

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO
FUNGO TERMOFÍLICO *Humicola grisea* var. *thermoidea*
EM DIFERENTES SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

GUILHERMAR RAMOS DE MELO

Goiânia-GO, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO
FUNGO TERMOFÍLICO *Humicola grisea* var. *thermoidea*
EM DIFERENTES SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientando: Guilhermar Ramos de Melo

Orientadora: Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Goiânia-GO, 2010

Trabalho realizado nos Laboratórios de Biotecnologia de Fungos e de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás com apoio financeiro da Finep.

Orientadora: Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Banca Examinadora:

Membros titulares:

Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria.

Profa. Dra. Telma Alves Garcia

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Suplentes:

Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuíno

“Tem gente que é tão pobre, mas tão
pobre que só tem dinheiro”

Autor desconhecido

Dedico este trabalho à minha esposa
Cátia Cilene Borges e aos meus filhos:
Guilherme Henrique Borges Cruvinel
Melo, Kárita Lorrany Borges Melo e
Walisson Pereira dos Santos. Vocês
representam a minha âncora.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço a Deus por me ter concedido saúde, esperança e coragem para lutar até conseguir os meus objetivos.

À minha esposa e aos meus filhos pelo apoio e por terem tolerado a minha impaciência, durante o período em que me preparava para o processo seletivo do mestrado e durante estes dois anos e meio de pesquisa e muito trabalho na realização dos experimentos do meu projeto.

Ao meu cunhado Alaor, à minha irmã Sônia pelo amor dispensado a mim através dos seus conselhos, incentivo e orações constantes.

Aos meus sobrinhos Silvio, Jone, Júnior, Fábio e esposas pelo carinho e consideração demonstrados a mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria, por ter me recebido como aluno no mestrado. Agradeço muitíssimo pelo enorme carinho e paciência dispensados a mim; sem dúvida, foi grande a sua contribuição para minha formação profissional.

À Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuíno, pela simpatia, bondade, e por haver atendido várias solicitações minhas, no sentido de esclarecer dúvidas relacionadas ao meu projeto, quando minha orientadora estava ausente. Muito obrigado.

Ao ex-colega do laboratório, Wagner Rodrigues de Carvalho, que sempre esteve disposto a me auxiliar, quando solicitado, no sentido de esclarecer algum protocolo, ou algum experimento. Muito obrigado.

Aos companheiros de bancada: Syd, Lorena, Ilítia, Byancarine, Dâmaris, Wesley, Matheus, Andrea, Thiago e Élvia, obrigado pela amizade e colaboração nos meus experimentos durante esse período.

Ao Professor Dr. Cirano José Ulhoa, por abrir as portas do Laboratório de Enzimologia do ICB 2- UFG, contribuindo, dessa forma, para a realização de muitos experimentos. Obrigado pela parceria e por ter feito excelente trabalho frente ao Programa de Pos-Graduação em Biologia, propiciando melhoria do nível do Programa contribuindo para o enriquecimento do conhecimento dos alunos desse Programa.

Aos colegas do laboratório de Enzimologia, Roberto, Valdirene, Saulo, Marcelo, Andrei, Fabyano, Rogério, Amanda Araújo, Amanda Rafaela, Vanessa, Patrícia obrigado pela recepção, ajuda e sugestões.

Às professoras do laboratório de biologia molecular (LBM), ICB 2 - UFG: Dra. Célia, Dra. Maristela, Dra. Silvia e aos alunos Clayton, Alexandre, Neto, Renata, Patrícia, Mirelli e Elisa, sempre que precisei utilizar algum instrumento desse laboratório fui bem atendido. Muito obrigado pela recepção e sugestões.

Ao Prof. Dr. Élcio Alves Costa e aos alunos Marcos Vinícios e Pablinny do Laboratório de Farmacologia em Produtos Naturais (LFPN) ICB 2 (UFG), muito obrigado pela amizade e colaboração.

Ao Prof. Dr. Artur Mendes Bataus e as alunas Marcela Suriani, Lilian Carla, Ana Flávia, Renata e Lays do Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética – LBEG, ICB 2, agradeço muitíssimo por disponibilizar o uso de alguns equipamentos sempre que necessitei.

À Profa. Dra. Lidia Andreu Guilo do Laboratório de Biologia Celular, ICB 2 obrigado pela amizade e ajuda quando necessitei.

Ao Professor Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos do Laboratório de Biologia Estrutural, ICB 2, agradeço pela simpatia e amizade demonstrados a mim.

Ao Professor Dr. Reginaldo Nassar Ferreira (Diretor do ICB -UFG) e Tizuko Iwamoto Valadares (Coordenadora Administrativa do ICB) e aos Técnicos Administrativos da Secretaria do ICB: Fernando Cesar, Maria Aparecida, Rafael Cortes, Celso Eduardo e José Flávio, agradeço pelo excelente atendimento e parabênizo a todos pelo excelente e desafiador trabalho realizado frente à administração do ICB.

À Profa Dra. Kênia Silva Cunha e a aluna Nilza do Laboratório de Genética Toxicológica, ICB 2, obrigado pela amizade e colaboração.

À Profa Dra. Silvana Petrofeza da Silva e aos alunos Lucas, Patrícia, Kamila e Maria, obrigado pelo bom atendimento quando necessitei desse laboratório.

À funcionária Técnico de Nível Superior, cargo Biomédico Denise da Silva Pinheiro, agradeço pela simpatia e bons serviços prestados na administração do ICB desta instituição.

À Glazilene secretária dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular/ Ecologia do ICB, UFG, parabéns pelo excelente trabalho desempenhado frente aos Programas.

Às funcionárias da Biblioteca Central da UFG: Márcia Calil, Neide Aparecida e Sheila Cristina, agradeço pelo excelente atendimento e serviços prestados.

