



Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais



CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA POR LINHAGEM DE *Thermoascus aurantiacus* RECENTEMENTE ISOLADA NA REGIÃO DE DOURADOS - MS

Rodrigo Prudente Scalabrini

Trabalho de Conclusão de curso apresentado a
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais –
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados
Mato Grosso do Sul - Brasil
2016



Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais



CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA POR LINHAGEM DE *Thermoascus aurantiacus* RECENTEMENTE ISOLADA NA REGIÃO DE DOURADOS - MS

Rodrigo Prudente Scalabrini

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

Dourados
Mato Grosso do Sul - Brasil
2016

DEDICO:

Dedico à minha família: Solange, José Roberto e Rafael, pela educação, pelo esforço, companheirismo, amor e carinho, que me proporcionaram caminhar sem medo, e crescer como pessoa.

A todos os cientistas que existiram antes de mim, pois sem os seus trabalhos nada disso teria se concretizado.

Dedico ao corpo docente que me acompanhou durante toda a graduação, e que da melhor maneira possível, tentaram passar os seus conhecimentos à mim.

Ao meu país, em que me orgulho ter nascido. Que meu trabalho possa oferecer algum bem à nossa sociedade bem como para natureza, que tanto carece de pesquisa e desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Á Deus em primeiro lugar, por ter me concedido a oportunidade da vida e do novo dia.
Pela criação de todos os seres, material do meu e de muitos outros trabalhos.

Ao meu pai, José Roberto Scalabrini, que me acompanhou desde o primeiro dia na
Universidade, responsável pelo meu crescimento e pela maturidade que eu tenho.
Desejo ser ao menos a metade do homem que és. Obrigado papai.

Agradeço a minha mãe, Solange Dias Prudente Scalabrini, pelo amor e carinho,
que sempre me fizeram seguir, ter orgulho de minha família e
de meu nome. Te amo mamãe.

À minha família, pessoas que me proporcionaram exemplos de vida, de educação e honestidade, e
que também me fizeram sempre seguir em frente.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite pela paciência no decorrer dos meus
experimentos, pelos ensinamentos científicos e principalmente, de vida. O qual sempre me
incentivou a continuar e nunca desistir, mesmo as coisas não saindo como planejado. Obrigado pelo
exemplo de pesquisador: sempre entusiasta e persistente.
Exemplo de ética e profissionalismo. Muito obrigado.

À equipe LEPPER (Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos): Nayara, Tobias, Paula,
Gabriela, Flávia, Taísa, Marília, Vinícius, Andréa e Paula Oliveira. Equipe que sempre me
orgulhou, me apoiou e me ensinou boa parte do que sei. Espero que o grupo se concretize cada dia
mais, para que possa ser, talvez um dia, referência mundial na área.

À Ana Carolina da Costa, pela ajuda, companheirismo, pela amizade e por dividir seus
conhecimentos e aprendizados comigo. Tenho certeza que será uma excelente profissional, assim
como foi uma grande parceira de trabalho. Satisfação em dividir
a bancada com você. Muito obrigado e conte sempre comigo.

À Maria Alice (*In memoriam*) que infelizmente não está mais entre nós, mas que além de todos os
ensinamentos, fundamentais para realização deste trabalho, deixou seu legado para o grupo no qual
trabalhei. Serei sempre grato pelos ensinamentos. Seja onde estiver, obrigado.

Aos técnicos de laboratórios, em especial a Fabiana e a Lívia, pela disponibilidade e paciência, mesmo com os imprevistos durante a realização deste trabalho. Obrigado.

Aos meus colegas de graduação, alguns já profissionais, que de uma forma ou de outra me fizeram aprender como conviver, trocar e criar novas ideias.

