

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

ANA CAROLINA DA COSTA

**PRODUÇÃO DE XILANASE EM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PELO FUNGO
Thermoascus aurantiacus COM REDUZIDA ATIVIDADE DE CELULASE**

Dourados

2013

ANA CAROLINA DA COSTA

PRODUÇÃO DE XILANASE EM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PELO FUNGO
Thermoascus aurantiacus **COM REDUZIDA ATIVIDADE DE CELULASE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de
Biotecnologia – Faculdade de
Ciências Biológicas e Ambientais
– Universidade Federal da Grande
Dourados, sob orientação do Prof.
Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

Dourados
2013

Ana Carolina da Costa

PRODUÇÃO DE XILANASE EM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PELO FUNGO
***Thermoascus aurantiacus* COM REDUZIDA ATIVIDADE DE CELULASE**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
FCBA-UFGD

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
FCBA - UFGD

Prof^a.Dr^a Gisele Jane De Jesus
FCBA - UFGD

Dourados, 19 de agosto de 2013.

Dedico:

Aos meus pais, Marco e Yukari,
que sempre acreditaram em mim
e me deram todo o apoio para
a conclusão deste trabalho.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."
Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter iluminado sempre meus caminhos, ter me concedido saúde e paz para conduzir este trabalho.

Aos meus pais, Marco e Yukari, pelo amor e apoio sempre.

Aos meus irmãos, Monique e João Vítor, pelo carinho e pela amizade.

A minha família que sempre que precisei esteve me apoiando e me orientando.

Ao Gabriel que sempre acreditou em mim e me deu forças para seguir em frente.

Aos meus amigos queridos que sempre me alegraram e me deram força, principalmente a Marcela, Tales, Bruna, André e Alexandre.

Ao pessoal do laboratório, principalmente Nayara, Flavia, Maria Alice (in memoriam) e Rodrigo que estiveram dia a dia ao meu lado e que contribuíram na realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite pela confiança, orientação e aprendizagem durante todo o período do curso de biotecnologia.

Agradeço ao professor Dr. Marcelo Fossa da Paz e a professora Dr^a. Gisele Jane de Jesus por aceitarem participar da banca examinadora do meu TCC.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais pela ajuda e disponibilidade.

E a todos que de alguma maneira me ajudaram na realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

A aplicabilidade industrial de uma enzima está intimamente relacionada com o seu custo de produção e as características da mesma. Atualmente, o cultivo de microrganismos em estado sólido vem sendo aplicado na obtenção de diversos produtos de interesse comercial devido à utilização de resíduos agroindustriais como substratos, proporcionando uma redução do custo de produção. Os subprodutos da agroindústria são ricos em polissacarídeos vegetais, podendo ser utilizados como meios de cultura para produção de diferentes enzimas industriais, tais como: celulasas, xilanases, ligninases, pectinases e amilases. No presente trabalho, diferentes parâmetros de cultivo foram avaliados para produção de xilanase pelo fungo filamentoso termofílico *Thermoascus aurantiacus* isolado da região de Dourados-MS. A melhor produção da enzima foi obtida no cultivo em farelo de trigo com 65% de umidade inicial, após 120 horas a 45°C, atingindo cerca de 1701,9 U/g de xilanase.

Palavras-chave: 1) Resíduos Agroindustriais 2) Xilanase 3) Cultivo em Estado Sólido

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	1
1) INTRODUÇÃO	1
2) MATERIAL E MÉTODOS	2
2.1) Microrganismo	2
2.2) Preparo dos substratos	3
2.3) Processo de Cultivo em Estado Sólido	3
2.4) Extração das enzimas	3
2.5) Determinação de atividades enzimáticas	3
3) RESULTADOS E DISCUSSÃO	4
3.1) Seleção do substrato para produção de xilanase	4
3.2) Temperatura de cultivo	5
3.3) Variação da umidade inicial do meio de cultivo	6
3.4) Tempo de cultivo	7
3.5) Caracterização do potencial catalítico do extrato enzimático	9
4) CONCLUSÃO	9
5) REFERÊNCIAS	10

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de xilanase por cultivo em estado sólido do fungo *Thermoascus aurantiacus* em diferentes resíduos agroindustriais contendo 70% de umidade, por 96 horas a 50°C.