Às funcionárias da limpeza do ICB 2: Divina, Lurdes e Anésia, obrigado pela amizade e pelo excelente trabalho prestado na limpeza do nosso laboratório.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. LIGNOCELULOSE	1
1.1.1. Celulose	1
1.1.2. Hemicelulose	3
1.1.2.1. Xilana	3
1.1.3. Lignina	6
1.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E HEMICELULOSE	6
1.2.1. Hidrólise Enzimática da Celulose	6
1.2.1.1. Celobiohidrolases	7
1.2.1.2. Endoglicanases	9
1.2.1.3. β -glicosidases (β GLs)	9
1.2.2. Hidrólise Enzimática da Hemicelulose	10
1.2.2.1. Endoxilanases	10
1.2.2.2. β -xilosidases	11
1.2.2.3. Arabinofuranosidase (AF)	12
1.2.2.4. α -Glucuronidase	12
1.2.2.5. Acetilxilana esterase	13
1.3. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILANASES E CELULASES	14
1.4. PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES FÚNGICAS	16
1.4.1. Processos fermentativos para a produção de celulases e xilanases fúngicas	18
1.5. FUNGOS FILAMENTOSOS	20
1.5.1. FUNGO TERMOFÍLICO <i>Humicola grisea</i> var. <i>Thermoidea</i>	21
1.6. PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO FUNGO	
<i>H. grisea</i>	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29

3.	MATERIAIS	30
3.1.	LINHAGEM DO FUNGO <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	30
3.2.	SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS	30
3.3.	MEIOS DE CULTURA	30
3.3.1.	Meio Ágar Aveia	30
3.3.2.	Meio Mínimo	30
3.4.	SUBSTRATOS PARA DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	30
3.5.	SOLUÇÕES	31
3.5.1.	Soluções para a Determinação da Atividade Enzimática	31
3.5.2.	Soluções para Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida	32
3.5.2.1.	Revelação das Proteínas por Coloração com Azul de Comassie	33
3.5.3.	Soluções para o Zimograma para xilanase e celulase	33
3.6.	MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PARA PROTEÍNAS	34
4.	METODOLOGIA	34
4.1.	Manutenção e cultivo do fungo <i>H. grisea</i>	34
4.2.	Preparo dos substratos lignocelulósicos	34
4.3.	Produção de celulasas e xilanases pelo fungo <i>H. grisea</i> cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos	34
4.4.	Determinação das Atividades Xilanolítica e Celulolítica pelo Método dos Açúcares Redutores (MILLER, 1959)	35
4.4.1.	Dosagem da Atividade Xilanolítica	35
4.4.2.	Dosagem da Atividade Celulolítica	35
4.5.	Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
4.5.1.	Preparo das Amostras	36
4.5.2.	Corrida Eletroforética	37
4.5.3.	Coloração com Azul de Comassie	37
4.6.	Gel de Atividade (Zimograma)	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO FUNGO <i>H. grisea</i> CULTIVADO EM MEIO CONTENDO PA, SM, BCA OU FT	39

5.2.	ANÁLISE DO PERFIL DE CELULASES E XILANASES SECRETADAS PELO FUNGO <i>H. grisea</i> CULTIVADO EM BCA, FT E GLICOSE	45
5.2.1.	SDS-PAGE	45
5.2.2.	ZIMOGRAMAS	52
5.2.2.1.	Zimograma para atividade de celulasas	52
5.2.2.2.	Zimograma para atividade de xilanases	53
6.	CONCLUSÃO	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ANEXO I	72
	ANEXO II	75
	ANEXO III	78
	ANEXO IV	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de uma fibra de celulose	2
Figura 2.	Estrutura da celulose	2
Figura 3.	Estrutura da xilana de madeira dura e madeira mole	5
Figura 4.	Representação esquemática da hidrólise da celulose	7
Figura 5.	Estrutura dos domínios das Celobiohidrolases	8
Figura 6.	Enzimas xilanolíticas envolvidas na hidrólise da xilana	13
Figuras 7.	Cinética da produção de celulases e xilanases pelo fungo <i>H. grisea</i> cultivado nos substratos lignocelulósicos: PA, SM, BCA e FT nas concentrações de 1 e 2% por 144 h.	40
Figura 8.	Cinética de produção de celulases e xilanases pelo fungo <i>H. grisea</i> cultivado nos substratos lignocelulósicos: BCA e FT nas concentrações de 2 e 3% por 240 h.	41
Figura 9.	Pico de produção de xilanases pelo fungo <i>H. grisea</i> cultivado em: PA, SM, BCA e FT a 1%, 2% e 3%.	43
Figura 10.	Pico de produção de CMCases pelo fungo <i>H. grisea</i> cultivado em: PA, SM, BCA e FT a 1%, 2% e 3%.	43
Figura 11.	Pico de produção de FPases pelo fungo <i>H. grisea</i> cultivado em: PA, SM, BCA e FT a 1%, 2% e 3%.	44

-
- Figura 12.** Pico de produção de Avicelases pelo fungo *H. grisea* cultivado em: PA, SM, BCA e FT a 1%, 2% e 3%. 44
- Figura 13.** Cinética de secreção de proteínas pelo fungo *H. grisea* cultivado em 2% de BCA por 216 h. 44
- Figura 14.** Cinética de secreção de proteínas pelo fungo *H. grisea* cultivado em 3% de BCA por 216 h. 48
- Figura 15.** Cinética de secreção de proteínas pelo fungo *H. grisea* cultivado em 2% de FT por 216 h. 50
- Figura 16.** Cinética de secreção de proteínas pelo fungo *H. grisea* cultivado em 3% de FT por 216 h. 51
- Figura 17.** Cinética de secreção de proteínas pelo fungo *H. grisea* cultivado em 0,5% de glicose por 216 h. 52
- Figura 18.** Zimograma em gel de poliacrilamida 13% com 1% de xilana do sobrenadante de cultura do fungo *H. grisea*. 54
- Figura 19.** Zimograma em gel de poliacrilamida 13% com 0,2% de CMC do sobrenadante de cultura do fungo *H. grisea*. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estrutura dos diferentes tipos de xilana.	4
Tabela 2.	Composição da parede celular dos substratos: PA, SM, BCA e FT.	18
Tabela 3.	Enzimas do sistema celulolítico do fungo <i>H. grisea</i> .	24
Tabela 4.	Enzimas do sistema xilanolítico do fungo <i>H. grisea</i> .	26
Tabela 5.	Perfil de secreção de proteínas pelo fungo <i>H. grisea</i> cultivado em PA, SM, BCA e FT nas concentrações de 1, 2 e 3% por 240 h.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AGX - Arabinoglucuronoxilana
Avicel - Celulose microcristalina
Avicelase - Atividade enzimática contra avicel
AX - Arabinoxilana
BCA - Bagaço de cana-de-açúcar
BGL - β -glicosidase
BSA - Soroalbumina bovina
BXL - β -xilosidase
CBD - Domínio de ligação à celulose
CBH - Celobiohidrolase
CHX - Heteroxilana Complexa
CMC - Carboximetilcelulose
CMCase - Atividade enzimática contra CMC
cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
Da - Dalton
DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EGL - Endoglicanase
FES - Fermentação no estado sólido
FEL - Fermentação no estado líquido
FC - Fonte de carbono
FN - Fonte de nitrogênio
FPase - Atividade enzimática contra papel de filtro
FPU - Unidades de papel de filtro
FS - Fermentação submersa
FT- Farelo de trigo
g - Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
GX - Glucuronoxilana
GGM - Galactoglucomanana
Kb - kilobase
MES - Ácido N-morfolino etanolsulfônico

