

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIELA TOTINO ULIAN

**PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO *Thermomyces
lanuginosus* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dourados-MS

2016

Gabriela Totino Ulian

Produção de celulases e hemicelulases por fermentação em estado sólido do fungo *Thermomyces lanuginosus* em resíduos agroindustriais

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados-MS

2016

GABRIELA TOTINO ULIAN

PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO *Thermomyces*
lanuginosus EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado a Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados como requisito
parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biotecnologia.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Fossa da Paz

Gisele Jane de Jesus

Rodrigo Simões Ribeiro Leite - UFGD

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada;

Aos meus pais Kennedy Ulian e Denise Totino Ulian e a minha família que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida;

Ao meu namorado Jonathan Ribeiro pelo carinho, paciência e por me apoiar nos momentos de dificuldades;

A Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de fazer o curso;

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais; em especial aos técnicos dos laboratórios;

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite pelo empenho dedicado a elaboração deste trabalho, por transmitir seus conhecimentos, pelo incentivo e confiança;

Em especial, a Nayara Fernanda Lisboa Garcia, doutoranda que esteve comigo em todos os momentos de elaboração deste trabalho, pelo apoio, paciência e pelo carinho;

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	7
1 Introdução.....	8
2 Metodologia.....	8
3 Resultados e Discussão.....	9
3.1 Seleção de substratos para produção das enzimas.....	9
3.2 Produção de celulasas e hemicelulasas em função do tempo de cultivo.....	10
4 Conclusões.....	11
Referências.....	12

Índice de figuras:

Tabela 1: Produção de celulasas e hemicelulasas em diferentes substratos em FES pelo fungo *T. lanuginosus*, 96 horas de cultivo, contendo 70 % de umidade a 45°C.....9

Tabela 2: Produção de celulasas e hemicelulasas em farelo de trigo em FES por diversas linhagens fúngicas.....9

Figure 1(A,B): Produção de celulasas em função do tempo de cultivo pelo fungo *T. lanuginosus* em farelo de trigo, contendo 70% de umidade a 45°C. 10

Figure 2(C,D): Produção de hemicelulase em função do tempo de cultivo pelo fungo *T. lanuginosus* em farelo de trigo, contendo 70% de umidade a 45°C. 11

Produção de celulases e hemicelulases por fermentação em estado sólido do fungo *Thermomyces lanuginosus* em resíduos agroindustriais

Cellulases and hemicellulases production by solid state fermentation of the fungus *Thermomyces lanuginosus* in agro-industrial waste

Gabriela Totino Ulian, Nayara Fernanda Lisboa Garcia, Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - Universidade Federal da Grande Dourados – FCBA/UFGD. Rodovia Dourados / Itahum km 12, 79804-970, Dourados - MS
E-mail: gabriela.ulian@uol.com.br

Resumo

Muitas enzimas produzidas por fungos têm relevantes aplicações industriais. A produção enzimática por fermentação em estado sólido reduz o custo de produção e diminui os impactos ambientais causados por esses resíduos. O objetivo desse trabalho foi estudar a produção de celulases e hemicelulases do fungo *Thermomyces lanuginosus* por fermentação em estado sólido usando diferentes resíduos agroindustriais. Foram avaliados os substratos sólidos farelo de trigo, bagaço de cana, farelo de soja, casca de arroz, palha de milho e sabugo de milho e posteriormente o tempo de fermentação. O estudo das enzimas extracelulares mostrou que o fungo *T. lanuginosus* é mais xilanolítico do que celulolítico. A maior produção das enzimas foi obtida pelo cultivo do microrganismo em farelo de trigo, contendo 70% de umidade, a temperatura de 45°C, atingindo cerca de 21,1±0,1 U/g de substrato seco de CMCase em 96 h de cultivo, 117,1±2,5 U/g de substrato seco de β-glicosidase em 192 h, 218,0±5,8 U/g de substrato seco de xilanase em 144 h e 1,9 U/g de substrato seco de β-xilosidase em 96 h de cultivo. A utilização de resíduos agroindustriais e a otimização de parâmetros fermentativos é importante para futuras aplicações biotecnológicas do processo de produção enzimática.

Palavras-chave: fungo termófilo, enzimas industriais, bioprocesso em estado sólido.

