da sequência dos domínios catalíticos indica uma similaridade no padrão de enovelamento, permitindo que membros de uma família dividam as mesmas características de enovelamento, permitindo assim estudos de modelagem por homologia (HENRISSAT, 1991).

Atualmente, o banco de dados CAZY (Carbohydrate-Active enZYmes), possui o depósito da classificação de consenso para as glicosil-hidrolases (CANTAREL *et al.*, 2009) ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Usou-se a classificação baseada na similaridade das sequências do domínio catalítico, sendo atualmente descritas 132 famílias de glicosil hidrolases (GHs). Assim, as xilanases são principalmente agrupadas em duas famílias, a GH10 (família F) e a GH11 (família G) (JEFFRIES, 1996; ZHOU *et al.*, 2008; PAES, BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Essas famílias apresentam enzimas com diferenças na estrutura tridimensional, o que proporciona enzimas com catálises diferentes. Elas podem se diferenciar: (i) estruturalmente, quanto à presença de domínio catalítico; (ii) características bioquímicas,

pH e temperatura ótima de atividade, e sua sensibilidade a essa variação; e (iii) quanto a catálise, seleção de substrato, eficiência catalítica, sensibilidade a inibidores.

A família 10 é formada por moléculas maiores, com maior complexidade, apresentam uma topologia em barril tipo  $\alpha/\beta 8$  (TIM), e podem se apresentar altamente glicosiladas. A família 11 apresenta xilanases menores ( $< 30$  kDa), com estruturas mais consistente, apresentam topologia de *jelly-roll*, não são glicosiladas, possuem dois glutamatos agindo como resíduos catalíticos e são mais específicas para as xilanas, despertando maior interesse biotecnológico (KULKARNI *et al.*, 1999).

Xilanases da GH11 são capazes de acomodar de cinco a sete resíduos xilopiranosídicos no seu sítio catalítico, enquanto nas xilanases da família GH10, o substrato é ligado superficialmente à base do barril (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002; DODD *et al.*, 2009). Xilanases da família 11 possuem pontos de clivagem mais específicos, de acordo com o tamanho da cadeia xilopiranosídica e as ramificações existentes. As xilanases da família 10 apresentam maior flexibilidade, pois podem hidrolisar desde pontos próximos às ramificações, quanto xilooligossacarídeos ligados a outras cadeias polissacarídicas (BIELY *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2011).

Uma atuação sinérgica das xilanases é necessária para a hidrólise completa da xilana (DHIMAN *et al.*, 2008). Elas podem ser divididas em duas categorias: as que degradam a cadeia polissacarídica principal, endo- $\beta$ -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37); e enzimas que liberam grupos laterais, as enzimas acessórias, que incluem  $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.139), L-arabinases, acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6), feruloil esterase (EC 3.1.1.73) e ácido *p*-cumárico esterase (EC 3.1.1.-) (BEG *et al.*, 2001; GRAY *et al.*, 2006; POLIZELI *et al.*, 2005; RYABOVA *et al.*, 2009).

A molécula de xilana tornar-se menos solúvel após a remoção das ramificações, podendo formar agregados que estereoquimicamente retardam ou reduzem sua degradação (PURCHART *et al.*, 2007). Portanto, a hidrólise simultânea da cadeia lateral e da cadeia principal pelas endoenzimas melhoram sinergisticamente a taxa de degradação da hemicelulose (TENKANEN e POUTANEN, 1992; DE VRIES *et al.*, 2000).



**Tabela 4 - As Endo- $\beta$ -1,4 xilanase, principais famílias glicosil hidrolase (GH) e microrganismos produtores**

| Enzima hidrolítica   | GH                                  | Microrganismo produtor                             | Referência                        |
|--|-------------------------------------|--|-----------------------------------|
| <b>Endo-<math>\beta</math>-1,4 xylanase<br/>(EC 3.2.1.8)</b> | GH8                                 | <i>Glaciecola mesófila</i>                         | Guo e Zhang, 2013                 |
|  |                                     | <i>Bacillus halodurans</i>                         | Takami, 1999                      |
|  |                                     | <i>Pseudoalteromonas arctica</i>                   | Elleuche <i>et al.</i> 2011       |
|  |                                     | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>              | Collins <i>et al.</i> 2002        |
|  |                                     | <i>Lechevalieria sp.</i>                           | Zhou <i>et al.</i> 2012           |
|  |                                     | <i>Streptomyces avermitilis</i>                    | Hahn-Hagerdal, <i>et al.</i> 2007 |
|  |                                     | <i>Hordeum vulgare</i>                             | Van <i>et al.</i> 2007            |
|  |                                     | <i>Hypothenemus hampei</i>                         | Pereira <i>et al.</i> 2003        |
|  |                                     | <i>Aureobasidium pullulans</i>                     | Tanaka <i>et al.</i> 2006         |
|  | GH11                                | <i>Alicyclobacillus sp.</i>                        | Wakiyama, <i>et al.</i> 2010      |
|  |                                     | <i>Bacillus halodurans</i>                         | Martinez <i>et al.</i> 2002       |
|  |                                     | <i>Bacillus subtilis</i>                           | Lu <i>et al.</i> 2006             |
|  |                                     | <i>Aspergillus fumigatus</i>                       | Jeya <i>et al.</i> 2009           |
|  |                                     | <i>Aspergillus japonicus</i>                       | Wakiyama <i>et al.</i> 2010       |
|  |                                     | <i>Aspergillus niger</i>                           | Fang <i>et al.</i> 2013           |
| GH43   | <i>Aureobasidium pullulans</i>      | Li <i>et al.</i> , 1993; Ohta <i>et al.</i> , 2001 |                                   |
|  | <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | Suzuki <i>et al.</i> 2006                          |                                   |

### 3.5.2.2 $\beta$ -1,4-D-xilosidases

As  $\beta$ -D-xilosidases (1,4- $\beta$ -D-xilana xiloidrolase; EC 3.2.1.37) são conhecidas como xilobiasas e exo- $\beta$ -1,4-xilanases devido a sua afinidade com a xilobiose e xilooligossacarídeos, respectivamente. As  $\beta$ -xilosidases são enzimas que proporcionam a liberação de xilose, pois catalisam a hidrólise da xilobiose e o ataque do terminal não redutor do xilo-oligossacarídeos (SORENSEN *et al.*, 2003; RASMUSSEN *et al.*, 2006).

Essas enzimas agem conjuntamente com as endoxilanases, assumindo o papel de degradar oligômeros de  $\beta$ -D-xilopiranosil, produtos resultantes da atividade das endoxilanases, que podem inibir a sua própria atividade limitando, conseqüentemente, a eficiência da hidrólise da xilana (ANDRADE *et al.*, 2004). Assim, a  $\beta$ -xilosidase proporciona total atividade das endoxilanases e permite a catálise completa da xilana.

A afinidade da  $\beta$ -xilosidase na degradação de xilo-oligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização. Estas enzimas têm a capacidade de clivar substratos artificiais como p-nitrofenil e o-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (KURAKABE *et al.*, 1997), substratos normalmente utilizados para determinação *in vitro* da atividade  $\beta$ -xilosidase.

A  $\beta$ -xilosidase podem ser intracelulares ou associadas à parede, dependendo do tipo de micro-organismo e das suas condições de cultura (LENARTOVICZ *et al.*, 2003). Em muitas bactérias e leveduras a  $\beta$ -xilosidase ocorrerem no citosol ou espaço periplasmático (BIELY *et al.*, 1980; BAJPAI, 1997). Quando intracelulares, os xilo-oligossacarídeos necessitam ser transportados para o citoplasma da célula onde são então convertidos em xilose intracelularmente (PARAJÓ *et al.*, 2004).

Em fungos filamentosos as enzimas  $\beta$ -xilosidase podem ser encontradas no meio intracelular (KUMAR e RAMÓN, 1996; LEMBO *et al.*, 2006), ou são extracelulares, sendo excretadas após o desenvolvimento fúngico por secreção ou como resultado de lise celular (WONG e SADDLER, 1992). Desta maneira, várias  $\beta$ -xilosidases têm sido recuperadas no meio extracelular (SAHA, 2003; YAN *et al.*, 2008).

Normalmente são proteínas com alta massa molecular, entre 60 e 360 kDa. A maioria das enzimas de fungos apresenta um pH ótimo de atividade entre 4,0 e 5,0 (SAHA, 2003) e uma temperatura ótima que pode variar de 40 a 80 °C.

De acordo com o CAZy, as  $\beta$ -xilosidases são encontradas nas famílias 3, 30, 39, 43, 52 e 54 glicosil hidrolases (GHs), como demonstrado na Tabela 5 (CANTAREL *et al.*, 2009).

**Tabela 5 - As  $\beta$ -1,4-xilosidase, principais famílias glicosil hidrolase (GH) e microrganismos produtores**

| Enzima hidrolítica | GH | Microrganismo produtor | Referência |
|--------------------|----|------------------------|------------|
|                    |    | <i>Caldanaerobius</i>  | <i>pol</i> |

|   |                                    |                                       |
|---|------------------------------------|---------------------------------------|
|   | <i>ysaccharolyticus</i>            | Han <i>et al.</i> 2012                |
|   | <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> | GenBank:ACM61424.1                    |
|   | <i>Acremonium cellulolyticus</i>   | GenBank:BAK96214.1                    |
|   | <i>Aspergillus</i>                 | <i>aculeatus</i>                      |
|   |                                    | GenBank:BAH30674.1 <i>Aspergillus</i> |
| <b><math>\beta</math>-1,4-<br/>Xilosidade</b> | <i>awamori</i>                     |                                       |

### 3.5.2.3 Enzimas acessórias da degradação da xilana

- **Acetil xilana esterase:** (EC 3.1.1.6) remove os substituintes O-acetil a partir da posição C2 e C3 dos resíduos de xilose na acetil xilana (CAUFRIER *et al.*, 2003). Tem função importante na sacarificação da xilana, uma vez que a retirada de grupos acetil presentes na cadeia principal da xilana facilita a ação de endoxilanases, a qual pode estar inibida parcialmente devido a impedimentos estéricos.

- **L-arabinases:** atuam retirando os resíduos de L-arabinose substituídos no C3 das unidades de xilose, podendo ser dividida em exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) que degrada p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeos e arabinanas ramificadas, e endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase (EC 3.2.1.99), que hidrolisa somente arabinanas lineares. A maioria das arabinases estudadas é do tipo exo (DE VRIES *et al.*, 2000).

-  **$\alpha$ -glucuronidasas:** (EC 3.2.1) hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,2 entre o resíduo ácido glucurônico e resíduos de  $\beta$ -D-xilopiranosil. Alguns microrganismos apresentam atividade máxima somente quando substratos glucuronoxilana curtos são utilizados. Entretanto, a especificidade da enzima junto ao substrato varia de acordo com a fonte microbiana (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

- **Ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.-) e ácido p-coumárico esterase (EC 3.1.1.):** clivam ligações éster da xilana, respectivamente, entre as cadeias laterais de arabinose e do ácido ferúlico, e entre arabinose e ácido p-coumárico (PEDROCHE *et al.*, 2007; CREPIN *et al.*, 2004).

## **4. Metodologia**

Os ensaios desse trabalho foram realizados com um fungo isolado de amostras vegetais coletadas em território da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, *campus* JK, Diamantina, MG. E conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Biocombustíveis do Instituto de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, Diamantina, Minas Gerais.

### **4.1 Manutenção do isolado**

A cepa foi mantida em meio sólido de aveia Quaker® 4 % (m/v) e Ágar 2 % (m/v) (EMERSON, 1941). Contidos em tubos de ensaios com meio inclinado, previamente autoclavados à 120 °C, 1,5 atm, durante 30 minutos. Os repiques foram realizados periodicamente, de 20 a 30 dias, crescendo à 30 °C em estufa bacteriológica, e, armazenados em geladeira à 4 °C.

Vale citar que também foram mantidas em sílica gel, onde uma suspensão de esporos foi preparada a partir de 2 mL de solução de leite em pó (200 gL<sup>-1</sup> de água destilada). Desta suspensão, aproximadamente, 1 mL foi adicionado em tubos de ensaio (10 x 150 mm) contendo 7 g de sílica gel de 4 – 8 mm e, posteriormente, agitados. Estes tubos foram lacrados e armazenados à 4 °C.

### **4.2 Inóculo e Contagem dos conídios em câmara de Neubauer**

Para a realização do inóculo, as culturas do fungo contido nos tubos em meio Emerson (1941) foram suspensas em 8 mL de água destilada esterilizada, e um volume de 1 mL da suspensão de esporos foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura submerso, previamente esterilizado.

Para garantir uma quantidade aproximada de esporos em todos os experimentos, fez-se a contagem dos conídios antes de inocular o meio líquido. Utilizou-se 10 µL da solução de esporos em Câmara de Neubauer, onde se obteve, em média, uma solução com  $2,5 \times 10^7$  conídios/mL, o que representa  $2,5 \times 10^7$  conídios/cultura.

### **4.3 Obtenção da massa micelial e do extrato bruto enzimático**

A massa micelial foi obtida após separação do meio de cultivo submerso através de filtração a vácuo, com o auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro. A massa micelial foi lavada, seca e pesada para analisar o crescimento fúngico nas diferentes

condições testadas. Os filtrados contendo as enzimas extracelulares foram armazenados em tubos falcons e, posteriormente, sua atividade enzimática foi analisada.