MM - Meio mínimo

p/v - Peso por volume

PA - Palha de arroz

pb - Pares de base

pH - Potencial de hidrogênio

pI - Ponto isoelétrico

q.s.p. - Quantidade suficiente para

rpm - Rotações por minuto

SDS - Sódio dodecil sulfato

SDS- PAGE - Gel desnaturante de poliacrilamida

SM - Sabugo de milho

TEMED - N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina

Tm - Temperatura de desnaturação

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

U - Unidade enzimática (quantidade de enzima capaz de forma 1 μ mol de produto por minuto nas condições do experimento)

V - Volts

v/v - Volume por volume

XG - Xiloglucana

XYL - Xilanase (endoxilanase)

RESUMO

A biomassa vegetal é constituída principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é o polímero mais abundante e a xilana o principal componente hemicelulósico. A conversão da celulose e da xilana à glicose e xilose pode ser realizada por um complexo enzimático encontrado nas secreções de microrganismos tais como fungos e bactérias. A hidrólise enzimática é um importante passo para a bioconversão da fração celulósica e hemicelulósica de resíduos lignocelulósicos. O fungo termofílico *Humicola grisea* var *thermoidea* produz um eficiente complexo de enzimas celulolíticas (endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidases) e xilanolíticas (endoxilanases e β -xilosidase) com alta termoestabilidade quando cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos. O objetivo desse trabalho foi analisar a cinética de produção de celulases e xilanases pelo fungo *H. grisea* cultivado em meio contendo palha de arroz (PA), sabugo de milho (SM), bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e farelo de trigo (FT) como fonte de carbono e posteriormente analisar o perfil de proteínas com atividade celulolítica e xilanolítica secretadas pelo fungo quando cultivado em meio mínimo, por fermentação líquida, contendo os substratos nas concentrações de 1, 2 e 3%, e mantidos a 42 °C, 120 rpm por diferentes tempos. Os melhores resultados foram obtidos quando o fungo foi cultivado em 3% de BCA e FT, sendo que os picos de FPase (0.17 U/mL) e CMCase (3.54 U/mL) foram observados após 192 e 240 h respectivamente de crescimento com 3% de BCA, o pico de Avicelase (0.195 U/mL) após 48 h com 3% de FT e o pico de xilanase (23.75 U/mL) após 216 h com 3% de FT. Os resultados demonstraram que o melhor indutor da produção de enzimas com atividade de FPase e CMCase foi o BCA e o melhor indutor da produção de enzimas com atividade de Avicelase e xilanase foi o FT. Na análise do perfil de proteínas secretadas pelo *H. grisea* por SDS-PAGE (216 h) e zimograma (144 h), nenhuma banda foi visualizada quando o fungo foi cultivado na presença de glicose, sugerindo repressão catabólica. Entretanto, duas bandas protéicas muito fortes, correspondentes à HXYN2 (23 kDa) e CBH1.2 (47 kDa) foram visualizadas nos géis contendo BCA (2 e 3%) e FT (2 e 3%); e representam as principais enzimas dos sistemas xilanolítico e celulolítico do fungo, respectivamente. Estas foram monitoradas pelas enzimas recombinantes do *H. grisea* (nos geis): uma endoxilanase HXYN2r (23 kDa) e uma celobiohidrolase CBH1.2r (47 kDa). As massas do perfil completo do *H. grisea* podem ser vistas nas Figuras 13-19.

ABSTRACT

The vegetal biomass consists mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. Cellulose is the most abundant polymer and xylan is the main component of hemicellulose. The conversion of cellulose and xylan to glucose and xylose can be realized by an enzymatic complex found in secretions of microorganisms such as fungi and bacteria.

Enzymatic hydrolysis is an important step to the bioconversion of cellulosic and hemicellulosic fraction from lignocellulosic wastes. The thermophilic fungus *Humicola grisea* var *thermoidea* produces an efficient complex of cellulolytic enzymes (endoglucanases, cellobiohydrolases and β -glucosidase) and xylanolytic (endoxylanase and β -xylosidase) with high thermostability when grown on different lignocellulosic substrates. The aim of this study was to analyze the kinetics of production of cellulases and xylanase by the fungus *H. grisea* cultivated on medium containing rice straw (RS), corncob (CC), crushed cane sugar bagasse (CSB) and wheat bran (WB) as carbon source and subsequently analyze the profile of proteins with cellulolytic and xylanolytic activity secreted by the fungus when grown in minimal medium, by liquid fermentation, containing the substrates at concentrations of 1, 2 and 3% and maintained at 42 ° C, 120 rpm for different times. The best results were obtained when the fungus was grown in 3% BCA and FT, the peaks of FPase (0.17 U / mL) and CMCase (3.54 U / mL) were observed after 192 h of growth with 3% BCA , peak avicelase (0,195 U / mL) after 48 h with 3% FT and peak xylanase (23.75 U / mL) after 216 h with 3% FT. The results showed that the best inducer of enzyme production with FPase and CMCase activity was the CSB and the best inducer of enzymes production with xylanase and avicelase activity was the WB. In profile analysis of proteins secreted by *H. grisea* by SDS-PAGE (216 h) and zymogram (144 h), no band was seen when the fungus was grown in the presence of glucose, suggesting catabolite repression. However, two very strong protein bands corresponding to HXYN2 (23 kDa) and CBH1.2 (47 kDa) were visualized in the gels containing CSB (2 to 3%) and WB (2 and 3%). These enzymes are the main xylanolytic and cellulolytic systems of the fungus, respectively. Were monitored by recombinant enzymes from *H. grisea* (in gels), an endoxylanase HXYN2r (23 kDa), an cellobiohydrolase CBH1.2r (47 kDa). The masses' full profile of *H. grisea* can be seen in Figures 13, 14, 15, 16, 18 and 19.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LIGNOCELULOSE

A lignocelulose é o principal componente da biomassa vegetal sendo constituída pela celulose, hemicelulose e lignina presentes na parede das células vegetais; compreende metade do peso seco das plantas e representa o recurso orgânico, renovável, mais abundante no solo. Somente uma pequena porcentagem destes polímeros gerados como subprodutos da atividade agrícola é aproveitada. Muitos microrganismos produzem um grupo de enzimas extracelulares que degradam a lignocelulose e possibilita o aproveitamento da celulose e hemicelulose como fonte de carbono e energia (SANCHEZ, 2009).