Aos meus amigos, pela força, conselhos, momentos de distração e de alegria.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	IV
1. INTRODUÇÃO	Pág.12
2. MATERIAL E MÉTODOS	Pág.13
2.1 MICRORGANISMO.....	Pág.13
2.2 INÓCULO.....	Pág.13
2.3 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE XILANASE.....	Pág.13
2.4 EXTRAÇÃO DA ENZIMA.....	Pág.13
2.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA XILANASE PRODUZIDA.....	Pág.14
2.6 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	Pág.14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Pág.14
4. CONCLUSÕES.....	Pág.17
5. REFERÊNCIAS.....	Pág.18

RESUMO

As xilanases apresentam aplicabilidade em diferentes segmentos industriais, como: branqueamento de papel e celulose, ração animal e panificação. No presente trabalho, a xilanase produzida pelo cultivo em estado sólido do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* em farelo de trigo, foi caracterizada bioquimicamente. A enzima produzida apresentou atividade ótima em pH 5,0 a 75°C, mantendo sua estabilidade em pH 3,0 a 11,0. A enzima manteve seu potencial catalítico após 1 h a 75°C. O extrato enzimático apresentou reduzida atividade de endoglucanase e FPase. Os resultados obtidos no presente trabalho (produção de xilanase pelo fungo em meios de cultivo de baixo custo, elevada estabilidade estrutural da enzima e reduzida atividade celulolítica) estimulam a aplicação desse complexo enzimático em processos de branqueamento de papel e celulose.

Palavras-chave: 1) Fermentação em Estado Sólido 2) Biobranqueamento de papel e celulose 3) Celulases e Hemicelulases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potencial catalítico do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>T. aurantiacus</i> nas condições ótimas de cultivo	Pág. 16
--	---------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Atividade em função da temperatura, pH e, pH e temperatura de estabilidade das xilanases Pág.14

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DNS: 3,5-ácido dinitrosalisílico

TRIS: 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

1. INTRODUÇÃO

A hemicelulose é um dos polissacarídeos mais abundantes da natureza, sendo constituinte estrutural da parede celular vegetal, disposta entre a celulose e a lignina. Este heteropolissacarídeo apresenta em sua composição diferentes açúcares, como glicose, arabinose, manose, galactose e ácido galacturônico, ramificados na cadeia principal de xilana, formada por monômeros de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4 (ALVES-PRADO et al., 2010; HADDAR et al., 2012).

As xilanases são enzimas responsáveis pela hidrólise das ligações β -1,4 da xilana, liberando oligossacarídeos de xilose, dessa forma, reduzem o grau de polimerização da cadeia principal da hemicelulose, contribuindo para desestruturação da parede celular vegetal (GOWDHAMAN et al., 2014; HADDAR et al., 2012). Essa propriedade catalítica capacita o uso dessas enzimas na hidrólise de biomassa vegetal visando a produção de biocombustíveis, também podem ser aplicadas em formulações de ração animal, ou ainda, em processos de panificação para melhorar a qualidade da massa, hidrolisando xilo-oligossacarídeos que desfavorecem a formação do glúten e prejudicam a estrutura de miolo (BECKER et al., 2009; BRIENZO et al., 2012 ; OLIVEIRA et al., 2014; PIROTA et al., 2015). No entanto, o biobranqueamento da polpa Kraft, no processamento da celulose para produção de papel, certamente é a aplicação mais difundida e almejada das enzimas xilanolíticas. Devido à importância econômica deste seguimento industrial (MASUI et al., 2012; MITTAL et al., 2013). O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial dos países produtores de celulose, apresentando acréscimo da sua capacidade produtiva maior que 60% nos últimos anos (CARVALHAES, 2014).

A utilização em escala industrial de biocatalizadores ainda é limitada, devido seu elevado custo de produção (OLIVEIRA et al., 2015). Uma alternativa para reduzir o custo final dessas biomoléculas é utilizar resíduos agroindustriais para cultivo em estado sólido de microrganismos, visando a produção de enzimas (BRIENZO et al., 2012; MASUI et al., 2012; SILVA et al, 2013). Estima-se que 40% do custo final de uma enzima é proveniente do meio utilizado para o cultivo do microrganismo produtor (ROMERO et al., 2007). A complexa composição dos resíduos agroindustriais possibilita o uso desses subprodutos, em substituição às formulações tradicionalmente empregadas para cultivos microbiológicos, principalmente em países com intensa atividade agrícola, podendo viabilizar economicamente a aplicação da enzima de interesse em larga escala (SANTOS e ISHII, 2011; BOCCHINI et al., 2011).