Tabela 2 – Potencial catalítico do extrato enzimático obtido nas condições de cultivo previamente determinadas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produção de xilanase em diferentes temperaturas por cultivo em estado sólido em farelo de trigo, contendo 70% de umidade, por 96 horas.

Figura 2 - Produção de xilanase em farelo de trigo com diferentes valores de umidade inicial, por 96 horas a 45°C.

Figura 3 - Produção de xilanase em diferentes tempos de cultivo a 45°C, em farelo de trigo contendo 65% de umidade inicial.

Figura 4 - Otimização dos parâmetros de cultivo, evolução do processo.

1) INTRODUÇÃO

Disposta entre a celulose e a lignina nas paredes celulares das plantas, a hemicelulose é um dos polissacarídeos mais abundantes encontrados na natureza correspondendo a cerca de 30% do peso seco da parede celular vegetal. Seu principal constituinte é a xilana, que consiste de um polissacarídeo formado por monômeros de xilose unidos por ligações glicosídicas (β -1,4), podendo apresentar ramificações com glicose, arabinose, manose, galactose e ácido galacturônico (ALVES-PRADO et al., 2010; RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2002).

As xilanases são enzimas responsáveis pela hidrólise das ligações β -1,4 da xilana, liberando mono e oligossacarídeos de xilose, dessa forma, reduzem o grau de polimerização da cadeia principal da hemicelulose (SARASWAT e BISARIA, 1997; MACIEL, 2006).

Estas enzimas podem ser aplicadas em diversos seguimentos industriais, tais como: na indústria alimentícia, ração animal e biocombustível. No entanto, sua principal aplicação industrial esta na produção de papel e celulose. A hemicelulose faz a ligação da lignina com as fibras de celulose. As xilanases desestruturam a organização polimérica da parede celular vegetal facilitando a remoção da lignina pelo cloro, reduzindo a quantidade de agentes químicos necessários para o branqueamento da polpa de celulose, o que minimiza a contaminação ambiental por compostos organoclorados (BOTELLA et al., 2007; BECKER et al., 2009).

Por meio de técnicas biotecnológicas é possível produzir uma série de metabólitos de interesse industrial, inclusive enzimas. Para obtenção desses metabólitos secundários, destaca-se o Cultivo em Estado Sólido (CES), que utiliza diversos tipos de resíduos como substratos para o cultivo microbiano, visando a obtenção de produtos de elevado valor agregado (MACIEL, 2006). Um meio de cultivo deve proporcionar nutrientes necessários ao crescimento do microrganismo e conseqüentemente à produção do metabólito de interesse. A composição de um meio de cultura é basicamente: fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais orgânicos e vitaminas (PINHEIRO, 2006). O uso de resíduos agroindustriais para produção de enzimas tem despertado interesse na comunidade científica, já que são considerados os melhores substratos para processos de Cultivo em Estado Sólido (BOCCHINI et al., 2011).

Os resíduos utilizados neste tipo de cultivo são gerados após o processamento industrial de produtos agrícolas, visando para obtenção de óleos, farinhas e açúcares. Esses resíduos são ricos em pectina, amido, celulose e hemicelulose (CASTRO e JUNIOR, 2010). O Cultivo em Estado Sólido é caracterizado pelo crescimento microbiano em matriz sólida na ausência de água livre, mas com umidade suficiente para sustentar todas as atividades

metabólicas do microrganismo. Este tipo de processo apresenta potencial para produção de enzimas extracelulares, tais como: pectinases, celulases, amilases e xilanases (SINGHANIA et al., 2009; NG et al., 2010).

Considerando que a utilização de xilana comercial como fonte de carbono para produção de xilanases apresenta alto custo, diferentes resíduos lignocelulósicos vem sendo utilizados como substratos para produção destas enzimas (REIS et al., 2003; CASTRO e JUNIOR, 2010). A produção de xilanases por CES possibilita sua utilização em escala industrial, tendo em vista que o aproveitamento de resíduos para produção de enzimas pode reduzir o custo final destes catalizadores (MACIEL, 2006).