#### **4.4 Dosagem da atividade enzimática por determinação de açúcares redutores**

A atividade xilanásica foi determinada utilizando xilana birchwood como substratos na concentração de 1 % diluídas em tampão acetato de sódio  $100 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 5,5. A determinação ocorreu por meio da formação dos açúcares redutores durante a incubação da enzima com o seu substrato, utilizando-se o reagente ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

A reação enzimática constituiu-se da incubação de 500  $\mu\text{L}$  do substrato xilana e 500  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto solúvel a 55 °C durante 5 minutos. Decorrido o tempo reacional, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram retiradas e adicionadas em tubos contendo 200  $\mu\text{L}$  de DNS. Posteriormente, os tubos foram fervidos por 5 minutos e, após o resfriamento, adicionou-se 2 mL de água destilada. O branco consistiu-se em uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da mistura de reação, adicionada imediatamente a 200  $\mu\text{L}$  de DNS. As leituras foram realizadas a 540 nm.

O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de xilose (0 a 2,0 mg/mL), sendo a unidade de atividade (U) definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto, nas condições do ensaio. A atividade total (U total) = U.mL x volume do filtrado.

#### **4.5 Otimização da produção de xilanases pelo fungo EA 1.3.1**

##### **4.5.1 Análise do melhor meio de cultura e efeito do tempo de cultivo na produção enzimática**

Analisaram-se quatro distintos meios de cultura submersos, sendo eles: (1) SR (RIZZATTI *et al.*, 2001); (2) Khanna (KHANNA *et al.*, 1995); (3) CP (PEIXOTO *et al.*, 2003); (4) Adams (ADAMS, 1990). Os meios foram mantidos à 30 °C, em estufa bacteriológica durante sete dias, sendo os meios retirados a cada 24 horas, para dosagem enzimática. Os meios testados e suas composições estão descritos a seguir:

##### **Meio SR (RIZZATTI *et al.*, 2001)**

Solução de sais SR.....5,0 mL



|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Peptona.....              | 0,02 g |
| Extrato de levedura.....  | 0,45 g |
| Farelo de Trigo.....      | 1,0 g  |
| Água destilada q.s.p..... | 100 mL |

Solução de sais SR

|   |        |
|---|--------|
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,24 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....     | 0,3 g  |
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO.....    | 1,0 g  |
| Água destilada q.s.p.....                 | 100 mL |

**Meio Khanna (KHANNA *et al.*, 1995)**

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Solução de sais de Khanna..... | 5,0 mL |
| Extrato de levedura.....       | 0,1 g  |
| Farelo de Trigo.....           | 1,0 g  |
| Água destilada q.s.p.....      | 100 mL |

Solução de Sais Khanna

|   |          |
|---|----------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....                                   | 2,0 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                                   | 1,3 g    |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....                               | 0,362 g  |
| KCl.....  | 0,098 g  |
| ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....                                | 0,007 g  |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....                                | 0,0138 g |
| Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O..... | 0,0066 g |
| CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O.....                              | 0,0062 g |
| Água destilada q.s.p.....   | 100 mL   |

**Meio CP (PEIXOTO *et al.*, 2003)**

|   |        |
|---|--------|
| Extrato de levedura.....                  | 0,8 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....     | 0,3 g  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,05 g |
| Farelo de Trigo.....                      | 1,0 g  |

Água destilada q.s.p.....100 mL

**Meio Adams (ADAMS, 1990)**

Pepton.....0,2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,1 g

MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O.....0,05 g

Farelo de trigo.....1 g

Água destilada q.s.p.....100 mL

**4.5.2 Efeito da fonte de nitrogênio no cultivo do fungo para produção enzimática**

A influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento do fungo e a atividade da enzima foi avaliada. O experimento foi conduzido cultivando-se o microrganismo no melhor meio de cultivo, acrescido individualmente com as seguintes fontes de nitrogênio: peptona, extrato de levedura, ureia e as combinações: peptona + extrato de levedura, peptona + ureia, extrato de levedura + ureia e peptona + extrato de levedura + ureia. Os meios foram esterilizados em autoclave à 121 °C por 30 minutos; então, foram inoculados com 1 mL da solução de esporos do inóculo e incubados à 30 °C por um período de 96 horas. Após este tempo, a amostra foi filtrada, o volume registrado e a atividade xilanolítica determinada.

**4.5.3 Efeito da solução de sais do meio submerso para produção de xilanase**

A fonte de sais foi variada para analisar sua influência sob a atividade xilanásica. O fungo foi cultivado no melhor meio utilizando a melhor fonte de nitrogênio. Testados a solução de sais Khanna, soluções de sais CP, sais Wesson e suas combinações, Khanna + CP, Khanna + Wesson, CP + Wesson e a combinação dos três. Os meios de cultura foram preparados e autoclavados à 121 °C por 30 minutos, inoculados com 1 mL da solução de esporos e incubados à 30 °C, por um período de 96 horas.

**4.5.4 Efeito da fonte de carbono no cultivo do fungo EA 1.3.1 na produção de xilanase**

A influência da fonte de carbono sobre o crescimento do microrganismo e a atividade xilanásica foi investigada utilizando resíduos agroindustriais para enriquecer o meio de cultura pré-selecionado contendo as fontes de nitrogênio e solução de sais pré-

determinados. Usaram-se as seguintes fontes de carbono: casca de laranja, casca de tangerina, casca de abacate, casca de abóbora, casca de abacaxi, casca de banana, semente de abóbora, palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo. As fontes orgânicas sofreram secagem em estufa e foram trituradas com o uso de um moinho de facas. Os meios de cultivo foram preparados e autoclavados a 121 °C por 30 minutos, inoculados com 1 ml do inoculo e incubados a 30 °C, por um período de 96 horas.

#### **4.5.5 Efeito da concentração de esporos no inoculo do meio submerso para produção enzimática**

Para avaliar a produção xilanolítica de acordo com a concentração de esporos foi feito uma diluição seriada seguindo a proporção 1:1, onde tínhamos a solução de esporos obtida de acordo com o item 4.2 diluída em água destilada. Em seguida as diluições foram inoculadas em meio de cultura Khanna como padronizado anteriormente.

#### **4.5.6 Efeito do pH inicial do meio de cultivo para produção da xilanase**

Para avaliar a influência do pH inicial do meio de cultivo na produção enzimática, o meio foi preparado, como padronizado anteriormente, ajustando-se o pH para que, após a esterilização, obtivessem valores de 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5. Foram inoculados com 1 mL do inoculo e incubados à 30 °C por um período de 96 horas.

### **4.6 Caracterização bioquímica da enzima solúvel**

#### **4.6.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática utilizando Delineamento Composto Central Rotacional DCCR<sup>2</sup>**

O planejamento fatorial foi utilizado para testar simultaneamente a interferência da temperatura e do pH na atividade xilanolítica. O planejamento consistiu em variar os parâmetros a serem estudados de forma simultânea e alternada a partir de um ponto zero, a fim de obter uma função que expresse a variação desses parâmetros sob um resultado. Para a análise foi utilizando o *software Protimiza*.

Estabeleceu-se o ponto zero de temperatura como 50 °C e pH 5,0. As variações das concentrações estão descritas na Tabela 6, onde os zeros indicam as concentrações

iniciais ou pontos zero já citados, e os demais valores como (+/-) 1 e (+/-) 1,41, indicam as variações estabelecidas pelo método DCCR, e que são transcritas como concentrações (p/v) de acordo com as equações a seguir:

$$\frac{pH - 5,0}{1,4} \times 2 = \frac{^{\circ}\text{C} - 50}{}$$

Onde pH = pH de reação

$^{\circ}\text{C}$  = temperatura de reação

**Tabela 6 - Planejamento fatorial, contendo os valores codificados e originais das variáveis de estudo**

| <b>Ensaio</b> | <b>X<sub>1</sub><br/>(pH)</b> | <b>X<sub>2</sub><br/>(temperatura)</b> | <b>pH</b> | <b>Temperatura<br/>(<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b> |
|---------------|-------------------------------|--|-----------|--|
| 1             | -1                            | -1                                     | 3,6       | 36   |
| 2             | +1                            | -1                                     | 6,4       | 36   |
| 3             | -1                            | +1                                     | 3,6       | 64   |
| 4             | +1                            | +1                                     | 6,4       | 64   |
| 5             | -1,41                         | 0                                      | 3,0       | 50   |
| 6             | +1,41                         | 0                                      | 7,0       | 50   |
| 7             | 0                             | -1,41                                  | 5,0       | 30   |
| 8             | 0                             | +1,41                                  | 5,0       | 70   |
| 9             | 0                             | 0                                      | 5,0       | 50   |
| 10            | 0                             | 0                                      | 5,0       | 50   |
| 11            | 0                             | 0                                      | 5,0       | 50   |
| 12            | 0                             | 0                                      | 5,0       | 50   |

#### **4.6.2 Termoestabilidade da xilanase produzida pelo fungo EA 1.3.1**

A estabilidade à temperatura da xilanase foi avaliada através da incubação da enzima durante 30, 60, 90 e 120 minutos (na ausência de substrato) nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C. Posteriormente, a atividade enzimática de cada amostra foi determinada nas condições ideais de pH e temperatura.

#### **4.6.3 Estabilidade ao pH da xilanase produzida pelo fungo EA 1.3.1**

A estabilidade da enzima ao pH foi avaliada incubando o extrato enzimático em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5; 5,0 e 5,5) e fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0; 6,5 e 7,0) durante 30, 60, 90 e 120 minutos na ausência de substrato, em banho de gelo. Em seguida, determinou-se a atividade enzimática das amostras em tampão fosfato de sódio 200 mM pH 6,0, à 65 °C.

## 5. Resultados e Discussões

### 5.1 Otimização da produção de xilanases pelo fungo EA 1.3.1

As enzimas hidrolíticas se destacam nos processos industriais e são aplicadas na hidrólise de diversas substâncias naturais para a obtenção de produtos biotecnológicos. Entre eles, destaca-se a produção de etanol de segunda geração, que visa reutilizar resíduos agroindustriais, transformando-os em produtos de alto valor comercial. Esse processo de transformação necessita de catalisadores eficientes para a transformação de açúcares complexos em açúcares simples e fermentescíveis.

Desse modo, a busca e a adequação de enzimas lignocelulósicas, entre elas as xilanases, para o uso em indústrias tem sido destaque nas pesquisas científicas. Existem fontes microbianas para a produção eficiente dessa enzima, contudo, apenas algumas estirpes de fungos atendem aos critérios de produção comercial (ARAUJO COELHO, 2017). Impulsionando, assim, a busca de novos microrganismos e técnicas que podem ser utilizados para a produção de xilanases para o desenvolvimento desse setor industrial.

A fermentação submersa (FSm) foi a técnica escolhida para o desenvolvimento desse estudo sendo um método de cultivo líquido utilizado para a produção de enzimas, ele apresenta facilidade em controlar as condições de crescimento dos microrganismos como temperatura, pH e quantidade de água, acrescido da facilidade de recuperação das enzimas extracelulares (ORLANDELLI, 2012).

A produção de xilanases foi relatada a partir de vários fungos filamentosos, que foram altamente eficientes na degradação da molécula de xilana (LIAO *et al.*, 2012). Espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* são fungos produtores dominantes de xilanases e são frequentemente utilizados em processos industriais (HASSAN *et al.*, 2018)

Nos estudos de padronização das condições de cultivo para produções xilanásicas presentes na literatura, variaram parâmetros como: tempo e temperatura de cultivo, composição do meio, fonte de carbono e pH inicial (KADOWAKI *et al.*, 1997; DAMASCO *et al.*, 2000; SENTHILKUMAR *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008).

### 5. 1. 1 Análise do melhor meio de cultura e efeito do tempo de crescimento do fungo EA 1.3.1 na produção enzimática

A análise do melhor meio de cultura para a produção de xilanases pelo fungo EA 1.3.1 objetivou determinar o melhor meio de cultura para o crescimento fúngico e produção enzimática. Para isso, testaram-se quatro diferentes meios: (1) SR (RIZZATTI et al., 2001); (2) Khanna (KHANNA et al., 1995); (3) CP (PEIXOTO et al., 2003); (4) ADAMS. Todos os meios de cultura possuíram 1 % de farelo de trigo como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Os cultivos foram mantidos sob condição estática à 30 °C, e retirados a cada 24 horas até o sétimo dia.

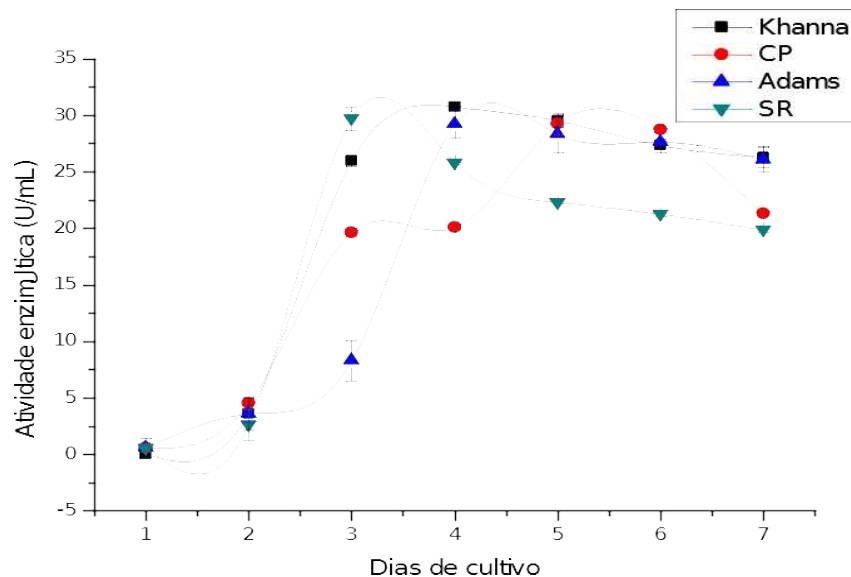
Pode-se observar que os melhores meios para a produção de xilanases extracelulares (U.mL<sup>-1</sup>) foram: Khanna e CP, seguido de Adams e SR. Quanto a análise do tempo de cultivo, observou-se melhor produção entre o quarto e quinto dia, independente do meio analisado

Pode-se observar na Tabela 7 que a atividade extracelular foi maior no meio Khanna após quatro dias de cultivo do fungo EA 1.3.1.