O ambiente industrial é hostil para os biocatalizadores, geralmente essas macromoléculas são expostas a extremos de pH e temperatura, resultando na alteração de sua conformação estrutural, o que ocasionará a redução da eficiência catalítica. Esse problema tem impulsionado à prospecção de microrganismos termófilos, capazes de produzir enzimas com elevada estabilidade estrutural para suportar as condições industriais (GOMES et al., 2007).

Trabalhos anteriores descrevem diferentes linhagens do fungo filamentosso termófilo *Thermoascus aurantiacus* como excelentes produtoras de xilanases e celulases, principalmente quando cultivadas em resíduos agroindustriais (DA-SILVA et al., 2005; KALOGERIS et al.; 2003), inviabilizando a aplicação desses extratos enzimáticos em processos de branqueamento de polpa de celulose, devido a elevada concentração de enzimas celulolíticas. Essa nova linhagem de *Thermoascus aurantiacus*, expressou considerável potencial para produção de xilanase e reduzida atividade celulolítica (COSTA, 2013). Essa característica estimulou o desenvolvimento do presente trabalho, tendo como objetivo caracterizar bioquimicamente enzima produzida e avaliar as propriedades catalíticas do extrato enzimático obtido nas condições de cultivo.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O fungo filamentosso utilizado no presente trabalho foi isolado de serrapilheira de fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Atlântica (Mata do Azulão), localizada no município de Dourados – MS. O fungo termófilo foi identificado como *Thermoascus aurantiacus*, pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. André Rodrigues do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista IB/UNESP – Rio Claro – SP. A cultura foi preservada em Agar Sabouraud a 4°C.

2.2 Inóculo

O inóculo foi preparado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de meio Agar Sabouraud, mantidos por 72 horas a 45°C. A suspensão microbiana foi obtida pela adição de 50 mL de solução nutriente composta de sulfato de amônia 0,1%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1% e nitrato de amônia 0,1% (m/v), seguida de raspagem suave da superfície do meio. A inoculação do microrganismo se deu pela transferência de 5 mL da suspensão microbiana para os frascos contendo os resíduos agroindustriais (PEREIRA et al., 2015).

2.3 Cultivo em estado sólido para produção de xilanase

O cultivo do fungo ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g de farelo de trigo, contendo 65% de umidade (com solução descrita anteriormente), por 120 horas a 45°C.

2.4 Extração da enzima

O extrato enzimático foi obtido pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos erlenmeyer contendo os meios fermentados. Os frascos foram mantidos em agitação por 1 hora a 150 rpm, em seguida os meios foram filtrados em tecido sintético (nylon) e posteriormente centrifugados a 3.000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios subsequentes.

2.5 Caracterização bioquímica da xilanase produzida

A xilanase produzida em condições otimizadas foi caracterizada bioquimicamente. O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 a 8,0), utilizando tampão Citrato-Fosfato 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em temperaturas de 65 a 85°C, no pH ótimo da enzima. A estabilidade ao pH foi determinada incubando a enzima por 24 horas em diferentes valores de pH a 25°C, utilizando tampão Citrato-Fosfato 0,1M (3,0 - 8,0), Tris-HCl 0,1M (pH 8,0 – 8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 - 10,5). A termoestabilidade foi avaliada incubando a enzima por 1 hora em diferentes valores de temperatura de 45 a 85°C. As atividades residuais foram mensuradas nas condições ótimas da enzima.