1.1.1. Celulose

Celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polímero formado por monômeros de glicose unidos por ligações do tipo β -1,4 com papel estrutural, conferindo à célula proteção osmótica e resistência mecânica. É um dos principais constituintes da parede celular das plantas (33% do peso seco da planta), em combinação com a lignina, hemicelulose e pectina. A celulose foi primeiramente isolada e caracterizada pelo químico francês Anselme Payen em 1838 (BAYER & LAMED 1992; RUEGGER & TAUKE-TORNISIELLO, 2003).

Aproximadamente cem unidades de glicose formam microfibrilas que se empacotam ou se conectam por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e por forças de Van der Waals, formando fibras rígidas e insolúveis. As microfibrilas apresentam regiões onde as fibras se encontram ordenadas, apresentando alto grau de cristalinidade, denominada região cristalina e regiões onde as fibras estão mais distantes entre si, apresentando-se menos compactas, denominada de região amorfa (Figura 1). Além das regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas como a água e enzimas (LYND et al., 2002).

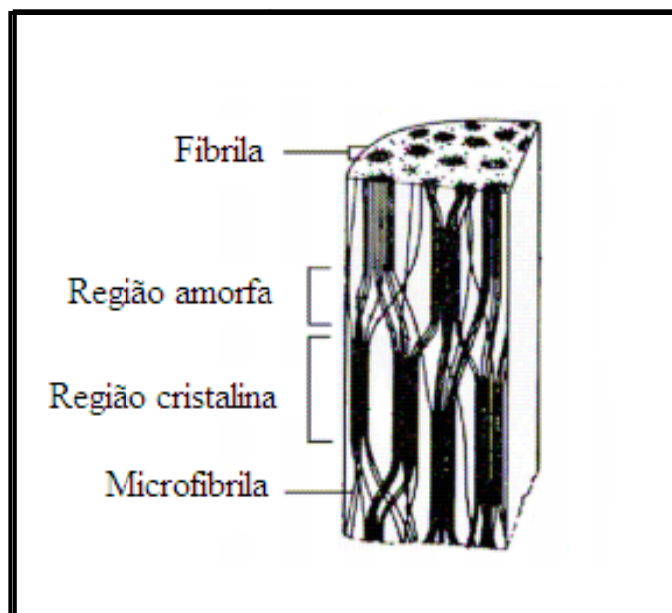


Figura 1. Esquema da fibra de celulose: estrutura da fibrila e microfibrila destacando as regiões cristalina e amorfa. Fonte: Cowling, 1963 (com modificação).

A extremidade da cadeia de celulose onde se encontra o carbono anomérico livre é chamada de extremidade redutora, e a extremidade em que o carbono anomérico não se encontra disponível é chamada de extremidade não redutora (Figura 2) (SANDGREN et al., 2005).

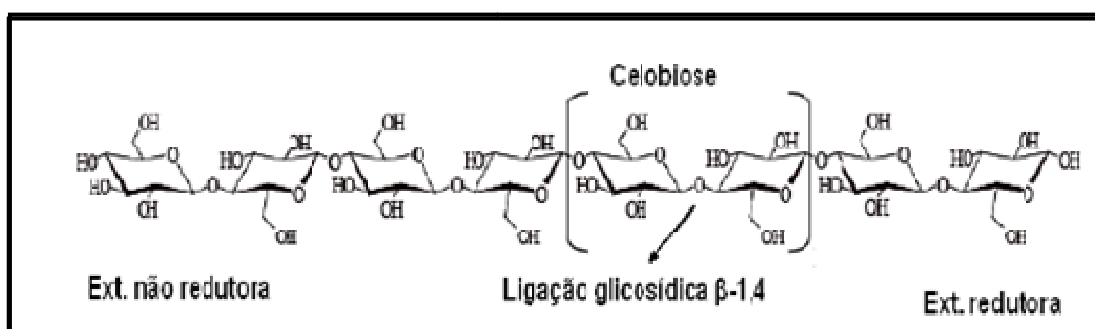


Figura 2. Estrutura da celulose mostrando: a extremidade redutora e não redutora, a ligação das unidades de glicose por ligações glicosídicas β -1,4 e a celobiose formada pela união de duas unidades de glicose (adaptado de TIMÁR-BALÁZSKI & EASTOP, 1998).

1.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose encontra-se associada à celulose e lignina na parede das células vegetais (TIMELL, 1967). A hemicelulose contribui, em geral, com 15–30% da biomassa vegetal sendo que em alguns tecidos de gramíneas e em xilanas de cereais podem representar até 50 % (EBRINGEROVA et al., 2005).

A hemicelulose representa um grupo de heteropolissacarídeos contendo diferentes resíduos de carboidratos (D-xilose, D-manose, D-glicose, ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico, D-galactose, L-arabinofuranose e L-ramnose), sendo geralmente formadas por 2 a 6 açúcares diferentes unidos por ligações do tipo β -1,4 (SANCHES, 2009; JANES, 1969). As hemiceluloses são classificadas, de acordo com a identidade dos principais açúcares presentes, como glucanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (BASTAWDE et al., 1992; PULLS, 1997; THOMPSON et al., 1983). Outros açúcares como α -L-ramnose e α -L-fucose podem também estar presentes em pequenas quantidades e grupos hidroxilas de açúcares podem ser parcialmente substituídos com grupos acetil.

Hemiceluloses de madeira dura ou de “hardwood” contêm mais xilanas, enquanto que hemiceluloses de madeira mole ou de “softwood” contêm principalmente glucomananas (McMILLAN, 1993; EBRINGEROVA et al., 2005).

1.1.2.1. Xilana

A xilana é a principal hemicelulose presente na parede celular das plantas, sendo, após a celulose, o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza (WHISTLER & RICHARDS, 1970).

Em plantas, situa-se entre a lignina e as fibras de celulose, formando ligações covalentes com a lignina e ligações de hidrogênio com as fibras de celulose (BIELY, 1985; JOSELEAU et al., 1992). A camada de xilana tem relevante importância para a manutenção da integridade das fibras de celulose protegendo-as do ataque de celulasas (UFFEN, 1997).