A avaliação de diferentes parâmetros fermentativos para otimizar um processo de cultivo, resulta no aumento da velocidade de crescimento microbiano e da produção de enzimas. Para que altos rendimentos sejam obtidos é preciso aperfeiçoar importantes variáveis, como: fonte de nitrogênio, fonte de carbono, tempo, pH e temperatura (SANTOS e ISHII, 2011).

O ambiente hostil industrial em que algumas enzimas são submetidas impulsiona à triagem de enzimas extremófilas, com elevada estabilidade estrutural para atuar em condições extremas de temperatura, pH, força iônica e pressão (GOMES et al., 2010). Neste contexto, o presente trabalho avaliou os parâmetros de Cultivo em Estado Sólido do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* isolado da região de Dourados – MS, visando à otimização do processo fermentativo para a obtenção de um extrato enzimático com elevadas concentrações da enzima xilanase.

2) MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de enzimologia e processos fermentativos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais na Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados-MS.

2.1) Microrganismo

O fungo filamentoso utilizado no presente trabalho foi isolado de serapilheira de fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Atlântica (Mata do Azulão), localizada no município de Dourados – MS. O microrganismo foi identificado como *Thermoascus aurantiacus* pelo Professor Dr. André Rodrigues do IB/Unesp–Rio Claro-SP. A cepa utilizada no presente trabalho foi armazenada no laboratório de enzimologia e processos fermentativos

sendo mantido em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio ágar Sabouraud, a temperatura de 5°C, a cultura também foi conservada em óleo mineral sendo repicada anualmente para garantir sua viabilidade.

2.2) Preparo dos substratos

Diferentes resíduos agroindustriais foram testados para a produção das enzimas, tais como: farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, palha de milho, casca de arroz, bagaço de cana. Todos os resíduos foram lavados para retirada de açúcares fermentescíveis e posteriormente foram secos em estufa a 50°C por 48 horas.

2.3) Processo de Cultivo em Estado Sólido

Os cultivos ocorreram em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5g de substrato acrescido de solução nutriente (sulfato de amônia 0,1%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1% e nitrato de amônia 0,1%). O material foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. O inóculo foi preparado em 40 mL de meio Agar Sabouraud em erlenmeyer de 250 mL, mantidos por 72 horas a 45°C. Alguns parâmetros do processo fermentativo que influenciam a produção enzimática foram avaliados nesta etapa, com adaptações da metodologia já utilizada por Leite et al. em 2008, como: diferentes resíduos agroindustriais, umidade inicial do meio, temperatura do processo fermentativo e tempo de cultivo.

2.4) Extração das enzimas

A enzima foi extraída pela adição de 50 mL de água destilada nos frasco Erlenmeyer contendo os meios fermentados. Os frascos foram mantidos em agitação por 1 hora à 150 rpm, em seguida os meios foram filtrados e posteriormente centrifugados a 3.000 x g. O extrato enzimático, sobrenadante da centrifugação, foi utilizado para os ensaios enzimáticos (LEITE et al., 2008).

2.5) Determinação de atividades enzimáticas

A atividade de celulasas e xilanasas nos extratos enzimáticos foi determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados, posteriormente a realização dos ensaios enzimáticos, pelo método de DNS (3,5-ácido dinitrosalisílico) descrito por Miller (1959). Os substratos utilizados para quantificação das respectivas enzimas foram: carboximetilcelulose

(CMC) e xilana. A atividade de β -glicosidase e β -xilosidase foi determinada utilizando os respectivos substratos aril-glicosídeos: p-NP- β -D-glicopiranosídeo e p-NP- β -D-xilopiranosídeo (LEITE et al., 2008). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol dos respectivos produtos por minuto de reação.

3) RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1) Seleção do substrato para produção de xilanase

A maior produção de xilanase foi obtida no cultivo em farelo de trigo, atingindo cerca de 909U/g (90,9U/mL) de xilanase. O fungo também apresentou considerável produção da enzima quando cultivado em sabugo de milho, cerca de 519U/g (51,9 U/mL) de xilanase, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Produção de xilanase por cultivo em estado sólido do fungo *Thermoascus aurantiacus* em diferentes resíduos agroindustriais contendo 70% de umidade, por 96 horas a 50°C.