**Tabela 7 - Determinação do meio de cultivo e do tempo de crescimento para a produção de xilanases**

| Dias de Cultivo | Atividade Enzimática U.mL <sup>-1</sup> |              |              |              |
|-----------------|---|--------------|--------------|--------------|
|                 | Khanna                                  | CP           | Adamas       | SR           |
| 1               | 0                                       | 0,592 ± 0,29 | 0,59 ± 0,82  | 0,57 ± 0,3   |
| 2               | 3,62 ± 1,42                             | 4,55 ± 0,54  | 3,6 ± 0,79   | 2,62 ± 1,34  |
| 3               | 25,99 ± 0,78                            | 19,65 ± 1,32 | 8,32 ± 1,77  | 29,73 ± 1,04 |
| 4               | <b>30,77 ± 0,04</b>                     | 20,11 ± 4,17 | 29,25 ± 1,24 | 25,80 ± 0,09 |
| 5               | 29,53 ± 0,56                            | 29,26 ± 0,97 | 28,36 ± 1,67 | 22,30 ± 0,16 |
| 6               | 26,34 ± 0,62                            | 28,75 ± 5,18 | 27,64 ± 0,06 | 21,25 ± 4,19 |
| 7               | 27,32 ± 0,93                            | 21,34 ± 2,02 | 26,08 ± 1,07 | 19,88 ± 0,18 |

**Figura 3 - Análise dos meios de cultivo e tempo de crescimento do fungo EA 1.3.1 para produção xilanólica**



Inoculado em 25 mL de diversos meio de cultura líquido e mantidos em estufa bacteriológica à 30 °C, sob condição estática, durante sete dias. Triplicata de cada meio analisado foi retirada e sua atividade xilanólica quantificada a cada 24 horas.

Observou-se uma pequena diferença quando utilizado o meio de cultura Khanna, um meio com solução de sais complexa e com menores quantidades da fonte de carbono e nitrogênio quando comparado aos outros meios analisados. Devido a essa diferença o meio Khanna, caracterizado como um meio complexo, foi selecionado para continuação da padronização. Ressaltando que não foi observado uma diferença significativa em relação a todos os outros meios testados.

A utilização de meios complexos na produção xilanólica por fungos filamentosos também foi descrita por outros autores (RIZZATTI *et al.*, 2001 e 2004; ANTHONY *et al.*, 2003; SANDRIM *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008). Da mesma forma que o uso de meios simples também foram analisados e apresentaram bons resultados (RIZZATTI *et al.*, 2004; SAVITHA *et al.*, 2007; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Além da definição de um meio indutor de níveis satisfatórios de xilanases foi necessário que se determinasse por quanto tempo o fungo deveria permanecer incubado para uma maior indução da enzima. O meio Khanna e Adams obtiveram maior produção com 96 horas, enquanto para os meios CP e SR foram necessários 120 e 72 horas de incubação, respectivamente. Devido a uma pequena variação e a regulação obtida nos valores da atividade xilanásica foi padronizado o uso do meio Khanna com 96 horas de cultivo para



produção de xilanases pelo fungo em estudo.

O tempo determinado é relativamente curto, proporcionando redução no custo de produção em larga escala (SILVA *et al.*, 2011). Após o período de 96 horas, a atividade enzimática apresentou queda, comportamento esperado devido a possíveis alterações bioquímicas do meio, tais como esgotamento de nutrientes ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática (SILVA *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos estão de acordo com dados reportados na literatura, onde mostrou que *A. fumigatus* (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008), *A. awamori* e *A. oryzae* (TECHAPUN *et al.*, 2003) obtiveram sua máxima produção xilanásica com 96 horas de incubação. Enquanto que para *A. niveus* e *A. tamaritii* requereu 120 horas (TECHAPUN *et al.*, 2003), quando cultivados em meios simples.

### 5.1.2 Efeito da fonte de nitrogênio

Após a verificação de que a maior atividade extracelular foi obtida quando o micro-organismo foi cultivado em meio Khanna, objetivou-se analisar a interferência de diferentes fontes de nitrogênio no meio quanto à atividade enzimática.

Prepararam-se meios Khanna com 1 % de farelo de trigo como fonte de carbono, com três distintas fontes de nitrogênio: (1) peptona 0,1 %, (2) extrato de levedura 0,1 % (3) ureia 0,1 %, e suas combinações (como descrito no item 4.6.2 da metodologia). Os meios foram mantidos sob condição estática, a 30 °C, durante quatro dias.

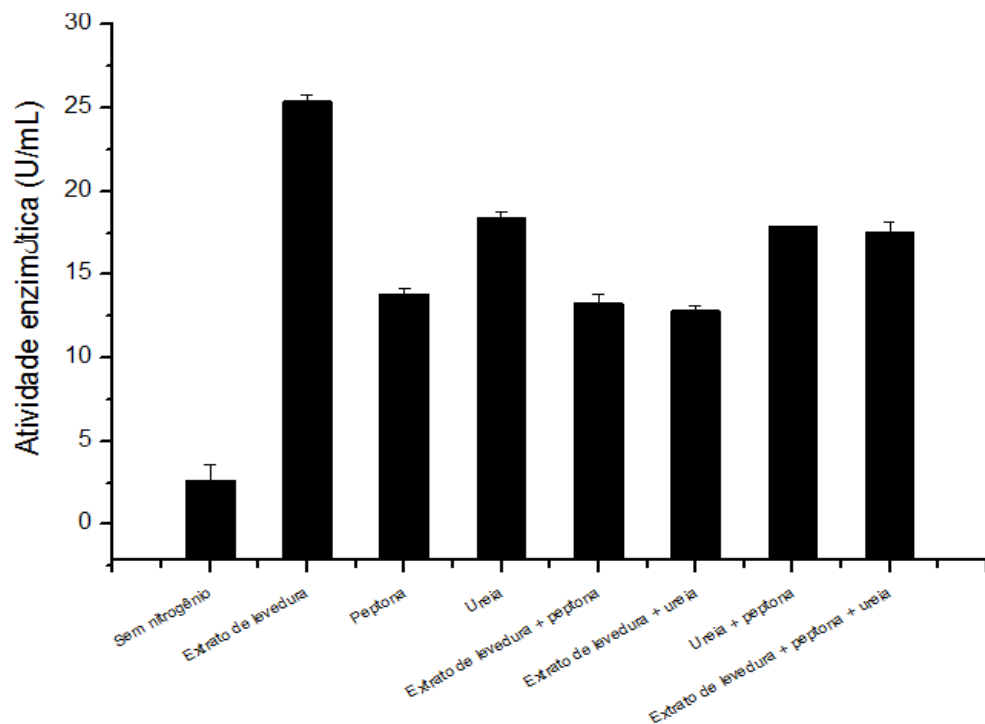
Pode-se observar que a adição de fontes orgânicas de nitrogênio mostrou que este elemento influencia no desenvolvimento fúngico, mostrando que o microrganismo em estudo necessita de um meio enriquecido com composto nitrogenado para sua maior produção enzimática. Contudo, o uso em quantias exageradas pode inibir a produção xilanolítica e o seu crescimento. O mesmo foi reforçado de acordo com Liao *et al.*, (2012), que mostrou melhor produção de xilanases quando fez uso de fontes de nitrogênio orgânico (peptona, extrato de levedura, licor de milho).

De acordo com os valores obtidos, observou-se que a atividade extracelular obtida no meio Khanna contendo extrato de levedura como fonte nitrogenada foi maior, seguida do uso de ureia.

**Tabela 8 – Determinação da fonte de nitrogênio do meio Khanna para produção a xilanase**

| Fontes de nitrogênio                  | Atividade U.mL <sup>-1</sup> |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Sem nitrogênio                        | 2,67 ± 0,9                   |
| <b>Extrato de levedura</b>            | <b>25,40 ± 0,36</b>          |
| Peptona                               | 13,83 ± 0,29                 |
| Ureia                                 | 18,42 ± 0,38                 |
| Extrato de levedura + Peptona         | 13,27 ± 0,51                 |
| Extrato de levedura + ureia           | 12,82 ± 0,28                 |
| Ureia + peptona                       | 17,85 ± 0,08                 |
| Extrato de levedura + peptona + ureia | 17,55 ± 0,6                  |

**Figura 4 - Análise do fungo EA 1.3.1 para produção xilanolítica em meio Khanna com diferentes fontes de nitrogênio**



O fungo foi inoculado em 25 mL de meio de cultura submerso Khanna, com diferentes fontes de nitrogênio, mantidos em estufa bacteriológica à 30 °C, sob condição estática, durante quatro dias.

Resultados semelhantes foram obtidos por Su *et al.*, (2011) e Kumar *et al.*, (2017), mostrando que o fungo *Thermomyces lanuginosus* em meio contendo extrato de levedura apresentou a máxima produção xilanolítica, seguida de peptona e farelo de soja. O contrário do obtido por Gaffney *et al.* (2009) onde observaram que o farelo de soja conseguiu induzir um maior potencial xilanolítico quando comparado com o uso de extrato de levedura.

Conclui-se, então, que a melhor fonte de nitrogênio para o desenvolvimento do fungo

em estudo em meio Khanna foi extrato de levedura 0,1 % (m/v) durante 96 horas em estufa bacteriológica à 30 °C.

### 5.1.3 Efeito das soluções de sais

Após a determinação do meio Khanna com extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Objetivou-se analisar a interferência de diferentes soluções de sais do meio visando aumento da atividade enzimática. O fungo foi cultivado em meio submerso.

Utilizaram-se meios Khanna com 1% de farelo de trigo como fonte de carbono, 0,1 % de extrato de levedura como fonte de nitrogênio e distintas soluções de sais, tais como: (1) solução de sais Khanna, (2) solução de sais CP, (3) solução de sais Wesson e suas combinações como descrito no item 4.6.3 da metodologia.

A presença de elementos salinos na composição do meio de cultivo pode apresentar diferença relativa quanto a produção xilanolítica. Por isso diferentes soluções salinas foram analisados, e observou-se desenvolvimento parecido quando utilizado solução de sais mais complexas, como solução de sais Khanna e solução simples, como a solução CP.

Apresentando, respectivamente, 24,57 e 25,54 U/mL<sup>-1</sup>. Enquanto o meio submerso sem solução de sais apresentou baixa atividade, 9,03 U/mL<sup>-1</sup>.

Isso pode ser justificado devido a importância dos elementos no desenvolvimento dos fungos. Os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e potássio são requeridos em grande quantidade pois participam da quase totalidade das substâncias celulares. Os três primeiros (C, H e O) são fornecidos na forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular e de água e o nitrogênio sob a forma adequada (orgânica ou inorgânica).

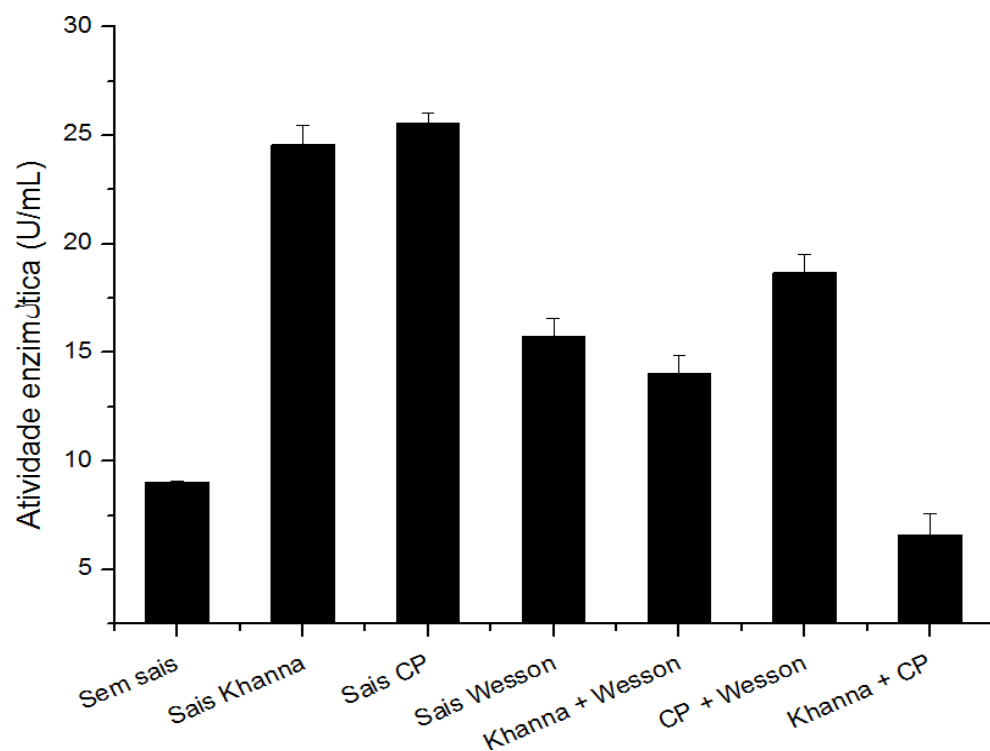
Os seguintes elementos S, P, Mg e K, são fornecidos ao fungo sob a forma de sais, e são denominados como macronutrientes. Alguns fungos requerem fatores de crescimento, principalmente vitaminas e outros como o ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio, que, por serem micronutrientes, são requeridos em quantidades mínimas.