Abstract

Many enzymes produced by fungi have significant industrial applications. The enzyme production by solid state fermentation reduces the production cost and decreases the environmental impact caused by such waste. The objective of this work was to study the production of cellulases and hemicellulases of *Thermomyces lanuginosus* fungus by solid state fermentation using different agro-industrial waste. We evaluated the solid substrates wheat bran, sugar cane bagasse, soybean meal, rice husk, corn straw and corncobs and then the fermentation time. The study showed that extracellular enzymes from the fungus *T. lanuginosus* is more than cellulolytic xylanolytic. The increased production of enzymes was obtained by the microorganism cultivation in wheat bran, containing 70% humidity, temperature 45 ° C, reaching about 21.1 ± 0.1 U / g dry substrate CMCase in 96 h of cultivation, 117.1 ± 2.5 U / g dry substrate β-glucosidase at 192 h 218.0 ± 5.8 U / g of xylanase dry substrate 144 h and 1.9 U / g dry substrate of β-xylosidase in 96 h of culture. The use of agricultural residues and optimization of fermentation parameters is important for future biotechnology applications of the enzyme production process.

Keywords : thermophilic fungus, industrial enzymes, bioprocess solid state.

1 Introdução

A habilidade em decompor a biomassa celulósica em glicose, a qual poderá ser convertida em produtos de valor agregado e energia, tem tornado as celulasas e hemicelulasas um dos sistemas enzimáticos multicomponentes mais investigados. Essas enzimas apresentam aplicabilidade na obtenção de etanol de segunda geração, estonagem e polimento de tecidos, formulações de detergentes domésticos e industriais, processamento de alimentos e bebidas, produção de ração animal (STROPARO et al., 2012).

Atualmente, apesar do processo enzimático de hidrólise ser considerado de grande potencialidade, este enfrenta vários problemas tecnológicos, sendo o custo de produção um dos mais avaliados. Dentre as alternativas existentes a fim de diminuir estes custos, está o emprego de resíduos agroindustriais, geralmente descartados pela indústria, o qual se mostra uma fonte riquíssima de substratos para aplicação neste processo (STROPARO et al., 2012). Ao fazer uso destes resíduos como meio de cultivo, a fermentação em estado sólido vem sendo apontada como tecnologia de grande potencialidade apresentando vantagens de ordem econômica quando utilizada para a produção de enzimas (SANTOS, 2012).

Ao mesmo tempo em que contribui para a diminuição dos custos de produção, devido à simplicidade do processo e à disponibilidade econômica da matéria-prima, contribui ecologicamente para diminuição e para a valorização dos resíduos, que muitas vezes não tem destino. Esse processo está sendo apontado como a alternativa mais viável para diminuir drasticamente o custo das celulasas (DILLON, 2004).

A produção de celulasas e hemicelulasas e sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos são tecnologias em fase de desenvolvimento, para as quais determinadas ferramentas e estratégias podem ser aplicadas visando seu aumento de produtividade e economicidade (CASTRO; PEREIRA-JR, 2010). Desse modo, o objetivo desse trabalho foi estudar a otimização da produção destas enzimas utilizando resíduos agroindustriais como substratos para Fermentação em Estado Sólido (FES) pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*.

2 Metodologia

Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentosso *Thermomyces lanuginosus* isolado de amostras de solo do cerrado e mantido em *Ágar Sabourad Dextrose*.

O fungo *T. lanuginosus* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio *Ágar Sabourad Dextrose* inclinado. Para a produção de esporos o fungo foi incubado por 48 h a 45°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio heptahidratado e 0,1% de nitrato de amônio). A inoculação do microrganismo nos substratos (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão.

A enzima foi produzida pelo cultivo do fungo em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato (farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, palha de milho, sabugo e milho e farelo de soja), a umidade foi ajustada para 70% com solução nutriente (anteriormente descrito). Todo o material foi previamente autoclavado por 20 minutos a 121°C e os experimentos foram realizados em duplicatas. O tempo de cultivo também foi variado para a determinação das condições ótimas de crescimento e produção das enzimas.

A extração da enzima dos resíduos fermentados foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada, mantidos em agitação de 100 rpm por 1 hora. A amostra foi filtrada e centrifugada a 1.500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi considerado extrato enzimático extracelular e utilizado nas etapas seguintes.

As atividades de CMCase e xilanase foram quantificadas utilizando respectivamente Carboximetilcelulose 3% (C5678 Sigma) e xilana 1% (Birch-Wood Sigma). O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (MILLER, 1959). As atividades de β -glicosidase e β -xilidase foram determinadas com 50 μ L de extrato enzimático, 250 μ L de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4 mM (pNP β G, Sigma) para β -glicosidase e p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo 4 mM (pNP β X Sigma) para β -xilidase, reagindo por 10 minutos à temperatura de 50°C.