A xilana é um heteropolissacarídeo formado por uma cadeia principal de resíduos de D-xilopirranose unidos por ligações do tipo β -1,4 contendo cadeias laterais nas posições 2 e 3 de resíduos α -L-arabinofuranose, ácido D-glucurônico ou grupamento

acetil (ASPINALL, 1959; COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993). Considerando o tipo de ramificação presente na cadeia central, as xilanas podem ser denominadas de arabinoxilanas, glucuronoxilanas, arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilana (DEKKER, 1989). Nas angiospermas (madeira dura ou "hardwood") a xilana representa de 15 a 30 % do peso seco da planta e encontra-se na forma de glucuronoxilana, nas gimnospermas (madeira mole ou "softwood") representa de 5 a 10% da biomassa seca; nas gramíneas, cereais e madeira mole ou "softwood" encontra-se na forma de arabinoglucuronoxilana representando 5- 10 % da biomassa seca da planta; e são encontradas principalmene nos cereais na forma de arabinoxilanas representando 0,15 a 30% da biomassa (Tabela 1) (COLLINS et al., 2005).

Tabela 1. Estrutura dos diferentes tipos de xilana.

Tipo de Polissacarídeo	Origem Biológica	Biomassa Seca (%)	Representação Esquemática
Glucuronoxilana	Madeira dura	15 - 30	
Arabinoglucuronoxilana	Gramíneas, cereais e madeira mole	05-10	
Arabinoxilana	Cereais	0,15-30	
Glucuronoarabinoxilana	Gramíneas e cereais	15-30	
Homoxilana	Algas	-	

Fonte: Girio *et al.*, 2010.

- : grupamento acetil; : ácido glucurônico; : D-xilose; : rabinofuranose;
- : ácido ferúlico.

A xilana de madeira dura é bastante acetilada, sendo que a acetilação ocorre mais usualmente no C-3 do que no C-2 (BEG et al., 2000 ; BOUVENG, 1961; LINDBERG et al., 1973). Os grupos acetil são responsáveis pela solubilidade parcial da xilana em água, e são facilmente removidos quando a xilana é submetida à extração alcalina (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; DEKKER, 1989; WHISTLER & RICHARDS, 1970). Os principais tipos de xilana estão apresentados na Tabela 1 e Figura 3 e todos consistem de uma cadeia principal de resíduos de xilose contendo diferentes grupamentos químicos como ramificações (Figura 3, Tabela 1) (DEKKER, 1989).

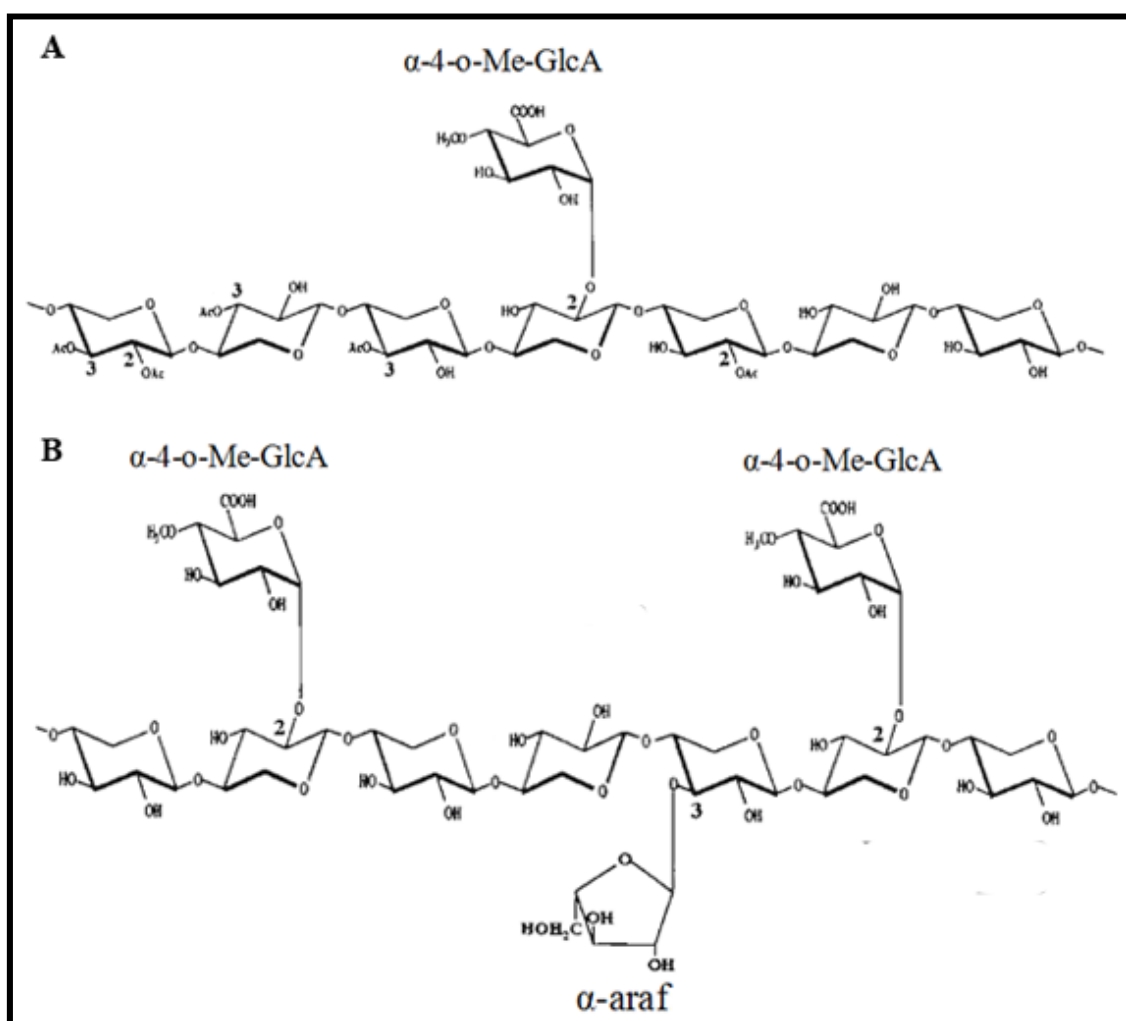


Figura 3. Estrutura de xilana de madeira dura e madeira mole. Em **A**: Composição da glucuronoxilana de madeira dura. Em **B**: Composição da arabinoglucuronoxilana de madeira mole. Os números indicam os átomos de carbono em que as substituições ocorrem. Ac: grupo acetil; α -4-o-Me-GlcA: ácido glucurônico; α -araf: α -arabinofuranose. Fonte: SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997 (adaptado).

1.1.3. Lignina

A lignina encontra-se ligada a ambas, celulose e hemicelulose formando um lacre físico, constituindo dessa forma, uma barreira impenetrável na parede celular da planta, servindo de suporte estrutural, conferindo impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo. Consiste de um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e opticamente inativo, formado basicamente de unidades de fenil propano. Possui na sua estrutura 9 átomos de carbono derivados do álcool cinamil substituído (SANCHES, 2009).