Analisou-se também combinações de soluções de sais, os quais também apresentaram atividade satisfatória. Contudo, o fungo em estudo desenvolveu-se melhor em solução de sais Khanna e CP. Devido a uma pequena diferença de valores e pelos sais CP serem mais

simples, conseqüentemente menos oneroso, quando comparado com a solução de sais Khanna, ele foi determinado com a solução de sais mais promissora na indução da xilanase.

Conclui-se, então, que o meio Khanna enriquecido com a solução de sais CP apresentou melhor atividade xilanásica.

**Figura 5 – Análises do Fungo EA 1.3.1 para produção xilanolítica em meio Khanna com diferentes soluções de sais.**



O fungo foi inoculado em 25 mL de meio de cultura líquido Khanna, com diferentes soluções de sais, mantidos em estufa bacteriológica à 30 °C, sob condição estática, durante quatro dias.

**Tabela 9- Análise do meio Khanna com diferentes soluções de sais no cultivo do fungo para produção de xilanase**

| <b>Soluções de sais</b> | <b>Atividade (U.mL<sup>-1</sup>)</b> |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Sem sais                | 9,03 ± 0,03                          |
| Sais Khanna             | 24,579 ± 0,9                         |
| <b>Sais CP</b>          | <b>25,549 ± 0,5</b>                  |
| Sais Wesson             | 15,751 ± 0,92                        |
| Khanna + Wesson         | 14,045 ± 0,95                        |
| CP + Wesson             | 18,686 ± 0,85                        |
| Khanna + CP             | 6,629 ± 0,97                         |

#### 5.1.4 Efeito da fonte de carbono

Após a determinação do meio Khanna, enriquecido com solução de sais CP, usando extrato de levedura como fonte nitrogenada. Objetivou-se analisar a fonte de carbono para a produção xilanásica pelo fungo EA 1.3.1. Dentre as fontes de carbono analisaram-se carboidratos oriundos de resíduos agroindustriais (como descrito na metodologia).

O uso de resíduos agroindustriais é reforçado por estudos que afirmam que a produção de enzimas xilanolíticas precisam ser induzidas, preferencialmente, por moléculas complexas. Tendo em vista que açúcares facilmente metabolizados, como glicose, são repressoras da produção de hemicelulases, mesmo embora os monossacarídeos promovam o crescimento de fungos (LOANNESA *et al.*, 2000).

Resíduos são empregados para a produção de xilanases por diversos fungos (SANDRIM *et al.*, 2005; AACHARY, 2008), principalmente *Aspergillus* (BETINI, 2006; BETINI *et al.*, 2008) com o intuito de reduzir o custo de produção e obter um metabólito secundário de forma menos onerosa.

Observou-se que o fungo EA 1.3.1 apresentou maior produção xilanolítica quando induzidas com farelo de trigo (25,63 U/mL-1), em comparação com as outras fontes testadas. Isso pode ser justificado devido ao seu alto conteúdo de hemiceluloses (50 %) (SAHA, 2003). Palha de cana-de-açúcar (17,12 U/mL-1) e semente de abóbora (12,63 U/mL-1) também favoreceram a síntese enzimática e, portanto, podem ser utilizadas como fonte alternativa para a produção dessas enzimas e apresentam vantagens econômicas e ambientais.

**Tabela 10 - Análise da melhor fonte de carbono para produção de xilanases**

| <b>Fontes de carbono</b> | <b>Atividade (U.mL<sup>-1</sup>)</b> |
|--------------------------|--------------------------------------|
| Casca de laranja         | 5,254 ± 0,44                         |
| Casca de tangerina       | 1,63 ± 0,30                          |
| Casca de abacate         | 1,91 ± 0,07                          |
| Casca de abóbora         | 2,50 ± 0,0                           |
| Casca de abacaxi         | 5,45 ± 0,17                          |
| Semente de abóbora       | 12,63 ± 0,65                         |
| Casca de banana          | 1,80 ± 0,44                          |
| Palha de cana-de-açúcar  | 17,127 ± 0,37                        |
| <b>Farelo de Trigo</b>   | <b>25,63 ± 0,97</b>                  |

Resultados semelhantes foram relatados por Badhan *et al.* (2007). Li *et al.* (2007) e Royer e Nakas (1989) observaram que farelo de trigo e polpa de madeira foram mais eficazes para a produção de xilanases por *Penicillium sp.* ZH-30 e *Trichoderma longibrachiatum*, respectivamente, quando comparado com xilana pura.

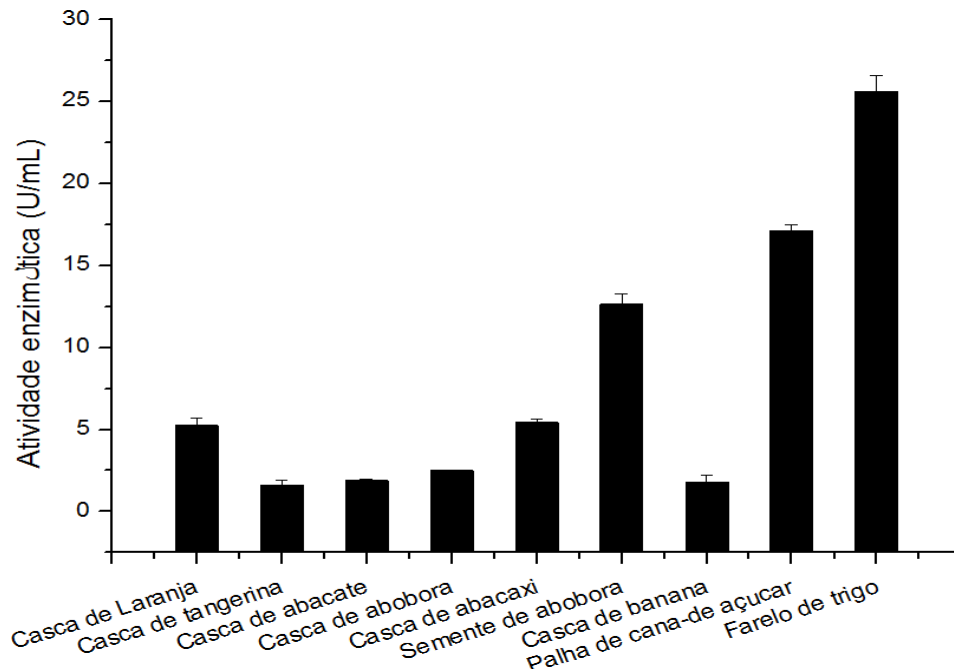
Para Terrasan *et al.* (2010) resíduos de cervejaria e farelo de trigo são bons indutores de xilanases. Contudo, observaram que a xilana pura era mais adequado para induzir a produção de xilanases por *Penicillium janczewskii* do que outros resíduos agrícolas. No entanto, o uso de xilanas comerciais como uma fonte de carbono não é econômica para a produção em grande escala de xilanases (DWIVEDI *et al.*, 2009).

Ao contrário dos resultados obtidos, LIAO *et al.* (2012) não obtiveram boa atividade xilanolítica quando induziu o *Penicillium oxalicum* GZ-20 com farelo de trigo. Isso pode ocorrer devido a grande quantidade de proteína do farelo de trigo que pode reduzir a produção enzimática (SUN *et al.*, 2008).

Sun *et al.* (2008) constataram que o aumento do teor de amido era correlacionado diretamente com uma redução nos níveis de xilanases. Da mesma forma, Oliveira *et al.* (2006) relataram uma atividade baixa das xilanases quando induzidas com casca de mandioca, embora obtendo um crescimento celular máximo.

Vale ressaltar que os resíduos analisados são compostos complexos e, quando utilizados como fonte de carbono, podem induzir diferentes tipos de proteínas, entre elas celulases, o que facilitaria a aplicação deste extrato na degradação de matéria lignocelulósica para a geração de combustíveis biológicos, como etanol (CORMANA *et al.*, 2005; BEG *et al.*, 2001).

**Figura 6 - Análise do potencial de resíduos agroindustriais para produção xilanólica pelo fungo EA 1.3.1**



O fungo foi inoculado em 25 mL de meio de cultura líquido Khanna, com diferentes fontes de carbono, mantidos em estufa bacteriológica à 30 °C, sob condição estática, durante quatro dias.

### 5.1.5 Efeito da concentração de esporos no inóculo do fungo em meio submerso para a produção de xilanases

Após determinar os constituintes do meio de cultura Khanna, tais como: fonte de nitrogênio, solução de sais e fonte de carbono. Objetivou-se analisar a produção de xilanases após a diluição da solução de esporos obtida a partir do fungo EA 1.3.1.

A solução de esporos foi diluída com água destilada previamente autoclavada, na proporção 1:1. Os meios foram preparados de acordo com a padronização anterior, inoculados com 1 ml da solução de esporos diluída e mantidos sob condição estática, à 30 °C, durante quatro dias.

Observou-se na Tabela 12 que em todas as amostras obteve-se boa atividade xilanásica, mesmo após diversas diluições. Isso mostra que o fungo EA 1.3.1 é um bom produtor de xilanases. A análise da amostra controle e a primeira diluição mostrou uma pequena variação na atividade das xilanases, não sendo observado uma diferença significativa entre ambas as atividades. Assim como, verificou uma redução de 50 % da atividade na quinta e sexta diluição.

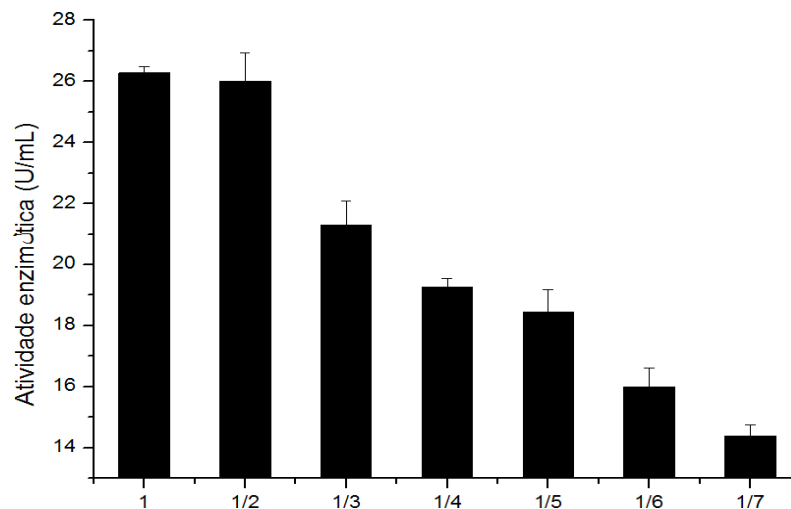
Mediante aos resultados obtidos, pode-se concluir que o fungo EA 1.3.1 é um micro-

organismo promissor quanto à produção de xilanases. Podendo induzir produção enzimática tanto em grande quantidade de esporos quanto em quantidades mais diluídas. Fato este importante para uma futura aplicação industrial.

**Tabela 11 - Efeito da concentração de esporos no inoculo do fungo em meio submerso para produção de xilanase**

| <b>Amostras</b>   | <b>Atividade (U.mL<sup>-1</sup>)</b> |
|-------------------|--------------------------------------|
| Sem diluição      | <b>26,28 ± 0,21</b>                  |
| Primeira diluição | <b>26,00 ± 0,93</b>                  |
| Segunda diluição  | 21,30 ± 0,79                         |
| Terceira diluição | 19,28 ± 0,27                         |
| Quarta diluição   | 18,45 ± 0,74                         |
| Quinta diluição   | 16,00 ± 0,62                         |
| Sexta diluição    | 14,40 ± 0,34                         |

**Figura 7 - Análise da diluição da solução de esporos do fungo EA 1.3.1 para produção xilanolítica**



O fungo foi inoculado em 25 mL de meio de cultura líquido Khanna, com diferentes concentrações de esporos, mantidos em estufa bacteriológica à 30 °C, sob condição estática, durante quatro dias.

### **5.1.6 Efeito do pH inicial do meio de cultivo do fungo EA 1.3.1 para produção de xilanase**

O metabolismo do fungo, ao crescer, altera o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. O que torna difícil o tamponamento durante o cultivo, pois os próprios tampões podem ser assimilados ou podem ser tóxicos em quantidades que seriam necessárias para efetivo tamponamento. A



concentração do íon hidrogênio num meio pode afetar o crescimento indiretamente pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou diretamente pela sua ação nas superfícies celulares (CARLILE & WATKINSON, 1997).

Por isso objetivou-se analisar a influência do pH inicial do meio de cultura na produção de xilanases para os ph, 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; e 8,0. Os meios foram preparados de acordo com a padronização, inoculados com 1 mL da solução de esporos e mantidos sob condição estática, à 30 °C, durante quatro dias.