A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2 M e o p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm (LEITE et al., 2007). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de produto por minuto de reação.

3 Resultados e Discussão

3.1 Seleção de substratos para produção das enzimas

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas por FES representa uma importante alternativa para redução de custos.

Desse modo, avaliou-se a viabilidade de seis diferentes resíduos produzidos em abundância no Brasil para a produção de celulases e hemicelulases pelo fungo *T. lanuginosus* por fermentação em estado sólido utilizando diferentes resíduos agroindustriais durante o período de 96 horas de cultivo onde a maior produção de celulases, 2,37 e 7,59 U/mL, e hemicelulases, 23,84 e 0,19 U/mL, foi obtida no cultivo realizado utilizando farelo de trigo como substrato (Tabela 1).

Tabela 1: Produção de celulases e hemicelulases em diferentes substratos em FES pelo fungo *T. lanuginosus*, 96 horas de cultivo, contendo 70% de umidade a 45°C.

Substratos	CMCase (U/g)/(U/ml) substrato	β -glicosidase (U/g)/(U/ml) substrato	Xilanase (U/g)/(U/ml) substrato	β -xilidase (U/g)/(U/ml) substrato
Farelo de trigo	23,7±0,45/2,37	75,9±0,5/7,59	238,4±3,8/23,84	1,9±0,00/0,19
Farelo de soja	11,2±0,65/1,12	28,6±0,4/2,86	34,5±0,5/3,45	0,2±0,00/0,02
Palha de milho	4,6±0,6/0,46	0,56±0,04/0,056	8,75±0,15/0,87	0,15±0,05/0,015
Casca de arroz	2,7±0,3/0,27	1,00±0,02/0,1	1,25±0,15/0,12	0,1±0,00/0,01
Bagaço de cana	2,1±0,1/0,21	0,34±0,01/0,034	6,6±0,4/0,6	0,1±0,00/0,01
Sabugo de milho	4,6±0,0/0,46	0,24±0,01/0,024	2,85±0,05/0,28	0,2±0,00/0,02

De acordo com Leite et al. (2008) o farelo de trigo é uma boa fonte de carbono e nitrogênio e é bastante utilizado como substrato para produção de celulases e hemicelulases por fermentação em estado sólido. Este consiste em um meio complexo, rico em proteínas, carboidratos, minerais, lipídeos e vitaminas, os quais são facilmente assimilados pelos microrganismos. O farelo de trigo tem maiores quantidades de macro e micronutrientes do que outros resíduos agroindustriais como o bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo e farelo de arroz (GONÇALVES et al., 2013).

Diversos trabalhos relatam o farelo de trigo como sendo um bom substrato para produção de celulases e hemicelulases. Em relação às celulases, a produção enzimática de CMCase obtida nos fungos *Thichoderma harzianum*, *Lichteimia ramosa*, *Lysinibacillus* sp, *Neosartorya spinosa* e *Chaetomium erraticum* cultivados em farelo de trigo foram respectivamente 1,64 U/mL, 2,13 U/mL, 0,43 U/mL, 0,11 U/mL e 0,04 U/mL (RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004; GONÇALVES et al., 2013; ALVES-PRADO et al., 2010; SONI; SONI, 2010). A produção de β -glicosidase nos fungos *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus* foram respectivamente 2,84 U/mL, 0,22 U/mL e 7,0 U/mL (SUKUMARAM et al., 2009; LEITE et al., 2008). O fungo *Aspergillus niger* J4 apresentou atividade enzimática xilanolítica de 2,23 U/mL em farelo de trigo (STROPARO, 2012). Os fungos *Lichteimia ramosa*, *Streptomyces C-248*, *Lysinibacillus* sp., *Aspergillus sydowwi* obtiveram atividades xilanolíticas de 2,41 U/mL, 4,48 U/mL, 5,40 U/mL e 1,10 U/mL respectivamente, todos foram cultivados em farelo de trigo (GONÇALVES et al., 2013; JOHNSON et al., 1988; ALVES-PRADO et al., 2010; GHOSH et al., 1993).

Tabela 2: Produção de celulases e hemicelulases em farelo de trigo em FES por diversas linhagens fúngicas.