2.6 Determinação das atividades enzimáticas

As atividades de CMCase e xilanase foram quantificadas utilizando respectivamente carboximetilcelulose 3% (C5678 Sigma) e xilana 0,5% (Beechwood Sigma). A atividade de FPase foi quantificada de acordo com Ghose (1987), utilizando uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1,0 cm x 6,0 cm) como substrato. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (MILLER, 1959). As atividades de β -glicosidase e β -xilosidase foram mensuradas com os respectivos substratos sintéticos p-NP- β -D-glicopiranosídeo e p-NP- β -D-xilopiranosídeo 4 mM (Sigma), seguindo metodologia descrita por Pereira et al. (2015). Todos os ensaios foram realizados a 50°C em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. 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

Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da xilanase produzida

A xilanase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* apresentou atividade ótima em valores próximos de pH 5,0 a 75°C (Figura 1A e 1B). A enzima foi estável por 24 h em pH 3,0 a 11,0 (Figura 1C) e manteve sua atividade catalítica a 75°C por 1 h (Figura 1D), confirmando a elevada estabilidade enzimática.

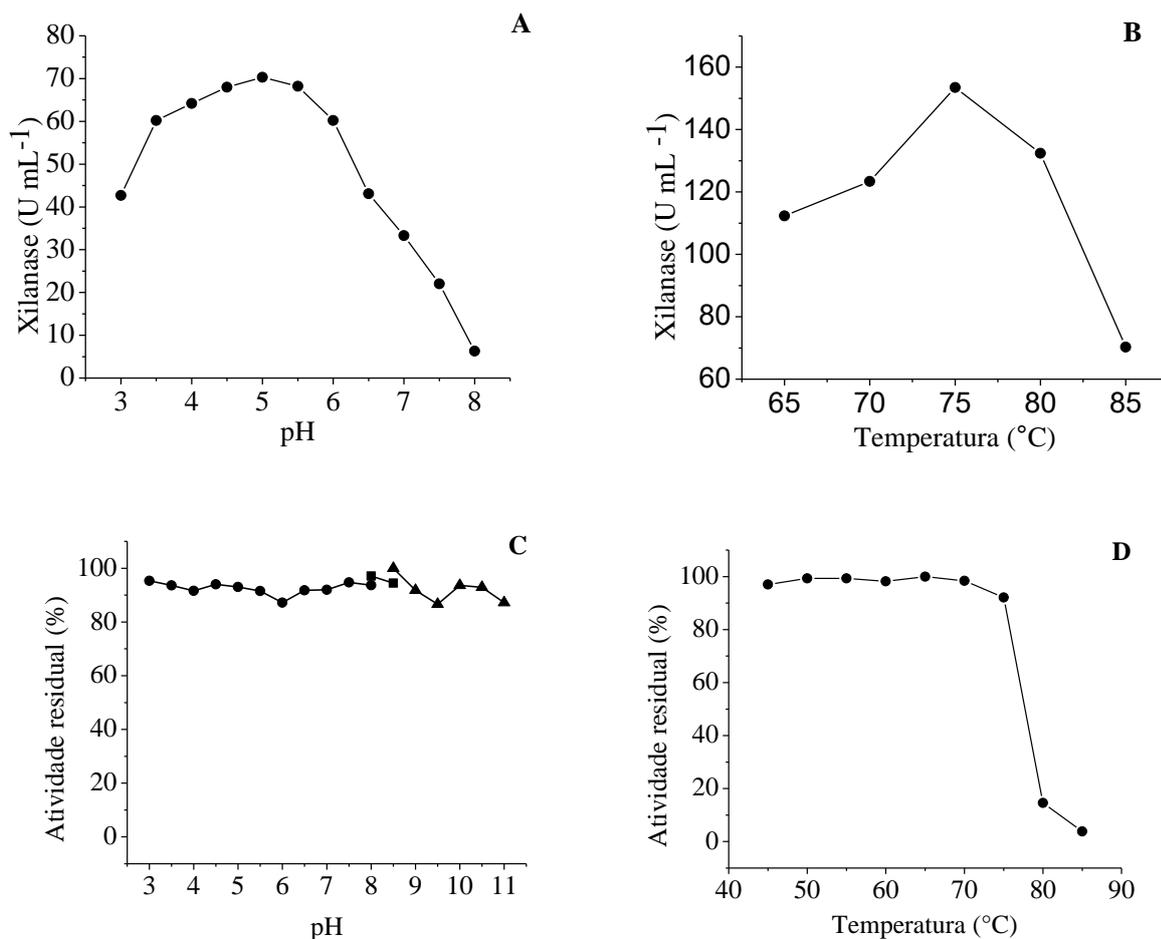


Figura 1. Caracterização bioquímica da xilanase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* nas condições ótimas de cultivo. (A) pH ótimo; (B) Temperatura ótima; (C) Estabilidade ao pH; (D) Estabilidade a temperatura.

Da-Silva et al. (2005) caracterizaram a xilanase produzida por outra linhagem de *T. aurantiacus*, isolada de material vegetal em decomposição em Manaus – AM, Brasil. Os autores relatam a atividade ótima da enzima em valores idênticos aos descritos no presente trabalho e confirmam sua elevada estabilidade ao pH e temperatura.

A elevada estabilidade estrutural é fundamental para aplicação de uma enzima em processos industriais, considerando que o ambiente industrial difere significativamente das condições laboratoriais, com relação ao controle do pH e temperatura (GOMES et al., 2007). Dessa forma, a avaliação do efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática é essencial para utilização industrial de biocatalizadores, assegurando maior eficiência catalítica ao longo do processo (GOWDHAMAN et al., 2014).