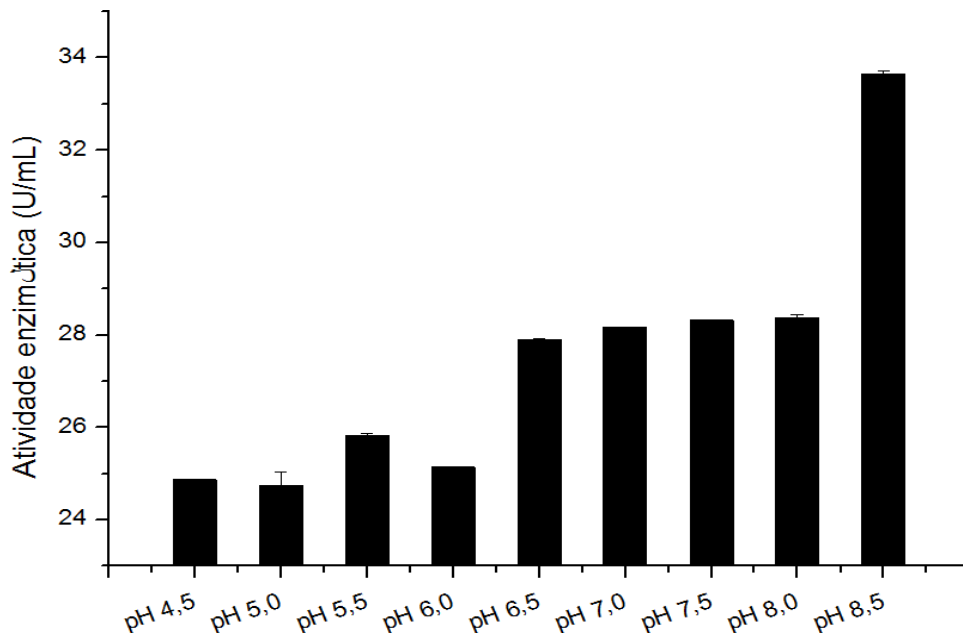
De acordo com Shah *et al.* (2015), a maioria dos fungos são capazes de crescer em uma ampla faixa de pH, e isso pode ser observado com os dados obtidos. De acordo com a Tabela 13, em todos os pH analisados obteve-se uma boa produção xilanolítica, contudo, quanto mais básico o meio de cultura, maior foi a produção enzimática obtida. Assim, determinou-se 8,5 como pH inicial para o meio de cultura.

Resultados diferentes foram encontrados na literatura. Por exemplo, o fungo *Aspergillus fumigatus* cultivado com sabugo de milho apresentou melhor produção em pH 5,4 (LENARTOVICZ *et al.*, 2003). Enquanto que o fungo *P. oxalicum* obteve melhor produção em pH inicial de 5,0, observando queda na produção quando cultivado em meios mais básicos (LIAO *et al.*, 2012). Relatos de Joshi e Khare (2011), mostram que diversos fungos apresentaram melhor produção xilanolítica em pH 7,0

**Tabela 12 - Análise do pH inicial do meio de cultura do fungo EA 1.3.1 na produção de xilanases**

| Amostras | pH final | Atividade (U.mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------|---------------------------------|
| pH 4,5   | 6,82     | 24,87 ± 0,0018                  |
| pH 5,0   | 6,15     | 24,75 ± 0,28                    |
| pH 5,5   | 6,87     | 25,83 ± 0,03                    |
| pH 6,0   | 6,90     | 25,14 ± 0,003                   |
| pH 6,6   | 6,91     | 27,9 ± 0,028                    |
| pH 7,0   | 6,98     | 28,17 ± 0,01                    |
| pH 7,5   | 7,11     | 28,32 ± 0,003                   |
| pH 8,0   | 7,12     | 28,38 ± 0,06                    |

**Figura 8 - Análise do pH inicial do meio de cultura Khanna para produção xilanólica pelo fungo EA 1.3.1**



O fungo foi inoculado em 25 mL de meio de cultura líquido Khanna, com diferentes pH iniciais, mantidos em estufa bacteriológica à 30 °C, sob condição estática, durante quatro dias.

## 5.2 Caracterização bioquímica da enzima solúvel

Diversos fatores podem afetar a atividade enzimática como o pH, a temperatura, a força iônica do meio, pressão, o tampão empregado, a pureza dos reagentes e da enzima. Estes fatores devem ser experimentalmente determinados ou escolhidos arbitrariamente e mantidos constantes durante estudos (SHULER & KARGI, 2002). Tais parâmetros bioquímicos, principalmente, temperatura e pH de reação, bem como as estabilidades química e térmica são importantes para a aplicação industrial de qualquer enzima e, por isso, necessitam ser estudadas.

### 5.2.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

Após a otimização para melhor produção de xilanases a partir do fungo EA 1.3.1, objetivou-se analisar o efeito da temperatura e do pH na atividade dessa enzima, pois de acordo com a literatura, as xilanases podem apresentar características diferentes, como pH e temperatura ótimos de atuação, característica dependente do microrganismo produtor (HALTRICH *et al.*, 1996).

Para esse experimento o microrganismo foi cultivado em Meio Khanna com farelo

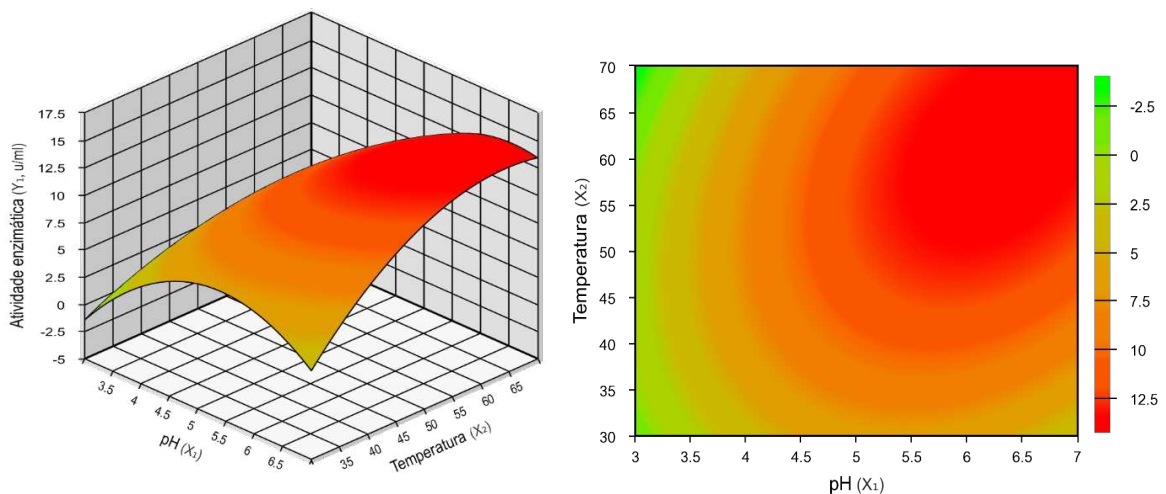
de trigo como fonte de carbono 1 %, enriquecido com solução de sais CP, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, pH inicial 8,5, sob condição estática, durante quatro dias, à 30 °C. E para a determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade, o extrato bruto foi incubado com o substrato xilana 1% em tampões e temperaturas específicos de acordo com o descrito na metodologia.

Analisando a superfície de resposta (Figura 9) e curvas de contorno (Figura 10), pode-se verificar a existência de uma região ótima para atividade enzimática onde se encontra uma faixa de combinações entre pH e temperaturas, demonstrando diversas informações sobre a reação da enzima diante das variáveis analisadas. Dentre elas, determinou-se 65 °C e 6,5 como condições ótimas de temperatura e pH, respectivamente, para a reação.

**Tabela 13 - Análise de variância para a atividade de xilanases**

| Fonte de Variação | Soma dos quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado médio | Fcalc | p-valor     |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|-------------|
| Regressão         | 200,5              | 5                  | 40,1           | 82,6  | 0,0000<br>2 |
| Resíduos          | 2,9                | 6                  | 0,5            |       |             |
| Falta de ajuste   | 2,6                | 3                  | 0,9            | 9,7   | 0,0472<br>3 |
| Erro puro         | 0,3                | 3                  | 0,1            |       |             |
| Total             | 203,4              | 11                 |                |       |             |
| $R^2=98,57\%$     |                    |                    |                |       |             |

**Figura 9 - Superfície de resposta e curvas de contorno para as variáveis pH (X<sub>1</sub>) e temperatura (X<sub>2</sub>) para atividade xilanólica do fungo EA 1.3.1**



Resultados diferentes são obtidos quando analisam o pH de reação de xilanases produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*. Estudos com esse gênero encontra, comumente, o pH 5,0 como ótimo para as xilanases (SHAH; MADAMWAR, 2005; ZIMBARDI *et al.*, 2013). As xilanases de *Aspergillus versicolor* (CARMONA *et al.*, 1997), *Aspergillus giganteus* (FIALHO; CARMONA, 2004), *A. fischeri*, *A. sojae* e *A. nidulans* (BEG *et al.*, 2001, POLIZELI *et al.*, 2005) e para uma das isoformas de xilanase produzidas por *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005), e *Penicillium oxalicum* (LIAO *et al.*, 2015) apresentaram resultados diferentes.

Condições ótimas em torno de 6,0 e 6,5 são, também, bastante comuns, tendo sido descritas por diversos autores (CARMONA *et al.*, 1998; ABDEL-SATER; EL-SAID, 2001; SOUZA, 2012; TERRONE, 2013; CHEN; LI; WANG, 2016; NASCIMENTO, 2017). Há também, na literatura, estudos que descrevem xilanases com caráter alcalofílico expressas por fungos como *A. nidulans*, *A. terreus* (POLIZELI *et al.*, 2005), xyl I de *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005) ou de outros gêneros como *Thermomyces lanuginosus* (LI *et al.*, 2005).

Quanto a temperatura, estudos com fungos filamentosos têm descrito temperaturas ótimas de atividade xilanolítica em torno de 40 e 60 °C (CHEN; WANG, 2016). Assim como algumas xilanases comerciais como Sumizyme, Multifect XL, Pulpzyme e Cartazyme, também produzidas por fungos, apresentam atividade ótima nesta faixa de temperatura (POLIZELI *et al.*, 2005).

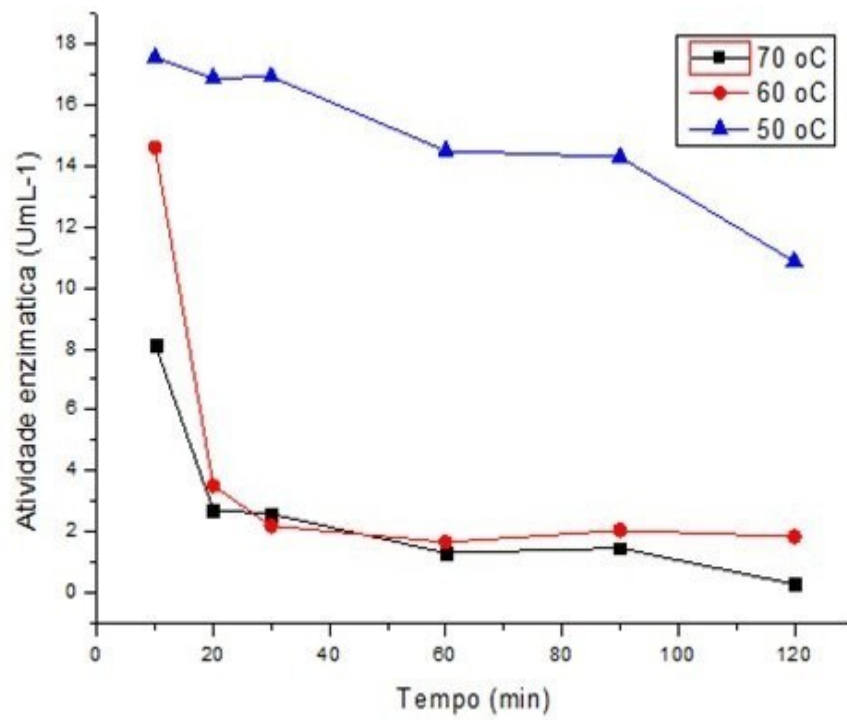
No trabalho de Nascimento (2017) a xilanase bruta apresentou atividade ótima à 55 °C, valores diferentes do observado no presente estudo, no qual obteve melhor atividade enzimática à 65 °C. Além dessa, outras xilanases, como as de *Aspergillus niveus* (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2009) e *Aspergillus niger* (JIN *et al.*, 2012), e a maioria dos *Aspergillus* (RIZZATTI *et al.*, 2004; POLIZELI *et al.*, 2005; SANDRIM *et al.*, 2005), incluindo outras linhagens de *A. fumigatus* (SAVITHA *et al.*, 2007) apresentaram temperatura ótima à 55 °C.