Substrato	CMCase (U/ml substrato)	β -glicosidase (U/ml substrato)	Xilanase (U/ml substrato)
Farelo de trigo	<i>Thermomyces lanuginosus</i> 2,37 U/ml	<i>Thermomyces lanuginosus</i> 7,59 U/ml	<i>Thermomyces lanuginosus</i> 23,8 U/ml
	<i>Lichteimia ramosa</i> 2,13 U/ml	<i>Thermoascus aurantiacus</i> 7,0 U/ml	<i>Lysinibacillus</i> sp 5,4 U/ml
	<i>Trichoderma harzianum</i> 1,64 U/ml	<i>Aspergillus niger</i> 2,84 U/ml	<i>Streptomyces C-248</i> 4,48 U/ml
	<i>Lysinibacillus</i> so 0,43 U/ml	<i>Trichoderma reesei</i> 0,22 U/ml	<i>Lichteimia ramosa</i> 2,41 U/ml
	<i>Neosartorya spinosa</i> 0,11 U/ml		<i>Aspergillus niger</i> 2,23 U/ml
	<i>Chaetomium erraticum</i> 0,04 U/ml		<i>Aspergillus sydowwi</i> 1,10 U/ml

Percebe-se a alta taxa de produção da enzima xilanase em relação às demais. A presença de xilanases no complexo enzimático é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal. Esse grupo de polissacarídeos ramificados se liga firmemente entre si e a superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via ponte de hidrogênio, dificultando a ação das celulasas (FARINAS, 2008).

De uma forma geral, muitas espécies utilizam a xilana, a qual se caracteriza por ser uma porção mais externa à celulose na célula vegetal e é, portanto a fonte de carbono mais acessível (LYND et al., 2002). Tal fato justifica a alta produção de xilanase em comparação com as outras enzimas nos diferentes substratos.

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto a escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação dessas enzimas. A produção ótima e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam para os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (SANTOS, 2012).

3.2 Produção de celulasas e hemicelulasas em função do tempo de cultivo

O tempo de cultivo para produção de celulasas também foi avaliado. A maior produção de CMCase, 21,07 U/g (2,10 U/mL), foi obtida em 96 horas de fermentação e para β -glicosidase, 117,1 U/g (11,71 U/mL) em 192 horas de fermentação, após esse período, a atividade da enzima caiu consideravelmente (Figura 1).

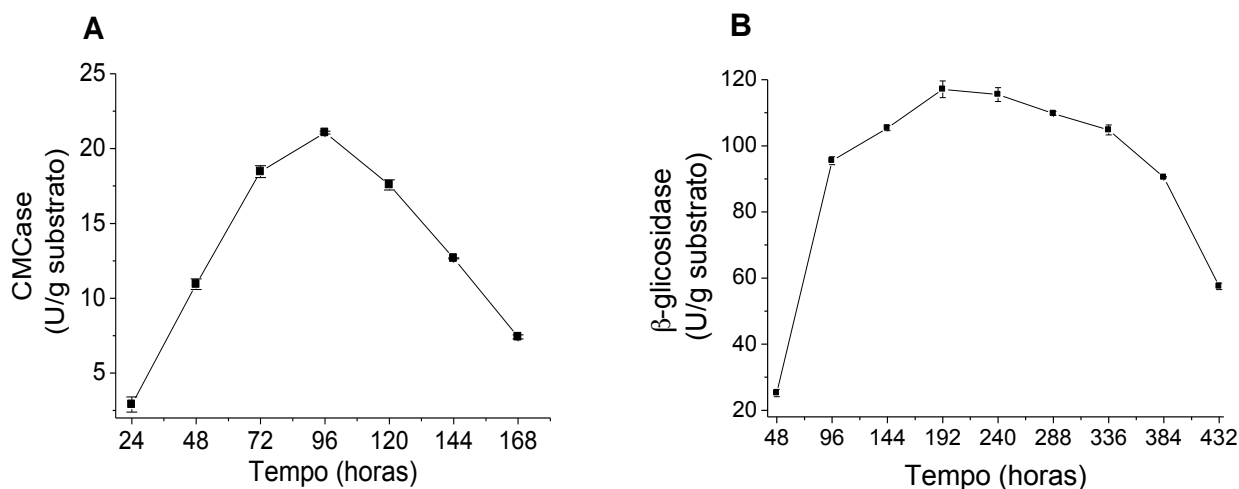


Figure 1(A,B): Produção de celulasas em função do tempo de cultivo pelo fungo *T. lanuginosus* em farelo de trigo, contendo 70% de umidade a 45°C.