A remoção da lignina para produção de polpa celulose e papel, ocorre pelo cozimento dos cavacos de madeira em condições elevadas de pH e temperatura, exigindo enzimas consideravelmente robustas (POLIZELI et al., 2005). Nesse contexto, os resultados de

caracterização bioquímica confirmam a aplicabilidade da enzima em processos de branqueamento de polpa Kraft, devido sua estabilidade ao pH e temperatura.

Potencial catalítico do extrato enzimático

O extrato enzimático produzido apresentou elevada atividade de xilanase (170,19 U mL⁻¹) e reduzido potencial para hidrolisar celulose, contendo cerca de 3,8 U mL⁻¹ de endoglucanase (ou CMCase) e 0,063 U mL⁻¹ de FPase (Tabela 1). As características descritas são apreciáveis para aplicação em indústrias de papel e celulose.

Tabela 1. Potencial catalítico do extrato enzimático produzido pelo fungo *T. aurantiacus* nas condições ótimas de cultivo.

Enzima	Substrato	U mL⁻¹
CMCase	Carboximetilcelulose	3,8
β-glicosidase	Nitrofenil β-D glicopiranosídeo	3,5
FPase	Papel filtro	0,063
Xilanase	Xilana	170,19
β-xilosidase	Nitrofenil β-D xilopiranosídeo	0,09

A principal aplicação das enzimas xilanolíticas consiste no branqueamento de polpa de celulose, visando à remoção da lignina residual ainda presente após o processo Kraft. A adição desses biocatalizadores reduz consideravelmente a quantidade necessária de catalisadores químicos para oxidação da lignina. Dessa forma, o uso de xilanases em processos de biopolpação contribui para redução dos impactos ambientais ocasionados por efluentes desse segmento industrial (DURAN et al., 2008).

Extratos enzimáticos utilizados para branqueamento de polpa de celulose necessitam de elevadas concentrações de xilanase, mas devem apresentar reduzida atividade celulolítica para não prejudicar a qualidade da polpa (DA-SILVA et al., 2005). Essa característica dificulta a obtenção de xilanase a partir de cultivos em resíduos agroindustriais complexos, capazes de induzir a produção de diferentes enzimas, especialmente celulasas (BRIENZO et al., 2012).