<i>Substrato</i>	<i>U/mL</i>	<i>U/g</i>
Farelo de Trigo	90,98	909,8
Sabugo de Milho	51,9	519
Farelo de Soja	29,64	296,4
Palha de Milho	24,86	248,6
Bagaço de Cana	14,28	142,8
Casca de Arroz	10,14	101,4

O farelo de trigo é um substrato com boa capacidade de absorção de água, sua composição já foi descrita por outros autores que também relatam o resíduo como bom substrato para cultivo em estado sólido. Por ser um resíduo agrícola e apresentar baixo valor agregado, pode contribuir para redução do custo de produção da enzima (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2002; DELABONA et al., 2012; RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2011).

Benedetti (2009) também cultivou em farelo de trigo o fungo *Theobroma grandiflorum* e obteve boa produção de xilanase neste resíduo. Ruegger e Tauke-tornisielo (2002) cultivaram os fungos *Trichoderma viride* e *Chalara paradoxa* em farelo de trigo por

quatro dias, obtendo respectivamente 536,4U/g e 490,8 U/g de atividade enzimática, valores próximos ao cultivo realizado em sabugo de milho neste trabalho.

A produção de enzimas microbianas é dependente da composição e natureza do substrato, outros fatores relacionados à composição química da matéria prima também influenciam diretamente na produção enzimática no CES, como: acessibilidade e suscetibilidade de vários nutrientes (SANTOS, 2011).

3.2) Temperatura de cultivo

A temperatura ótima para produção de xilanase pelo cultivo do microrganismo em farelo de trigo foi determinada pela variação da temperatura de incubação e fixação dos demais parâmetros fermentativos. Dentre os valores de temperatura avaliados, o fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou maior produção da enzima, aproximadamente 1301,1U/g (130,11U/mL), quando cultivado a 45°C (Figura 1). Apesar da maior produção da enzima ter sido obtida a 45°C, foi evidenciado produção de xilanase e crescimento fúngico até 55°C, comprovando a termofilia do microrganismo.

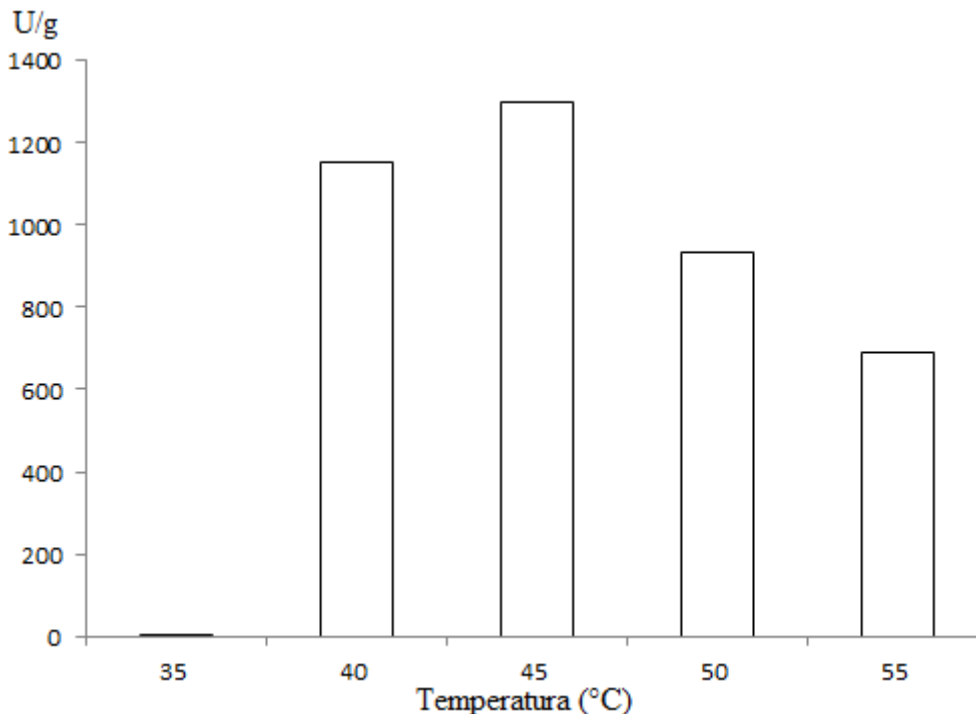


Figura 1 - Produção de xilanase em diferentes temperaturas por cultivo em estado sólido em farelo de trigo, contendo 70% de umidade, por 96 horas.