1.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E HEMICELULOSE

Vários microrganismos produzem um complexo de enzimas envolvidas na degradação da fração de celulose e hemicelulose da biomassa vegetal. As celulases e xilanases são as enzimas responsáveis pela hidrólise enzimática destes polissacarídeos e são produzidas por microrganismos encontrados em diversos grupos taxonômicos, em sua maioria eubactérias e fungos filamentosos, desempenhando papel importante na biosfera e participando do ciclo do carbono através da reciclagem da celulose e da xilana (LYND et al., 2002).

1.2.1. Hidrólise Enzimática da Celulose

A hidrólise enzimática da celulose em açúcares solúveis é um processo que envolve a ação de um complexo multienzimático denominado sistema celulolítico (DAIROT, 2007). As enzimas do sistema celulolítico foram classificadas com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose, em fungos e compreendem três classes de enzimas hidrolíticas: as endoglicanases (EGLs - EC 3.2.1.4) clivam ligações internas nas microfibrilas que se encontram nas regiões amorfas da fibra de celulose, diminuindo o comprimento das mesmas e, conseqüentemente, gerando novas extremidades livres; as exoglicanases ou celobiohidrolases (CBHs - EC 3.2.1.- ; EC 3.2.1.91) agem de maneira progressiva nas extremidades redutoras (CBHI) ou não-redutoras (CBHII) da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente moléculas de celobiose como produtos; as β -glicosidases (BGLs - EC 3.2.1.21) atuam nos celooligossacarídeos e celobiose liberados e os hidrolisam a glicose (TEERI, 1997; LYND et al., 2002) (Figura 4).

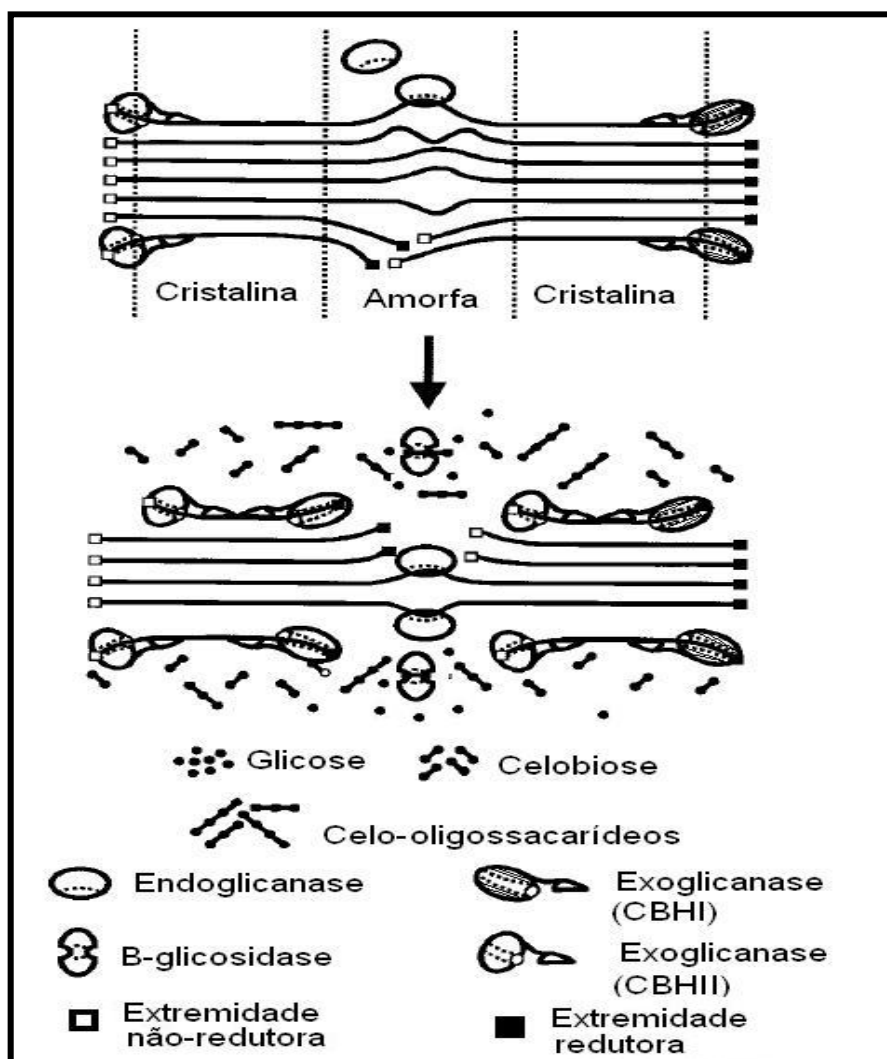


Figura 4. Representação esquemática da hidrólise das regiões cristalinas e amorfas da celulose.

1.2.1.1. Celobiohidrolases

As celobiohidrolases (CBHs) já foram identificadas em diferentes gêneros de fungos como *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus* e outros (SCHULEIN, 1997). As CBHs são as principais enzimas do complexo celulolítico do fungo *Trichoderma reesei*; e são produzidas em maior quantidade do que as outras celulasas do complexo, sendo que a CBH I e a CBH II (EC 3.2.1; EC 3.2.1.91) representam 60% e 20% respectivamente do total de celulasas produzidas por esse fungo (WOOD, 1992). O processo de hidrólise enzimática da celulose pode ser vista na Figura 4.

As CBHs possuem um papel central na degradação da celulose insolúvel ou microcristalina, atuando nas extremidades redutoras (CHBI) e não redutoras do polímero de celulose (CBH II). Estas enzimas possuem um domínio de ligação ao substrato conectado ao domínio catalítico por uma dobradiça (Figura 5). Embora os domínios de ligação à celulose não sejam essenciais para a atividade catalítica, eles modulam a atividade específica das enzimas em substratos celololíticos solúveis e insolúveis. O domínio de ligação à celulose (CBD) se liga na celulose cristalina enfraquecendo as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas, ajudando na separação das mesmas e na progressão da enzima. As enzimas que possuem o CBD apresentam melhor atividade sobre substratos insolúveis, principalmente sobre celulose cristalina, mas em substratos solúveis a falta do CBD não afeta a atividade enzimática. As CBHs atuam em sinergismo com as endoglicanases (EGLs) e os produtos de hidrólise são glicose e principalmente celobiose (TEERI, 1997; LYND et. al., 2002; HOU et al., 2007).