Trabalhos anteriores relatam o fungo *T. 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), o que inviabiliza a aplicação do seu extrato enzimático em processos de biopolpação. No entanto, a linhagem de *T. aurantiacus* avaliada no presente trabalho, não demonstrou potencial para produção de celulasas (Tabela 1). Dessa forma, é possível inferir que extrato enzimático obtido apresenta aplicabilidade em indústrias de papel e celulose.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem inferir que a linhagem de *T. aurantiacus*, recentemente isolada pelo Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos - LEPFER, apresenta elevado potencial para produção de xilanase por cultivo em estado sólido em resíduos agroindustriais, resultando na obtenção de extratos enzimáticos de baixo custo e com desprezível atividade de enzimas celulolíticas. As características catalíticas do extrato enzimático, somadas a elevada estabilidade ao pH e temperatura da xilanase produzida, estimulam a aplicação dessa enzima em processos de branqueamento de polpa Kraft.

REFERÊNCIAS

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.

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.

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 - Volume II*. Rijeka: Intech Open Access Publisher, v. 2, p. 319-360, 2011.

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.

CARVALHAES, E. Perspectivas e expectativas para 2014. *O Papel*, v.3, p. 22, 2014.

COSTA, A. C. Produção de xilanase em resíduo agroindustrial pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* com reduzida atividade de celulase. 2013. 14f. Trabalho de Conclusão de Curso – Biotecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2013.

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 different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 36, p. 235-241, 2005.

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.

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

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; DA-SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v. 30, p. 136-145, 2007.

GOWDHAMAN, D.; MANASWINI, V.S.; JAYANTHI, V.; DHANASRI, M.; JEYALAKSHMI, G.; GUNASEKAR, V.; SUGUMARAN, K.R.; PONNUSAMI, V. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.64, p. 90-98, 2014.

HADDAR, A.; DRISS, D.; FRIKHA, F.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; NASRI, M. Alkaline xylanases from *Bacillus mojavensis* A21: Production and generation of xylooligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, p. 647-656, 2012.

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.

MASUI, D.C.; ZIMBARDI, A.L.R.L.; SOUZA, F.H.M.; GUIMARÃES, L.H.S.; FURIEL, R.P.M.; JORGE, J.A. Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Hemicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 2689-2701, 2012.

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

MITTAL, A.; NAGAR, S.; GUPTA, V.K. Production and purification of high levels of cellulase-free bacterial xylanase by *Bacillus* sp. SV-34S using agro-residue. *Annals of Microbiology*, v. 63, p. 1157-1167, 2013.

OLIVEIRA, A.P.A.; SILVESTRE, M.A.; ALVES-PRADO, H.F.; RODRIGUES, A., PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, p. 1215 - 1223, 2015.

- OLIVEIRA, DS; TELIS-ROMERO, J.; DA-SILVA, R.; FRANCO, C.M.L. Effect of a *Thermoascus aurantiacus* thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality. *Food Chemistry*, v. 143, p.139-146, 2014.
- 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.
- PEREIRA, J.C.; LEITE, R.S.R.; ALVES-PRADO, H.F.; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characterization of β -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor-indicae seudaticae* N31. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 175, p. 723–732, 2015.
- PIROTA, R.D.P.B.; TONELOTTO, .; DELABONA, P.S.; TREMACOLDI, C.R.; FARINAS, C.S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. *Ciência Rural*, v.45, p.1606-1612, 2015.
- POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.F. JORGE, J.A. AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, p. 577-91, 2005.
- ROMERO E, BAUTISTA J, GARCÍA-MARTÍNEZ AM, CREMADES O, PARRADO J. Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1492-1497, 2007.
- SANTOS, L.F. dos; ISHII, P.L. Xilanases: Principais metodologias e parâmetros cinéticos. *Journal of biotechnology and biodiversity*, v.2, p.7-15, 2011.
- SILVA, C.A.A.; LACERDA, M.P.F.; LEITE, R.S.R.; FONSECA, G.G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Journal of Biotechnology*, v. 16, p. 1-9, 2013.