A temperatura é um fator que influencia diretamente as funções das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. A existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção de microrganismos que requerem altas temperaturas para sobreviver. Esses microrganismos são chamados termófilos. Poucas espécies de eucariotos conseguem crescer entre 45°C e 55°C, dentre 50.000 espécies de fungos descritas, cerca de 30 espécies crescem em temperaturas entre 40 e 45°C (BENEDETTI, 2009).

Quando o organismo produtor de enzimas requer altas temperaturas para se desenvolver, geralmente suas enzimas serão termoestáveis. A termoestabilidade é essencial para certas aplicações industriais que ocorrem em temperaturas elevadas (WU et al., 2008). Trabalhos anteriores visam a aplicação de xilanases termoestáveis em indústrias de panificação, papel e celulose (JIANG et al., 2008; SANTOS e ISHII, 2011).

3.3) Variação da umidade inicial do meio de cultivo

Nos cultivos realizados com o fungo *Thermoascus aurantiacus* em farelo de trigo a umidade inicial do meio foi variada de 50 a 70%, obtendo como melhor resultado 1467 U/g (146,7 U/mL) de xilanase, no cultivo com umidade inicial de 65% (Figura 2).

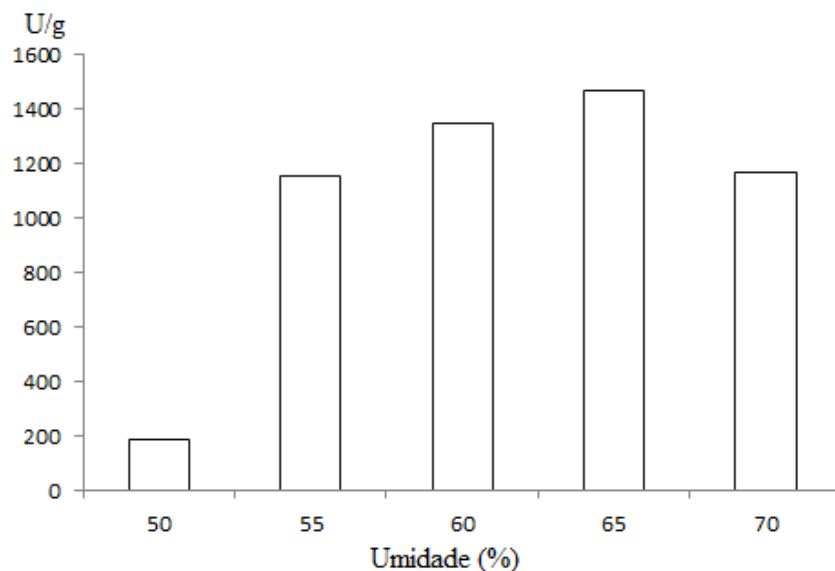


Figura 2 - Produção de xilanase em farelo de trigo com diferentes valores de umidade inicial, por 96 horas a 45°C.

Almeida (2012) cultivou em farelo de trigo o fungo *Trichoderma reesei* com diferentes umidades iniciais e encontrou maior produção de xilanase, cerca de 1021,70 U/g, no cultivo contendo 70% de umidade. Maciel (2006) cultivou o fungo *Aspergillus niger* em

farelo de trigo acrescido de xilana com umidade inicial de 60%, obtendo 724 U/g de atividade enzimática.

A umidade presente no cultivo em estado sólido deve ser suficiente para o desenvolvimento do microrganismo, porém não deve destruir a estrutura sólida ou reduzir a porosidade do substrato utilizado, elevadas umidades favorecem a contaminação bacteriana e diminuem a porosidade da matriz sólida do meio, comprometendo a difusão de oxigênio (MACIEL, 2006).