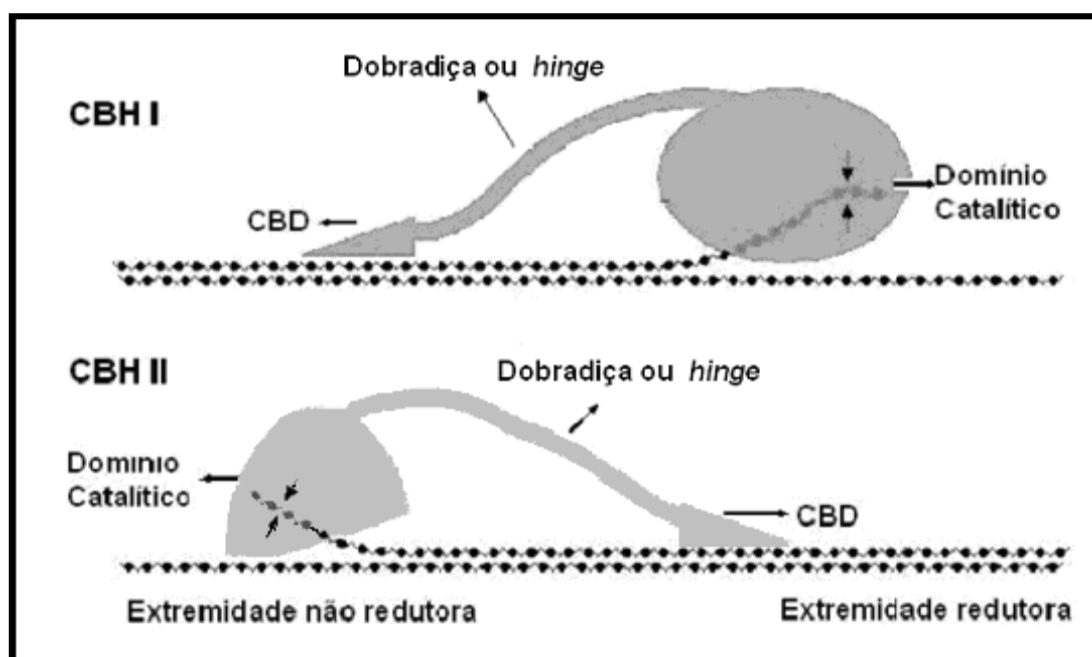


Figura 5. Estrutura dos domínios das celobiohidrolases (domínio catalítico e CBD), unidos por uma região denominada de dobradiça ou *hinge*. As CBH I e II atuam respectivamente nas extremidades redutora e não redutora das fibras de celulose. Fonte: Harris, 1999.

A massa molecular das celobiohidrolases varia entre 38 e 128 kDa, e de uma maneira geral, exceto pela termoestabilidade, as características moleculares das celobiohidrolases são similares para fungos termofílicos e mesofílicos (TAKASHIMA et al., 1995; MAHESHWARI et al., 2000; HAYASHIDA et al., 1988a). Em fungos termofílicos apresentam temperatura ótima entre 50 e 75 °C, sendo frequentemente estáveis na faixa entre 55 e 60 °C. As celobiohidrolases do tipo CBH I do fungo *Humicola insolens* apresentam pH ótimo entre 5 e 6 e para as CBH II, o pH ótimo é de 9 (SCHÜLEIN, 1997).

1.2.1.2. Endoglicanases

As endoglicanases são encontradas em vários organismos, desde fungos e bactérias até protozoários, plantas, bactérias simbiotes de planta, nematódeos e cupim (TAKENAKA et al., 1999; SUDA & GIOGINI, 2003; LAMA et al. 2004; BÉRA-MAILLET et al., 2000; NAKASHIMA & AZUMA, 2000). Os fungos produzem uma variedade de endoglicanases o que garante ao microrganismo que as produz, atividade sobre diferentes substratos, sendo que algumas delas possuem atividade em xiloglucanas (SUDA & GIOGINI, 2003; LYND et al, 2002). O fato das endoglicanases atuarem sobre xiloglucanas permite que estas enzimas hidrolisem hemicelose, ajudando a remover a barreira de lignina e permitindo melhor ação do sistema celulolítico sobre a celulose cristalina. (LYND et al, 2002). Apesar da importância das endoglicanases na hidrólise da celulose, estas enzimas não representam as celulasas mais produzidas por fungos, representam apenas 20% do total de celulasas produzidas pelo fungo *T. reesei* (LYND et al., 2002).

1.2.1.3. β -glicosidases (BGLs)

Os estudos com BGLs têm sua origem na década de 50 por causa do seu envolvimento na conversão biológica da celulose (ZANOELO, et. al., 2004). O nome β -glicosidase é dado a diferentes tipos de enzimas capazes de hidrolisar ligações β -glicosídicas em dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados, sendo que a afinidade por um substrato específico depende da origem, da função fisiológica e da localização da enzima (WOODWARD & WISEMAN, 1992).

As BGLs constituem um grupo de enzimas hidrolíticas que podem ser encontradas tanto em eucariotos quanto em procariotos desde bactérias, fungos, plantas, animais e no próprio homem desempenhando funções diversas (WOODWARD & WISEMAN, 1982; KATAYEVA et al., 1992). Nas plantas, as β -glicosidases atuam na hidrólise de precursores de hormônios, na

degradação de componentes da parede celular em processos de amadurecimento de frutos, germinação de sementes e desenvolvimento de embriões, na emissão de aromas (fragrâncias) em flores, além de participarem no controle de movimentos foliares (DAIROT, 2007).

Em sinergismo com as outras enzimas do complexo celulolítico, as BGLs apresentam um papel essencial na hidrólise total da celulose convertendo celobiose em glicose e podem ser consideradas como limitantes para a hidrólise enzimática da celulose (BERGHEM & PETTERSSON, 1974).

1.2.2. Hidrólise Enzimática da Hemicelulose

A xilana representa a principal classe de hemicelulose. Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, a sua completa hidrólise requer uma ampla variedade de enzimas agindo cooperativamente para convertê-la em unidades de xilose. As arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), hidrolisam o grupo terminal não redutor de arabinofuranose de arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas. As glucuronidases (EC 3.2.1) hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo α -1,2 entre a xilose e o ácido glucurônico. A completa hidrólise de xilanas requer a ação de esterases que quebram as ligações da xilose com o ácido acético (acetil-xilana esterase - EC 3.1.1.6), as ligações entre os resíduos de arabinofuranose com ácido fenólico (ácido fenólico esterase e ácido cumárico (ácido p-cumárico esterase - EC 3.1.1). As endoxilanases hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidase. Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades de xilose (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002).