A maior produção para xilanase foi de $217,98 \pm 5,78$ U/g ($21,79 \pm 0,57$ U/mL) em 144 horas de fermentação seguido da β -xilosidase, $1,9 \pm 0,0$ U/g ($0,9 \pm 0,00$ U/mL) em 96 horas de fermentação, sendo possível observar um decréscimo da atividade enzimática quando o tempo foi aumentando para β -xilosidase o que não acontece com a xilanase (Figura 2).

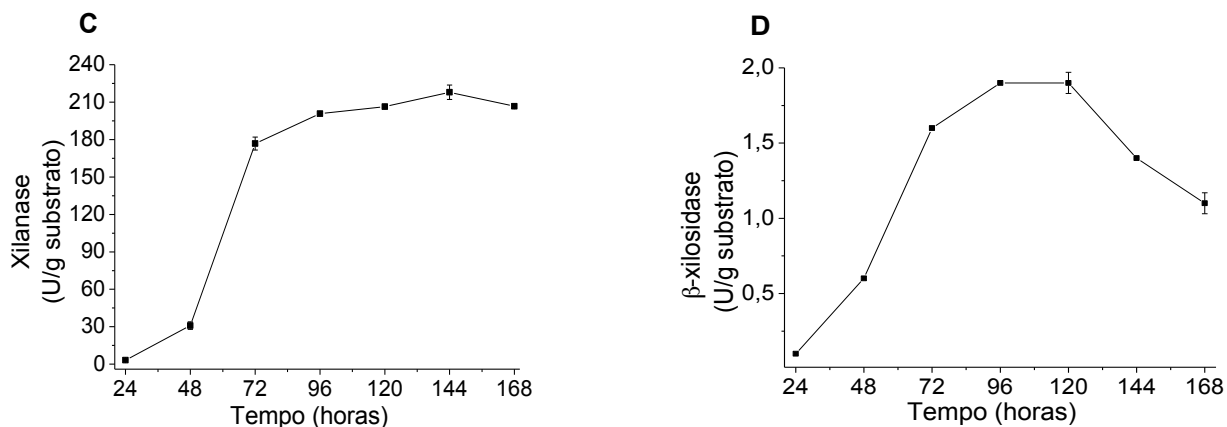


Figure 2(C,D): Produção de hemicelulase sem função do tempo de cultivo pelo fungo *T. lanuginosus* em farelo de trigo, contendo 70% de umidade a 45°C.

A redução da atividade enzimática pode ser explicada pelas alterações no meio de crescimento devido a atividade metabólica do microrganismo. Alguns parâmetros, tais como pH, tempo de incubação, umidade, agentes oxidantes, e até mesmo a produção de proteases podem inativar as enzimas extracelulares previamente secretadas, como observado nos diferentes estudos utilizando resíduos agroindustriais (SILVA et al., 2013).

Já algumas enzimas possuem elevada estabilidade estrutural o que pode justificar a manutenção da atividade após 168 horas de cultivo para a enzima xilanase produzida por este microrganismo. A otimização do tempo no processo de produção enzimática é essencial para melhorar a técnica de fermentação, uma vez que o custo de produção enzimática é proporcional ao tempo de incubação (GARCIA et al., 2015). Diversos autores relatam a otimização de enzimas produzidas por microrganismos. Terrasan et al. (2010), otimizou a produção de hemicelulases em cultivo submerso do fungo *Penicillium janczewskii* obtendo 15,19 U/mL de xilanase e 0,16 U/mL de β -xilosidase. Xin; Geng (2010) obteve 61,6 U/g β -glicosidade com *T. reesei* cultivada em 26°C durante 192 h em lascas de madeira. Silva et al. (2013) descreveu a produção de CMCase em resíduo de guavira depois de 96 h de fermentação em estado sólido a 35°C. Alves-Prado et al. (2010) obteve 17,8 U/mL de xilanase no cultivo do fungo *Lysinibacillus sp.* após 72 h de fermentação em estado sólido em palha de milho e também obteve 20,6 U/mL de xilanase em 72 h de cultivo em farelo de trigo. Gaffney et al. (2009) apresentaram resultados inferiores aos obtidos no presente trabalho ao estudar o fungo *T. lanuginosus* utilizando como substrato farelo de trigo e obtiveram cerca de 2,335 U/g de xilanase em 45°C por 40 h. Damaso et al. (2002) obtiveram uma produção máxima de 500 U/mL de xilanase livre de celulase em culturas agitadas usando o sabugo de milho como substrato em 96 h de cultivo a 45°C.