3.4) Tempo de cultivo

Para determinar o tempo de cultivo ideal para produção da enzima, amostras foram retiradas a cada 24 horas, em um total de 168 horas de cultivo. A maior produção de xilanase foi obtida após 120 horas, tendo como atividade 1701,9U/g (170,19U/mL). Posteriormente a esse período foi possível observar uma significativa queda na atividade de xilanase presentes nos extratos (Figura 3).

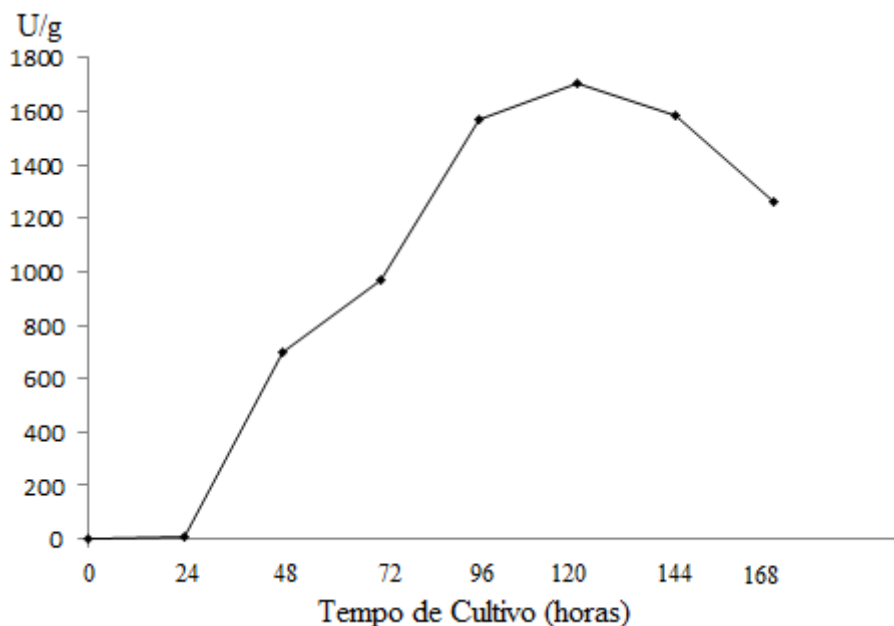


Figura 3 - Produção de xilanase em diferentes tempos de cultivo a 45°C, em farelo de trigo contendo 65% de umidade inicial.

Após o ajuste dos parâmetros de cultivo, a produção de xilanase pelo microrganismo foi aumentada em quase 90% da inicial, considerando que nos primeiros cultivos foram obtidos cerca de 900 U/g (90U/mL). Outro ponto que merece destaque no presente trabalho é a expressiva produção de xilanase pelo fungo com reduzido tempo de cultivo, ficando

evidente quando comparado com outras linhagens. Delabona et al. (2012) cultivaram os fungos *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma polysporum* em farelo de trigo e obtiveram a melhor produção após 144 horas, com respectivamente 319U/g e 226,2U/g de xilanase. Toth et al. (2013) cultivaram por 120 horas o fungo *Trichoderma reesei* em palha de trigo e obtiveram 23,93 U/mL como melhor resultado neste resíduo. A maior produção de xilanase (1079 U/g) obtida por Bakri et al. (2008) foi em palha de trigo, após 192 horas de incubação.

Segundo Monteiro e Silva (2009) umas das principais vantagens na utilização de enzimas de origem microbiana é o reduzido tempo de produção, principalmente se comparado com as de origem animal e vegetal. Dessa forma, é possível inferir que a linhagem de *Thermoascus aurantiacus*, recentemente isolada da região de Dourados-MS, apresenta expressivo potencial para produção de xilanase em meios de baixo valor agregado (resíduos agroindustriais). Trabalhos anteriores confirmam o potencial para produção de xilanase por diferentes linhagens da mesma espécie, isoladas de regiões e países distintos (DA-SILVA et al., 2005; KALOGERIS et al., 1998; BRIENZO et al., 2012).