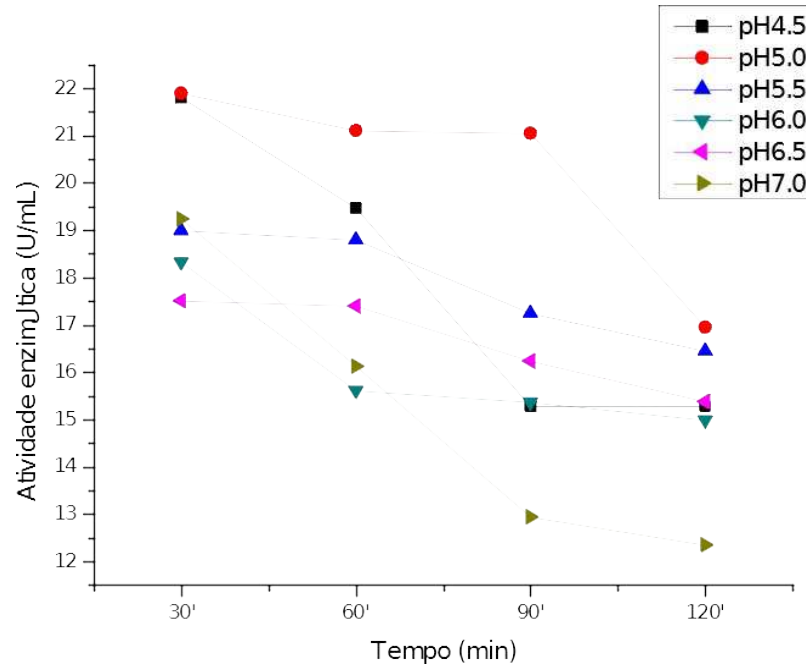
### 5.2.2 Efeito da estabilidade à temperatura e pH

Para possíveis aplicações de enzimas xilanolíticas em processos industriais é necessário conhecer como essa enzima se comporta diante da alteração de temperatura e pH. Assim, objetivou-se determinar a estabilidade à temperatura e pH do extrato bruto de xilanases livres. Analisou-se a termotolerância nas seguintes temperaturas 50 °C, 60 °C e

70°C e nos seguintes pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 e 8,0.

**Figura 10 - Estabilidade à temperatura da xilanase solúvel**



**Figura 11 - Estabilidade ao pH**

A Figura 10, mostrou a análise de estabilidade do extrato bruto xilanolítico em incubação durante 120 minutos. Observou-se que à 50 °C o extrato enzimático apresentou-se estável, perdendo apenas 8 % da sua atividade após 90 minutos de incubação. Nas seguintes atividades analisadas, o extrato xilanolítico não apresentou estabilidade, perdendo muito da sua atividade hidrolítica.

Na Figura 11 foi possível observar que em pH 5,0 o extrato enzimático apresentou-se estável por 90 min, perdendo 22 % da sua atividade quando incubado a mais 30 minutos. Nos pH 4,5; 5,5; 6,0 e 6,5, a enzima apresentou-se estável durante 30 minutos, perdendo atividade nos minutos seguintes.

Dessa forma, várias são as conclusões e as perspectivas acerca das análises realizadas nesse estudo, em especial pode-se afirmar que o fungo EA 1.3.1 utilizado nesse estudo possui um potencial para produção de enzimas xilanolíticas, que porventura possam um papel fundamental em processos biotecnológicos.

## 6. Conclusões

As análises realizadas nesse trabalho permitiram que várias conclusões fossem extraídas:

- ✓ Determinou-se o meio Khanna, como melhor meio de cultura indutor para produção de xilanases a partir do fungo EA 1.3.1;
- ✓ A melhor produção enzimática foi obtida com o quarto dia de cultivo, caracterizando um cultivo com redução dos gastos energéticos;
- ✓ O extrato de levedura foi determinado como a fonte de nitrogênio potencial para a produção xilanolítica;
- ✓ A solução de sais do meio de cultura CP induziu melhor a produção enzimática no meio submerso Khanna;
- ✓ A solução de esporos diluída em 50 % de água apresentou capacidade de se desenvolver e produzir quantidade expressiva de enzima;
- ✓ O fungo EA 1.3.1 apresentou melhor atividade xilanolítica em pH básico, determinando-se 8,5 como bom pH indutor dessa produção;
- ✓ Para a produção de xilanases estabeleceu-se como fonte de carbono o farelo de trigo devido à maior atividade enzimática extracelular;
- ✓ O extrato bruto produzido apresentou melhor atividade hidrolítica em pH 6,5 à 65 °C;
- ✓ O extrato enzimático analisado apresentou-se estável à 50 °C e em pH 5,0 durante 90 minutos.

Conclui-se, então, que as xilanases produzida pelo fungo EA 1.3.1 apresentou boa produção xilanolítica em um meio de cultura que pode ser menos oneroso, uma vez que o fungo em estudo obteve uma boa atividade enzimática sob condições simples, durante poucos dias de cultivo e fonte de carbono composta de resíduos agroindustriais. Assim como, o extrato bruto produzido apresentou características promissoras para aplicação industrial..

## Referências

- AACHARY, A.A. & PRAPULLA, S.G. Corn-cob-induced endo-1,4-beta-D-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan. *J Agric Food Chem*, 56(11):3981-3988, 2008.
- ABDEL-SATER, M. A.; EL-SAID, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 47, n. 1, p. 15-21, 2001.
- ADAMS, P.R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. *Mycopathologia*, v. 112, p 35-37, 1990.
- ALCARDE, A. R. Agência de informação Embrapa: Cana de açúcar. Outros produtos. EMBRAPA, 2011.
- ALEXANDRINO, G.; KUMARAN, N. S. Amylase production from solid state fermentation and submerged liquid fermentation by *Aspergillus niger*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 47, n. 1, p. 99-104, 2007.
- ANDRADE, S.V; POLIZELI,; M.L.T.M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A. Effect of carbon source on the biochemical properties of b-xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. *Process Biochem*.v. 39, p.1931-1938, 2004.
- ANTHONY, T.; RAJ, K.C.; RAJENDRAM, A.; GUNASEKARAN, P. Inhibition of proteases during fermentation improves xylanase production by alkali tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *J Bios Bioeng*, 96(4):394- 396, 2003.
- ARAÚJO COELHO, L. V., *et al.* O potencial de *Streptomyces* isolados na região de maués na produção de enzimas hidrolíticas. *Ciência e Natura*, Santa Maria v.39, n.2, p. 202 – 210, 2017.
- AZEVEDO, M.C.A. Bioprospecção: coleta de material biológico com finalidade de explorar os recursos genéticos. Segunda edição, Conselho Nacional da reserva da biosfera da Mata Atlântica, 2003.
- AZEVEDO, Tailah Oliveira Marins. Produção e caracterização de proteases de fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica. 2018. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; SONIA, K. G.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Functionally diverse multiple xylanases of thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, n. 5, p. 460-466, 2007.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and application. *Adv Appl Microbiol*. v. 43, p. 141-194, 1997.
- BAKIR, U., YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo- $\beta$ -1,4- xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enz. Microb. Technol.* 29(6): 328-334, 2001.
- BANERJEE, G; JOHN S. SCOTT-CRAIG, J. S; WALTON, J. D. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *Bioenerg. Res.* v.3, p. 82-92, 2010.
- BEAUGRAND, L.; *et al.* Characterization of a bifunctional xylanase/endoglucanase from



- yak rumen microorganisms *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 1933–1942, 2012.
- BEG, Q.K.; KAPPOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.56, n.3- 4, p.326-338, 2001.
- BENEYTON, T. *et al.* High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics. *Scientific reports*, v. 6, p. 27223, 2016.
- BENNETT, S. Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochimica et biophysica Acta*, Amsterdam v. 58, n. 1, mar., 1998.
- BETINI, J.H.A. Estudos comparativos de xilanases produzidas por três espécies de *Aspergillus* visando a aplicação no bi branqueamento de polpa de celulose para fabricação de papel. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - FFCLRP-USP, p. 114, 2006.
- BETINI, J.H.A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced by solid state fermentation and its application on cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2008.
- BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; KRÁTKÝ, Z. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. Identification and cellular localization. *Eur J Biochem*. v. 108, p. 313- 321, 1980.
- BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; TENKANEN, M. & KLUEPFEL, D. “Endo- $\beta$ -1,4-xylanases families: differences in catalytic properties”. *J Biotechnol*, 57:151–66, 1997.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *American Journal of Botany* v. 98, p. 426-38, 2011.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A., CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia. Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Ed. Interciência Ltda, 2008.
- BORZANI, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. *PLoS Biology*, California, v. 4, n. 8, p.1358-1363, 2001.
- BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLET, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids, *Green Chemistry*, v.15, p. 550–583, 2013.
- BROWN, JR. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry Special Issue: Macromolecules in the 21st Century—Otto Vogl*, V, 42, 3, 487–495, 2004.
- BRUNNER A. L.; BECK A. H.; EDRIS B., SWEENEY R. T.; ZHU S. X.; LI R., et al. Transcriptional profiling of lncRNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. *Genome Biol.* 13, R75, 2012.
- CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. Database issue, p. D233–8, 2009.
- CANTERI, M.G. et al. SASM-AGRI - Sistema Para Análise E Separação De Médias Em

Experimentos Agrícolas Pelos Métodos Scott-Knott, Tukey E Duncan. Revista Brasileira de Agrocomputação, v.1, n.2, p.18-24, 2012.

CARLILE P.; WATKINSON, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*.v.17, p. 770-778, 1997.

CARMONA, E. C.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 166, n. 2, p. 311-315, 1998.

CARMONA, E. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; MONTEIRO, R. T. R.; JORGE, J. A.

Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 387-394, 1997.

CORMONA, E.C.; FIALHO, M.B.; BUCHGNANI, E.B.; COELHO, G.D.;

BROCHETOBraga, M.R.; JORGE, J.A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochem*, 40:359-364, 2005.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, 33, no1, 181-188, 2010.

CAUFRIER, R.; SINGH, S. & SINGH, O. V. “Bioconversion of lignocelulosic biomass: biochemical and molecular perspectives”. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 35, 377-391, 2003.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 86, p. 5-37, 2011.

CHEN, G. G.; MING, X.; GUAN, Y.; PENG, F.; YAO, C. L.; SUN, R. C. High strength hemicellulose-based nanocomposite film for food packaging applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 4, n. 4, p. 1985-1993, 2016.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*. v. 29, p. 3-23, 2002.

COLLINS, T.; GERDAY, C. & FELLER, G. “Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases”. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 3, 2005.

COSGROVE, J. R. BNDES: custo de produção de etanol 2G será menor do que de 1G até 2020. Agência Estado, mar. 2000.

COUGHLAN, L. HAZLEWOOD, P. “Microbial xylanolytic systems”. *Trends in Biotechnology*, 3 (11), 1993

CREPIN, I.H.; YAO, H.J. & LI, Y.K. Effective extraction and purification of  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two phase partitioning. *Enzyme Microb. Technol.*, 28:196–201, 2004.

CUNHA, S. MICHEL, J.R.S. Enzymatic saccharification and fermentation of rice processing residue for ethanol production at constant temperature. *biosystems engineering*, v. 142, p. 110-116, 2016.

DA SILVA, R.; FRANCO, C.M.L ; GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. *Boletim da*, 1997.

- DAMASCO, M.C.T.; ANDRADE, C.M.M.; PEREIRA JR, N. Use of corn cob for endoxylanase production by *Thermomyces lanuginosus* IOC – 4145. *Appl Biochem Biotechnol*, 84-86:821-834, 2000.
- DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA, S.; MICHELIN, M.; BETINI, J. H. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; DE MORAES, M. D. L. T. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 36, n. 1, p. 149-155, 2009.
- DE VRIES, R.P.; KESTER, H.C.; POULSEN, C.H.; BENEN, J.A.; VISSER, J. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.* p.327- 401, 2000.
- DEACON, J.W. *Fungal biology* / J.W. Deacon. —4th ed., 2006Rev. ed. of: *Modern mycology*. 3 ed. 1997.
- DHIMAN, S. S.; SHARMA, J.; BATTANA, B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. *BioResources*, v. 3, p. 1377-1402, 2008.
- DODD, J.; WANG, Y.-H.; CHU, J.; et al. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 2, p. 819–25. Elsevier Ltd, 2009.
- DWIVEDI, P., VIVEKANAND, V., GANGULY, R., SINGH, R.P. *Parthenium* sp. as a plant biomass for the production of alkalitolerant xylanase from mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 in submerged fermentation. *Biomass Bioenergy* 33 (4), 581–588, 2009.
- EIA Energy Information Administration. *International Energy Statistics*. Washington, DC. Disponível em: <http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=79&pid=81&aid=1&cid=regions&syid=2001&eyid=2012&unit=TBPD>. Acesso em: 26 de dec 2018.
- ELLEUCHE S., PIASCHECK H., ANTRANIKIAN G. "Fusion of the OsmC domain from esterase EstO confers thermolability to the cold-active xylanase Xyn8 from *Pseudoalteromonas arctica*." *Extremophiles*. v. 15, p. 311-317, 2011.
- ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L. "Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia". Caixias do Sul: Educs, 2010.
- FANG, Z.; ZHEN, Y.R.; NEUMANN, O.; POLMAN, A.; GARCI ´A DE ABAJO, F.J.; NORDLANDER, P.; HALAS, N.J. Evolution of light-induced vapor generation at a liquid- immersed metallic nano particle. *Nano Lett.* v.13, p.1736-1742, 2013.
- FAO, The Food and Agriculture Organization; Cassava production and biodiversity disponível em <<http://www.fao.org/docrep/007/y2413e/y2413e0c.htm>> acesso em dezembro de 2018.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. New York: Waster & Grugter, 1984. 613p.
- FIALHO, M. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*. *Folia Microbiologica*, v. 49, n. 1, p. 13-18, 2004.
- FREITAS, L., TORRES, G.; REIS, N. S. Amylase production from solid state fermentation and submerged liquid fermentation by *Aspergillus niger*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 47, n. 1, p. 99-104, 2017.
- FULLER, L. *Fungi in a controlled compost system— with special emphasis on the*

thermophilic fungi. *Acta Hort* 469:405–413, 1976.