Os resultados encontrados no presente trabalho reforçam os resultados obtidos na literatura, de que o microrganismo *T. lanuginosus* é um ótimo produtor de xilanase livre de endoglucanases, tornando esse microrganismo atraente para aplicações industriais principalmente em processos de biobranqueamento de papel.

4 Conclusões

De acordo com os estudos realizados, pode-se concluir que a produção de xilanase por *T. lanuginosus* apresentou potencial promissor utilizando farelo de trigo como substrato a 45°C, 70% de umidade. É importante ressaltar que parâmetros como umidade, temperatura e tempo de fermentação influenciam na produção enzimática.

Os resultados permitem concluir que o fungo filamentosso *T. lanuginosus* apresenta considerável potencial para produção de celulasas e hemicelulasas, em meios de cultivo com custo reduzido, o que estimula a continuidade do trabalho visando a caracterização e aplicação dessas enzimas em etapas futuras.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a equipe do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos – LEPPER da UFGD pela ajuda e incentivos necessários.

Referências

Alves-Prado HF, Marangoni JHC, Leite RSR, Pavezzini FC, Da-Silva R. Production study of microbial enzymes from *Neosartorya aspinosa* strain P2D16. *J. Biotech.* 2010;150:423-423.

Castro AMD, Pereira-Jr N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. *Quím. Nova.* 2010;33(1):181-188.

Damaso MCT, Andrade CMMC, Junior NP. Production and properties of the cellulases-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. *Braz. J. Microbiol.* 2002;33(4):333-338.

Dillon A. Celulases. In: Said S, Pietro RCL, editors. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: LEGIS SUMMA; 2004.p. 243-270.

Farinas CS, Lemo V, Rodríguez-Zúñiga UF, Neto VB, Couri S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. São Carlos (Brasil): Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. p. 1-17.

Gaffney M, Doyle S, Murphy R. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009;73(12):2640-2644.

Garcia NFL, Santos FRS, Gonçalves FA, Paz MF, Fonseca GG, Leite RSR. Production of β -glucosidase on solid state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electron. J. Biotechnol.* 2015;18(4):314-319.

Ghosh M, Das A, Mishra AK, Nanda G. *Aspergillus sydowii* MG49 is a stronger producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 1993;15(8):703-709.

Gonçalves FA, Leite RSR, Rodrigues A, Argandoña EJS, Fonseca GG. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase producing *Lichtheimia ramosa* strain. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2013;2(4):377-384.

Johnson KG, Harrison BA, Schneider H, Mackenzie CR, Fontana JD. Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp. *Enzyme Microb. Technol.* 1988;10(7):403-409.

Leite RSR, Alves-Prado HF, Cabral H, Pagnocca FC, 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 Microb. Technol.* 2008;43(6):391-395.

Silva CAA, Lacerda MPF, Leite RSR, Fonseca GG. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Electron. J. Biotechnol.* 2013;16(5):1-9.

Leite RSR, Gomes E, Da-Silva R. 2007. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process. Biochem.* 2007;42(7):1101-1106.

Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002;66(3):71.

Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959;31(3):426-428.

Prado HF, Pavezzi FC, Leite RSR, Oliveira VM, Sette LD, Da-Silva R. Screening and Production Study of Microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010;161(1-8):333-346.

Ruegger MJS, Tauk-Tornisielo SM. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Bot.* 2004;27(2):6.

Santos LD, Kotovicz V, Barana AC, Almeida MM. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amilglicosidase por *Aspergillus awamori*. *Rev. Bras. Prod. Agroind.* 2012;6(1):655-664.

Soni SK, Soni R. Regulation of celulase synteshis in *Chaetomium erraticum*. *BioResources.* 2010;5(1):81-98.

Stroparo EC, Beitel SM, Resende JTV, Knob A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias.* 2012;33(6):2267-2278.

Sukumaran RK, Singhanian RR, Mathew GM, Pandey A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renew Energy.* 2009;34(2):421-424.

Terrasán CR, Temer B, Duarte MC, Carmona EC. Production of xylanolytic enzymes from *Penicillium janczewskii*. *Bioresour. Technol.* 2010;101(11):4139-4143.

Xin F, Geng A. Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010;162(1):295-306.