3.5) Otimização da produção enzimática

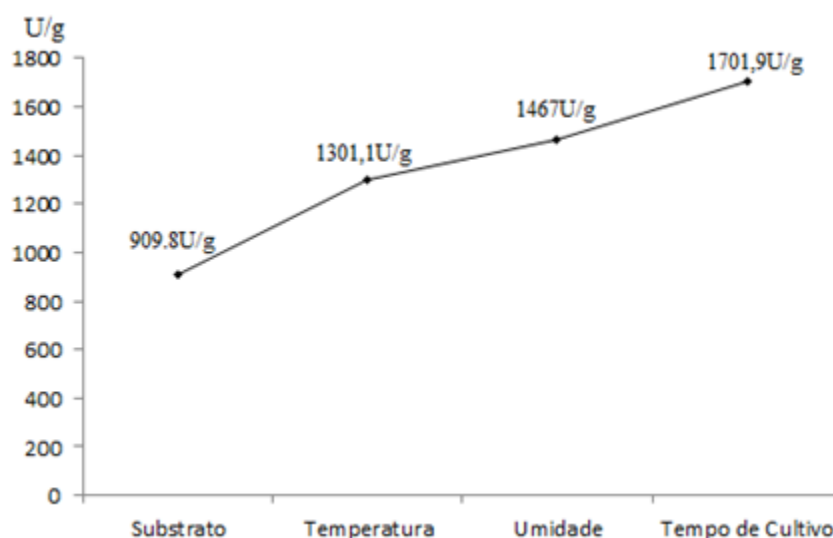


Figura 4 - Otimização dos parâmetros de cultivo, evolução do processo.

Deve-se destacar o aumento na produção enzimática à medida que os parâmetros do processo de cultivo foram sendo otimizados. Ao fim dos experimentos observa-se que houve ganho em 792,1 U/g de atividade enzimática, representando um aumento de cerca de 87% da produção.

3.5) Caracterização do potencial catalítico do extrato enzimático

Dentre todas as enzimas avaliadas, a atividade de xilanase foi a mais expressiva (Tabela 2). Esta enzima tem se mostrado bastante favorável aos processos de branqueamento de polpas de celulose, proporcionando uma redução de 20 a 30% no uso de produtos clorados (DURAN et al., 2008).

Tabela 2 – Potencial catalítico do extrato enzimático obtido nas condições de cultivo previamente determinadas.

<i>Enzima</i>	<i>CMCase</i>	<i>β-glicosidase</i>	<i>β-xilosidase</i>	<i>FPase</i>	<i>Xilanase</i>
U/mL	3,8	3,5	0,09	0,82	170,19

Extratos enzimáticos utilizados para o branqueamento de polpa de celulose, necessitam de elevadas concentrações de xilanase, porém este deve estar livre de celulasas (DA-SILVA et al., 2005). Esta característica dificulta a produção de xilanase a partir de cultivos em resíduos agroindustriais complexos, que induzem a produção de diferentes enzimas, especialmente celulasas. Trabalhos anteriores relatam o fungo *Thermoascus aurantiacus* como um dos maiores produtores de celulasas e hemicelulasas descritos na literatura, principalmente quando cultivado em derivados de trigo (DA-SILVA et al., 2005; KALOGERIS et al., 2003; PARRY et al., 2001), inviabilizando a aplicação de seu extrato enzimático em processos de biopolpação. Considerando que a purificação de extratos enzimáticos para aplicação em escala industrial é economicamente inviável, sendo necessário a utilização de complexos enzimáticos minimamente processados (BENEDETTI, 2009).

No entanto, a linhagem isolada pelo nosso grupo de pesquisa não apresentou potencial para produção de celulasas em quantidades significativas, CMCase (3,8U/mL). Essa característica fica ainda mais evidente quando o extrato enzimático foi adicionado em papel de filtro e praticamente não foi evidenciado a liberação de açúcares redutores, FPase (0,82U/mL). Dessa forma, é possível inferir que extrato enzimático obtido a partir do cultivo do microrganismo, nas condições descritas anteriormente, apresenta aplicabilidade em processos de biopolpação.

4) CONCLUSÃO

A maior produção de xilanase pelo fungo *T. aurantiacus* foi obtida pelo cultivo em farelo de trigo contendo 65% de umidade após 120 horas a 45°C. As características catalíticas do extrato enzimático obtido no presente trabalho, estimulam sua aplicação em processos de biopolpação em indústrias de papel e celulose, devido a baixa produção de celulasas pelo

fungo nessas condições de cultivo, além da elevada concentração de xilanases obtida no último extrato enzimático, onde a produção foi elevada a cerca de 87% quando comparada a produção inicial.

5) REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.C.O. *Indução de celulases e xilanases por Trichoderma reesei e Penicillium variabile em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos*, 2012. Tese (Mestrado em Engenharia Química). Setor de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos. Florianópolis.

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

BAKRI, Y.; JAWHAR, M.; ARABI, M.I.E. improvement of xylanase production by *Cochliobolus sativus* in solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p.602-604, 2008.

BECKER, N.B.; BARATTO, C.M.; GELINSKI, J.M.L.N. Properties of commercial α -amylase and xylanase enzymes and its influence on the dough rheology and quality of form bread. *Evidência*, v.9, p. 67-82, 2009.

BENEDETTI, A.C.E.P. *Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase*, 2009. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. Araraquara.

BOCCHINI, D.A.; ALVES-PRADO, H. F.; LEITE, R.S.R.; FERREIRA, H.; MORETTI, M.M.S.; DA-SILVA, R.; GOMES, E. Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. *Integrated Waste Management*, v. 2, p. 319-360, 2011.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; DE ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 98-101, 2007.

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

CASTRO, A.M.; JR PEREIRA, N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. *Química Nova*, v.33, p.181-188, 2010.

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

DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 243-250, 2012.

DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; FILHO, E.X.F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BOM, E.P.S. (Org.). *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2008. p. 205-239.

GOMES, E.; MORETTI, M.M.S; BIOCCHINI-MARTINS, D.A. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi and production of cellulases and xylanase by solid state fermentation. *Journal of Biotechnology*, v.150, p.172-172, 2010.

JIANG, Z.; BAIL, A. L.; WU, A. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. *Journal of Cereal Science*, v. 47, p. 172-179, 2008.

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

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

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

MACIEL, G.M. *Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja* 2006. Tese (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*, v. 3, p. 9-23, 2009.

NG, I.-S.; LI, C.-W; CHAN, S.-P.; CHIR, J.-L.; CHEN, P.T.; TONG,C.-G.;YU, S.-M.; HO,T.-H.D. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-S by solid state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, v.101, p. 1310-1317, 2010.

PARRY, N. J.; BEEVER, D.E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemistry Journal*, v. 353, p. 117-127, 2001.

PINHEIRO, T.L.F. *Produção de lípases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando Penicillium verrucosum como microrganismo* 2006. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim.

REIS,S.D.; COSTA, M.A.F.; PERALTA, R.M. Xylanase production by wild strain of *Aspergillus nidulans*. *Biological Sciences*, v.25.p.221-225, 2003.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.46. p.912-919, 2011.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Xylanase production by filamentous fungi isolated from soil of the ecological station of Juréia-Itatins, SP, Brazil. *Holos Environment*, v.2.p.185-194, 2002.

SANTOS, F. R. S.; GARCIA, N. F. L.; GANCALVES, F. A.; PAZ, M. F ; FONSECA, G. G ; LEITE, R. S. R. . Produção de β -glicosidase pelo Fungo Filamentoso *Lichtheimia ramosa* por Bioprocesso em Estado Sólido. In: XVIII - Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2011, Caxias do Sul - RS. Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2011.

SANTOS, L.F. dos; ISHII, P.L. Xilanases: Principais metodologias e parâmetros cinéticos. *Journal of biotechnology and biodiversity*, v.2.p.7-15, 2011.

SARASWAT, V.; BISARIA, V.S. Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanconium albomyces* IIS 68. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.83. p.352-357, 1997.

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

TOTH, K.; GOOL, M.P.V.; SCHOLS, H.A.; SAMUELS, G.J.; GRUPPEN, H.; SZAKACS, G. Diversity in Production of Xylan-Degrading Enzymes Among Species Belonging to the *Trichoderma* Section *Longibrachiatum*. *Bioenergy Resource*, v. 6, p. 631–643, 2013.

WU, H.; PEI, J.; WU, G.; SHAO, W. Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 230-234, 2008.