GAFFNEY, M., DOYLE, S., MURPHY, R. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (12), 2640–2644, 2009.

GARCIA, M.R.Z., RODRIGUES, M.V.L., DA SILVA, M. SETTE, L.D. Marine derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, v.62, p.364-370, 1970.

GARCIA, M.R.Z., SETTE, L.D., RODRIGUES, M.V.L.. Improved extraction method to evaluate selected PAHs degradation by marine fungi grown in fermentative medium. *Journal of the Brazilian Chemical Society* v.22, p.564-570, 1987.

GOMES, D.J.; GOMES, J. & STEINER, W. Factors influencing the induction of the endoxylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *J. Biotechnol.*, 33:87-94, 2007.

GOMES, J.; STEINER, W. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, v. 42, n. 4, p. 223–235, 2004.

GOTTSCHALK, L.M.F.; et al. Cellulases, xylanases, beta-glucosidases and ferulic esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal* 51, 72-78, 2010.

GRAY, K.A; ZHAO, L.S. Emptage M. *Bioethanol*. *Curr Opin Chem Biol.* v. 10, p. 141-146, 2006.

GUERRERO, J.; SILVEIRA, W. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.*, v.42, p.223–235, 2003.

GUIMARÃES, N. C. A.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F.F.; MARQUES, M. R.; POLIZELI, M. L. T. M.; GIANNESI, G. C. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. *SpringerPlus Journal*, v. 2, p. 1- 7, 2013.

GUO, F. E ZHANG, M. An effective degumming enzyme from *Bacillus* sp. Y1 and synergistic action of hydrogen peroxide and protease on enzymatic degumming of ramie fibers. *Biomed Research International*, v. 20, p. 1-9, 2013.

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.74, p.937-953, 2007.

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. *Bioresour. Technol.*, Kidlington, v. 58, p. 137-161, 1996.

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

HAN, Y.; Agarwal, V.; Dodd, D.; Kim, J.; Bae, B.; Mackie, R. I.; Nair, S.K.; Cann, I. K. O. Biochemical and structural insights into xylan utilization by the thermophilic bacterium *Caldanaerobius polysaccharolyticus*. *J Biol Chem.* v. 42, p.34946–34960, 2012.

HASSAN, K., MISHRA, A., JHA, B., Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: a potential agent for single step saccharification of sea weed

biomass. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 93, 51–56, 2018.

HAULI, I.; SARKAR, B.; MUKHERJEE, T.; KANTI, S.; MUKHOPADHYAY, S. K. Purification and characterization of a thermoalkaline, cellulase free thermostable xylanase from a newly isolated *Anoxybacillus* sp. Ip-C from hot spring of Ladakh. *Research in Biotechnology*, v. 4, p. 30-43, 2013.

HAWKSWORTH, J. G, Samson RA, Olijnsma TW, Camp HJM, Gerrits JPG, Griensven LJLD. Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *Appl Environ Microbiol* 60(2):454–458, 1995.

HEATH, J. Thermophilic fungi and applied research: a synopsis of name change and synonymies. *World J Microbiol Biotechnol* 16:881–888, 1986.

HEATH, J. Thermotolerant fungi erroneously reported in applied research work as possessing thermophilic attributes. *World J Microbiol Biotechnol* 16:869–880, 1980.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 100. P. 10-18, 2009.

HENRISSAT, B. “A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities”. *Biochem. J.*, 280, 309-316, 1991.

HILL, I.; DEHING, I.; DELCOUR, J. A. Physico-chemical properties of cassava starch. *Starch/Stärke*, v. 50, n. 2-3, p. 58-64, 2006.

HOQ, M., DECKWER, W.D. Cellulase-free xylanase by thermophilic fungi: a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 43 (4), 604–609, 1995.

HYUN, J. W.; HWANG, R. Y.; LEE, K. S.; SONG, J. H.; YI, P. H.; KWON, H. M.; HYUN, D. H.; AND KIM, K. S. Seasonal occurrence of yellow tea thrips, *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) in citrus orchards and its damage on citrus fruits. *Korean J. Appl. Entomol.* v.51, n.1, p.1-7, 2012.

IELOVICH, M. Nanostructured cellulose:Review. *Bioresources* 3 (4) 1403-1418, 2008.

IRFAN, M.; SYED, Q. Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, v. 5, p. 7-11, 2012.

JANES, R.L. The Chemistry of Wood and Fibres. In: MacDonal and Franklin's Pulp and Paper Manufacture. Vol. I: The Pulping of Wood. McGraw-Hill, New York, 1969.

JARDINE, J. G; DISPATO, I.; PERES, M. R. Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore do conhecimento agroenergia. Embrapa Informática Agropecuária, Campinas-SP, 28 p, 2009.

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

JEFFRIES. T. W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: *Biochemistry of Microbial Degradation*, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, p. 233-277, 1994.

JEYA, M.; THIAGARAJAN, S.; LEE, J-K.; GUNASEKARAN, P. Cloning and expression

- of GH11 xylanase gene from *Aspergillus fumigatus* MKU1 in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng.* v. 108, p.24-29, 2009.
- JIN, N.; MA, S.; LIU, Y.; YI, X.; HE, R.; XU, H.; QIAO, D. R.; CAO, Y. Thermophilic xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using wheat straw and corn cob. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 10, p. 2387-239, 2012.
- JORGENSEN, H., MORKEBERG, A., KROGH, K.B.R., OLSSON, L. Production of celulasas and hemicelulasas by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme Microb. Technol.* 36 (1), 42–48, 2005.
- JOSHI, C., KHARE, S.K. Utilization of deoiled *Jatropha curcas* seed cake for production of xylanase from thermophilic *Scytalidium thermophilum*. *Bioresour. Technol.* 102 (2), 1722–1726, 2011.
- KADOWAKI, M.K.; SOUZA, C.G.M.; SIMÃO, R.C.G.; PERALTA, R.M. Xylanase production by *Aspergillus tamari*. *Appl Biochem Biotechnol*, 66:97- 106, 1997.
- KANG, G. , Q. Li , and P. Zhu . Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fi brosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 93 : 163 – 174 , 1999.
- KELLETT, L. E.; et al. Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes. *Biochem. J.*, 272, 369-376, 1990.
- KHANNA, P.; SUNDARI, S.S; KUMAR, N.J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.11, p 242-243, 1995.
- KING, Brian C et al. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for biofuels* v. 4, n. 1, p. 4 , 16 jan. 2011.
- KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 68, 2010.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A. & MALA, R. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23:411-456, 1999.
- KUMAR, D.; KUMAR, S. S.; KUMAR, J.; MALYAN, S. K. Xylanases and their industrial applications: a review. *Biochemical and Cellular Archives*, v. 17, n. 1, p. 353-360, 2017.
- KUMAR, S.; RAMÓN, D. Purification and regulation of the synthesis of a b-xylosidase from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett.* v. 135, p. 287-293, 1996.
- KURAKABE, M.; SHINJII, O.; KOMAKI T. Transxylosilation of  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. *Biosci Biotechnol Biochem.* v. 6112, p. 2010-2014, 1997.
- KURAKAKE, M.; FUJII, T.; YATA, M.; OKAZAKI, T.; KOMAKI, T. Characteristics of transxylosylation by beta-xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. *Biochem Biophys Acta.* v.1726:, p.272–279, 2005.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* v. 121, p. 1081-1100, 2005.

- LÉJOHN, L.. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research* v. 42, n. Database issue, p. D490-5 , 1974.
- LEMBO, T.; AZEVEDO, M.O.; BLOCH, C. JR.; FERREIRA-FILHO, E.X. Purification and partial characterization of a new  $\beta$ -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *World J Microbiol Biotechnol.* v. 22 p. 475-479, 2006.
- LENARTOVICZ, V.; DE SOUZA, C.G.M.; MOREIRA, F.G.; PERALTA, R.M.  
Temperature and carbon source affect the production and secretion of thermostable b-xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem.* v. 38, p.1775-1780, 2003.
- LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J.S.; ERIKSSON, KARL-ERIK, L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol.* v. 27, p.89-94, 2000
- LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 89-94, 2005.
- LI, X.L.; ZHANG, Z.Q.; DEAN, J.F.D.; ERIKSSON, K.E.L.; LJUNGDAHL, L.G. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Appl Environ Microbiol.* v. 59, p. 3212-3218, 1993.
- LI, X.T.; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; YANG, S.Q.; FENG, W.Y.; FAN, J.Y.; KUSAKABE, I. Characterization of cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Biores Technol* 96:1370-1379, 2007.
- LIAO HANPENG, CHUNMIAO XU, SHIYONG TAN, ZHONG WEI, NING LING, GUANGHUI YU, WASEEM RAZA, RUIFU ZHANG, QIRONG SHEN, YANGCHUN XU.  
Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Bioresource Technology* 123 (2012) 117–124, 2012.
- LIAO, H.; ZHENG, H.; LI, S.; WEI, Z.; MEI, X.; MA, H.; SHEN, Q.; XU, Y. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Scientific Reports*, v. 5, 2015.
- LIN, J.; NDLOVU, L.M.; SINGH, S.; BALAKRISHNA, P. Purification and biochemical characteristics of  $\beta$ -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* – SSBP. *Biotechnol Appl Biochem*, 30:73-79, 1999.
- LIU, L. et al. Use of genome-scale metabolic models for understanding microbial physiology. *FEBS Letters*, v. 584, n. 12, p. 2556–2564, 2010.
- LOANNESA, P.D., PEIRANO, A., STEINER, J., EYZAGUIRRE, J. An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. *J. Biotechnol.* 76 (2–3), 2000.
- LU, Y.J.; ZHANG, Y.M.; GRIMES, K.D.; QI, J.; LEE, R.E., ROCK, C.O. Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in Gram-positive pathogens. *Mol Cell.* v.23, p. 765– 772, 2006.
- LYND, L.R.; ZYL, W.H.V.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16. n. 5, p. 577-583, 2005.

- MACEDO, I. C. (Org). A Energia da Cana-de-Açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e sua sustentabilidade. São Paulo: UNICA, 2005. p. 148.
- MADIGAN, M. T., *et al.*, D. A. *Brock biology of microorganisms*. Vol. 13. Pearson, 15 ed., 2016.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock Biology of microorganisms*. Prentice Hall, 2000.
- MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Re/View Environmental Science & Bio/Technology*, v 1, p. 105-114, 2002.
- MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, v. 15, p. 804-816, 1999.
- MARTÍN, C.; THOMSEN, M., H.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; THOMSEN, A. B. Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4221-4228, 2008.
- MARTÍNEZ, M.A.; DELGADO, O.D.; BRECCIA, J.D.; BAIGORÍ, M.D. AND SIÑERIZ, F. Revision of the taxonomic position of the xylanolytic *Bacillus* sp. MIR32 reidentified as *Bacillus halodurans* and plasmid-mediated transformation of *B. halodurans*. *Extremophiles*. v. 6, p.391–395, 2002.
- MASAMI, F. M.; BRUNI, A. T.; DEL BIANCHI, V. L. Performance of an anaerobic baffled reactor (ABR) in treatment of cassava wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, n.1, p.48-53, 2008.
- MATANO, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 108, p. 128–133, 2012.
- MEAGHER, M.M.; TAO, B. Y.; CHOW, J.M.; REILLY, P.J. kinetics and subsite mapping of a D-xylobiose and D-xylose producing *Aspergillus niger* endo-(1,4)- $\beta$ -D-xylanase. *Carbohydrate Research*. v. 173, p. 273-283, 1988.
- MELO, G. R. Produção de celulasas e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos. 2010. 87 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Programa de Pós-Graduação em biologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- MELO, A. & AZEVEDO, K.. Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles. *Mycologia* 63:537–547, 1998.
- MILLER, G. L.. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77–93, 2013.
- MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA, G. V.; SANTOS, S. S. T.; RIBEIRO, A. P. S.; SIQUEIRA, F. G.; FILHO, E. X. F. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 498-505, 2012.



- MOSIER, N.; et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, V. 96, 673–686, 2005.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization*. AK. Chandel & SS. da Silva. InTech., 2013.
- MU, W.; BEN, H.; RAGAUSKAS, A.; DENG, T. Lignin Pyrolysis Components and Upgrading -Technology Review. *Bioenergy Research* , v. 6, p. 1183-204, 2013.
- MUKHTAR, P.; MOMCILOVIC, D., Chemical structure analysis of starch and cellulose derivatives. In: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Academic Press, p. 117-210, 2018.
- NASCIMENTO, J. M. F. Produção, purificação, propriedades bioquímicas e aplicação de xilanases de *Aspergillus hortae*. 2017. 120 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2017.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 1274 p. .978-85-363-2418-0, 2011.
- NOGUEIRA, L. A. H. (Org.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. Resumo Executivo. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1549-58, 2010.
- OHTA, K.; MORIYAMA, S.; TANAKA, H.; SHIGE, T.; AKIMOTO, H. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. *J Biosci Bioeng*. v. 92, p.262-270, 2010.
- OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L., TAMBOURGI, E.B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M–115 from different agricultural wastes. *Bioresour. Technol.* 97 (6), 862–867, 2006.
- OLIVEIRA, M. Entre açúcares e genes. *Pesquisa Fapesp*, ed. 200, p. 86-91, 2012.
- ORLANDELLI, T.D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi, *FEMS Yeast Research*, v. 3, p. 133-140, 2012.
- OTERO J. M.; NIELSEN J. *Industrial systems biology*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 105, n. 3, p. 439–460, 2010.
- PALMA, M.B., MILAGRES, A.M.F., PRATA, A.M.R., MANCILHA, I.M. Influence of Aeration and Agitation Rate on the Xylanase Activity from *Penicillium janthinellum*. *Process Biochemistry*, 31 (2): 141 – 145, 1996.
- PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 25–33, 2000.

- PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, C. S.; DUSSAP, C-G; GNANSOUNOU, E. *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes*. 1st ed. Oxford: Elsevier, 2011.
- PARAJÓ, J.C.; GARROTE, G.; CRUZ, J.M. & DOMÍNGUEZ, H. Production xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends Food Sci. Technol.*, 15:115-120, 2004.
- PAËS, G.; BERRIN, J-G. & BEAUGRAND, J. “GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications”. *Biotechnology Advances*, 30, 564–592, 2012.
- PEDROCHE, J.; JUST, M.M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GIÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUISÁN, J.M. & MILLÁN, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports. Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Technol.*, 40:1161–1167, 2007.
- PEIXOTO, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int Microbiol*, 6:269-273, 2003.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; BETINI, J.H.A.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Production of xylanase by Aspergilli using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp Biobleaching. *J Ind Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s10295-008-0482-y, 2008.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; SANDRIM, V.C.; GUIMARÃES, L.H.S.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. *Bioprocess Biosyst Eng*, 31:329–334, 2009.
- PELCZAR, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi. fruit bodies. and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1997.
- PEREIRA, H.; GRACA, J.; RODRIGUES, J.C. Wood chemistry in relation to quality. In: Barnett, J.R., Jeronimidis, G. (Ed.), *Wood Quality and Its Biological Basis*. Blackwell Publishing, Oxford, p. 53-86, 2003.
- PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, n. 4, p. 928-939, 2015.
- PEREIRA, T. N. Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium* sp: isolated from Eastern Nigerian soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, n. 4, p. 649- 658, 2017.
- PERVEZ, S., AMAN, A., IQBAL, S. SIDDIQUI, N. N., QADER, S. A. Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amylolytic enzymes by double fermentation process. *BMC Biotechnology*, v. 14, p. 49, 2014.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl*

Microbiol Biotechnol, v. 67, p. 577-591, 2005.

PRÜCKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HÖLTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. LWT - Food Science and Technology, v. 56, n. 2, p. 211-221, 2014.

PUCHART, V. & BIELY, P. A simple enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl- $\beta$ -1,4-Dxylobioside, a chromogenic substrate for assay and differentiation of endoxylanases. J. Biotechnol., 128:576-586, 2007.

PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses, relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis. In: Couglan MP, Hazlewood GP (ed) Hemicelluloses and hemicellulases. Portland Press, London, p. 1-27, 1993.

PUNT, U., MOSER, M.M., THOMAS, K.A., MANIMOHAN, P. First records of ectomycorrhizal *Cortinarius* species (*Agaricales*, *Basidiomycetes*) from tropical India and their phylogenetic position based on rDNA ITS sequences. Mycological research, Amsterdam, v.107, p.485-494, 2002.

PURI, J. D.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Improving the performance of enzymes in hydrolysis of high solids paper pulp derived from MSW. Biotechnology for Biofuels, v. 6, 2013.

PURKARTHOFFER, H., SINNER, M., STEINER, W. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. Enzyme Microb. Technol. 15 (8), 677–682, 1993.

QI, B.; CHEN, X.; SU, Y.; WAN, Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. Bioresource Technology, v. 102, n. 3, p. 2881-2889, 2011.

RASMUSSEN, L.E.; SORENSEN, H.R.; VIND, J.; VIKSO-NIELSEN, A. Mode of action and properties of the  $\beta$ -xylosidase from *Talaromyces emersonni* and *Trichoderma reesei*. Biotechnol Bioeng. v.94, p. 869-876, 2006.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A. de; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R. de; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. Biotechnology for Biofuels, v. 4, n. 54, p. 1-18, 2011.

RIDDER, E.R., NOKES, S.E.; KNUTSON, B.L. Optimization of Solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. American Society of Agricultural Engineers, 42(6): 1785 – 1790, 1999.

RIZZATTI, A.C.S.; FREITAS, F.Z.; BERTOLINI, M.C.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. J Ind Microbiol Biotechnol, 35:237–244, 2004.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -Dxylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. J Ind Microbiol Biotechnol, 26:156-160, 2001.

ROBL, D.; DELABONA, P. D S.; COSTA, P. D S.; DEISE LIMA, J. D S.; RABELO, S. C.; PIMENTEL, I. C.; BÜCHLI, F.; SQUINA, F. M.; PADILLA, G.; PRADELLA, J. G. D

C.

Xylanase production by endophytic *Aspergillus niger* using pentose-rich hydrothermal liquor from sugarcane bagasse. *Biocatalysis and Biotransformation*, p. 1-13, 2015.

ROCHA, E. G. de A.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A., DUVOISIN JR, S.; AZNAR. M. Liquid-liquid equilibria for ternary systems containing ethylic palm oil biodiesel + ethanol + glycerol/water: Experimental data at 298.15 and 323.15 K and thermodynamic modeling. *Fuel*, v. 128, p. 356, 2014.

ROJAS-REJÓN, O. A.; POGGI-VARALDO, H. M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, A.; CRISTIANI-URBINA, E.; DE LA TORRE MARTÍNEZ, M.; PONCE-NOYOLA, T. Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 257-264, 2011.

ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; ALONSO, J. L.; PARAJÓ, J. C. Experimental assessment on the enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood. *Industrial Engineering Chemical Resource*, v. 49, p. 4653-4663, 2010.

ROON, R.J., LARIMORE, F., LEVY, J. Inhibition of amino acid transport by ammonium ion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 124 (1), 325-331, 1975.

ROYER, J., NAKAS, J. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb. Technol.* 11 (7), 405-410, 1989.

RYABOVA, O.; VRSANSKA, M.; KANEKO, S.; VAN ZYL, W.H.; BIELY, P. A novel family of hemicellulolytic  $\alpha$ -glucuronidase. *FEBS Lett.* v. 583, n. 9, p. 1457-1462, 2009.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnology Progress*, v. 21, n. 3, p. 816-822, 2003.

SAID, S. & PIETRO, R. *Enzimas COMO AGENTES BIOTECNOLÓGICOS*. Primeira edição. Editora Legis Summa, 2004.

SAID, S. & PIETRO, R. *Enzimas de interesse industrial e biotecnológico*. Primeira edição. Editora Eventos, 2002.

SAMAPUNDO, S., DEVLIEGHERE, F., DE MEULENAER, B., LAMBONI, Y., OSEI-NIMOH, D., DEBEVERE, J. Interaction of water activity and bicarbonate salts in the inhibition of growth and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species of importance to corn. *Int. J. Food Microbiol.* 116 (2), 266-274, 2007.

SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185-94, 2009.

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

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K. Application of *Aspergillus fumigatus* xylanase for quality improvement of waste paper pulp. *Bull Environ Cotam Toxicol*, 78:217-221, 2007.

SHELLER, H.V. & ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 61(1):263-

289, 2010.

SEDLMEYER, F. L. Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi. *Hoehnea*, v. 45, n. 1, p. 134-142, 2011.

SENTHILKUMAR, S.R.; ASHOKKUMAR, B; CHANDRA, R.K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. *Bioresour Technol*, 96(12):1380-6, 2005.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 5, p. 1763-1771, 2005.

SHULER, K., KARGI, O. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17,39–67, 2002.

SIDRIM, M. & MOREIRA, L. Occurrence of spores of thermophilic fungi in the air at Bombay. *Mycologia* 69(1):197–199, 1999.

SIPOS, B. et al. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* RUT C30 on different carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161: 347-364, 2010.

SOBRAL, F. M.; BRUNI, A. T.; DEL BIANCHI, V. L. Performance of an anaerobic baffled reactor (ABR) in treatment of cassava wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, n.1, p.48-53, 2017.

SORENSEN, J.F. Novel tailor-made xylanases: their characterisation, performance in cereal processing and use as a tool to understand xylanase functionality in baking, in: Courtin, C.M., Veraverbeke, W.S., Delcour, J.A. (Eds.), *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing*. Laboratory of Food Chemistry. Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, p. 241–245, 2003.

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

STICKLEN, A. R.; MACH, R. L.; GRAAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulase-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 78, p. 211-220, 2008.

SU, YISHAN., XIAOYUAN ZHANG., ZHONGWEN HOU., XIQIANG ZHU., XUEPING GUO., PEIXUE LING. Improvement of xylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 using response surface methodology. Elsevier B.V. All rights, 2011.

SUBRAMANIYAN, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M. & WANG, X. “Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering”. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), 2002.

SUN, X., LIU, Z., QU, Y., LI, X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2, 239–248, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a

review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1–11, 2002.

SUNNA & ANTRANIKIAN.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, p. 637–644, 1997.

SUZUKI, T.; TSUDA, Y.; KANO, N.; INOUE, T.; KUMAZAKI, K.; NAGANO, S.; HIRAI, S.; TANAKA, K.; WATANABE K. *Bifidobacterium adolescentis* complete genome sequence. NCBI Database, 2006.

TAKAHASHI, Y.; KAWABATA, H.; MURAKAMI, S. Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. *Springerplus*, v. 2, n. 447, 2017.

TAKAMI, H.; MUGURUMA, M.; AND OHTA, K. Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.70, p. 202-211, 1999.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4744–4753, 2010.

TAYLOR JW, BERBEE ML,. Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* 98:838–849, 1978.

TAYLOR, J. W. One fungus = one name: DNA and fungal nomenclature 20 years after PCR. *IMA Fungus* 2(2):113–120. doi:10.5598/imafungus.2011.02.02.01, 2011.

TECHAPUN, M., PULS, J., POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* 14 (7), 566–574, 2003.

TEDERSON, L. TOOMING-KLUNDERUD A, ANSLAN S. PacBio metabarcoding of fungi and other eukaryotes: biases and perspectives. *New Phytol* 217:1370–1385, 2018.

TENKANEN, M.; POUTANEN, K. Significance of esterases in the degradation of xylans. In *Xylans and Xylanases*; Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M.A., Voragen, A.G.J. Elsevier: New York, p. 203–212, 1992.

TERRASAN, C.R., TEMER, B., DUARTE, M.C., CARMONA, E.C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresour. Technol.* 101 (11), 4139–4143, 2010.

TERRONE, C. C. Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção em um resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

TREVISAN, C.R.F., TEMER, B., SARTO, C., SILVA, F.G., CARMONA, E.C. Xylanase and  $\beta$ -Xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Production, Physico-chemical Properties, and Application of the Crude Extract to Pulp Biobleaching. *Bioresources.*, v.8, n.1, p.1292–1305, 2004.

VAN ZYL, W.H.; LYND, L.R.; DEN HAAN, R.; MCBRIDE, J.E. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* v.108, p. 205–235, 2007.

VOGEL, H.F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications.

Am.Nat., v. 98, p. 435-446, 1964.

WAKAI, S.; ARAZOE, T., OGINO, C., KONDO, A.. Future insights in fungal metabolic engineering. *Bioresource technology*, v.245, p.1314-1326, 2017.

WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. An extracellular endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. *J Biosci Bioeng.* v.109, p.227-229, 2010.

WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. Trichoderma xylanases: Their properties and application. In: *Xylans and Xylanases* (Visser, J., Beldman, G., Someren, M.A.K. and Voragen, A.G.J., Eds.), Elsevier, Amsterdam. p. 171-186, 1992.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications – 317, 1988.

WOODWARD, J. Xylanases: Functions, Properties and Applications. In: *Introduction to Topics in Enzyme and Fermentation Biiotechnology*, Cap. 2:9 – 30, 1984.

XU, J. K.; SUN, R. C. Recent Advances in Alkaline Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: *MUSSATTO, S. I. Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Netherlands: Elsevier. p 674, 2008.

YAN, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 2, 26–40, 2008.

YANG, Y.; ZHANG, W.; HUANG, J.; LIN, L.; LIAN, H.; LU, Y.; WU, J.; WANG, S. Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. *African Journal of Microbiology*, v. 4, n. 21, p. 2249-2256, 2006.

ZHANG, J.P. TUOMAINEN, M. SIIKA-AHO, AND L. VIIKARI. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. *Biores. Technology*, 2010.

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

ZHANG, Z.; O'HARA, . . ; DOHERTY, . O. S. Pretreatment of sugarcane bagasse by acid-catalysed process in aqueous ionic liquid solutions. *Bioresource Technology*, v. 120, p. 149-56, 2011.

ZHOU, C. Y.; BAI, H. Y.; DENG, S. S.; WANG, J.; ZHU, J.; WU, M. C., & WANG, W. "Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usarii* and its expression in *Escherichia coli*". *Bioresour Technol* , 99: 831-838, 2008.

ZHOU, J.; GAO, Y.; DONG, Y.; TANG, X.; LI, J.; XU, B.; MU, Y.; WU, Q.; HUANG, Z. 0. A novel xylanase with tolerance to ethanol, salt, protease, SDS, heat, and alkali from actinomycete *Lechevalieria* sp. HJ3. *J Ind Microbiol Biotechnol.* v.39, n.7, p.965-75, 2012.

ZIMBARDI, A. L.; SEHN, C.; MELEIRO, L. P.; SOUZA, F. H.; MASUI, D. C.; NOZAWA, M. S.; GUIMARÃES, L. H.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. Optimization of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 2, p. 2875-2902, 2013.