1.2.2.1. Endoxilanases

As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. As características, o modo de ação da enzima e os produtos da hidrólise variam de acordo com sua origem, já que as endoxilanases podem ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos, como fungos e bactérias (BASTAWDE, 1992).

As informações disponíveis, na literatura, sobre as propriedades bioquímicas das endoxilanases são elucidadas predominantemente dos estudos com as endoxilanases bacterianas e fúngicas. Estas são enzimas monoméricas com massa molecular entre 8 e 145 kDa e apresentam, na sua maioria, atividade ótima em temperaturas entre 40 e 60 °C, sendo que as enzimas fúngicas apresentam maior estabilidade; somente um pequeno

número de endoxilanases microbianas apresenta atividade ótima em temperaturas acima de 80 °C (DUSTERHOFT et al, 1997; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). As endoxilanases fúngicas são usualmente estáveis em uma ampla faixa de pH (4 a 7); ponto isoeletrico pI variando de 3 a 10 (SUBRAMANYAN & PREMA, 2002).

As endoxilanases são classificadas juntamente com as glicosil-hidrolases em famílias de acordo com a similaridade da estrutura primária do domínio catalítico (HENRISSAT & BAIROCH, 1993). Como a estrutura primária é relacionada com a estrutura tridimensional e o mecanismo de ação da enzima, esta classificação reflete características estruturais e funcionais. Atualmente as endoxilanases são classificadas nas famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43. Os membros destas famílias diferem em suas propriedades físico-químicas, estruturais, modo de ação e especificidade ao substrato. As endoxilanases das famílias 10 e 11 são as mais estudadas até o momento, sendo que a família 11 é formada somente por xilanases verdadeiras, pois hidrolisam somente polímeros de xilose. As endoxilanases da família 10 constituem enzimas com altas massas moleculares (> 30 kDa) e baixo pI. As enzimas da família 11 são geralmente caracterizadas por pI alto e baixa massa molecular. Estas enzimas são mais ativas em xilo-oligossacarídeos de cadeias longas e apresentam fendas largas de ligação ao substrato (COLLINS et al., 2005).

As endoxilanases podem ser consideradas como específicas quando hidrolisam somente as ligações β -1,4 dentro da cadeia principal de xilana ou não específicas quando hidrolisam ligações glicosídicas, cruzadas, do tipo β -1,4 de outros polímeros adjacentes como as da celulose microcristalina. As endoxilanases hidrolisam a xilana a xilo-oligossacarídeos e xilobiose (dímero de xilose), que é o substrato para a β -xilosidase. Algumas enzimas somente atuam na cadeia central de xilana (não ramificadoras), enquanto que outras hidrolisam as ramificações de arabinofuranose também (ramificadoras) (COUGHLAN, 1992).

1.2.2.2. β -xilosidases

Na hidrólise da xilana, as β -xilosidases clivam as ligações glicosídicas dos xilo-oligossacarídeos liberando xilose, apresentando papel semelhante ao das β -glicosidases na hidrólise da celulose (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

β -xilosidases de uma variedade de microrganismos, como fungos e bactérias, têm sido descritas. Elas se encontram associadas à célula na maioria das bactérias e leveduras, mas encontram-se livre no meio de cultura de alguns fungos (RANSOM &

WALTON, 1997; HAYASHI et al., 2001; LAMA et al., 2004; KATAPODIS et al., 2006). Embora, muitas β -xilosidases de fungos mesofílicos têm sido estudadas, apenas algumas de fungos termofílicos foram purificadas e caracterizadas. Destas, incluem β -xilosidases do fungo termofílico *Humicola grisea*, *Scytalidium thermophilum*, e *Sporotrichum thermophile* (ALMEIDA et al., 1995; LEMBO et al., 2006; ZANOELO et al., 2004; KATAPODIS et al., 2006).

A maioria das β -xilosidases microbianas purificadas exibem massa molecular acima de 100 kDa, embora algumas exibem massas moleculares baixas. Muitas β -xilosidases fúngicas tem massas moleculares altas e podem ser monoméricas ou compostas por várias subunidades idênticas (ITO et al., 2003; ENEYSKAYA et al., 2007; ZANOELO et al., 2004; KATAPODIS et al., 2006; ENEYSKAYA et al., 2007; LO et al., 2004; LEMBO et al., 2006).

1.2.2.3. Arabinofuranosidase (AF)

Estas enzimas são parte do sistema enzimático xilanolítico necessário para a completa hidrólise de heteroxilanas (KAJI, 1984). L-Arabinofuranosidase (α -L-arabinofuranosideo arabinofuranohidrolase, EC 3.2.1.55, AF) é uma enzima acessória envolvida na liberação de resíduos de L-arabinofuranose substituídos nas posições 2 e 3 dos resíduos de xilose da cadeia central de arabinoxilanas, arabinanas, arabinoglucuronoxilana e arabinogalactanas (KAJI, 1984). α -L-arabinofuranosidases são produzidas por bactérias, incluindo actinomicetos, por fungos e por plantas.

Tajana e colaboradores (1992) purificaram duas α -L-arabinosidases da cepa não-esporulante *Streptomyces diastaticus* ET apresentando massas moleculares de 38 kDa (C1) e 60 kDa (C2) e pI de 8,8 e 8,3, respectivamente, com pH ótimo entre 4 e 7. As enzimas purificadas hidrolisaram p-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo e liberaram arabinose de arabinoxilana e de uma β -1,5-arabinana não ramificada. O cultivo da bactéria foi realizado por fermentação submersa na presença de diversos substratos como manitol, soja, xilana oat spelt, ou farelo de trigo (FT) para indução da produção de arabinofuranosidases. Dos substratos testados, o FT mostrou ser o melhor indutor de arabinofuranosidases..

1.2.2.4. α -Glucuronidase

α -Glucuronidase (EC 3.2.1) hidrolisa ligações do tipo α -1,2 entre os resíduos de ácido glucurônico e unidades de xilose. Esta enzima exibe atividade máxima somente na presença de

pequenos substratos de glucuronoxilana. No entanto, sua especificidade ao substrato pode variar dependendo da fonte microbiana, e algumas glucuronidases são capazes de hidrolisar somente o polímero intacto, devido a presença de grupos acetil próximos aos substituintes de ácido glucurônico (TENKANEN & SIIKA-ABO, 2000).

1.2.2.5. Acetilxilana esterase

Acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6) remove os grupos O-acetil das posições 2 e/ou 3 dos resíduos β -D-xilopirranose de acetilxilana. Esta enzima foi descoberta tardiamente, provavelmente, devido à extração alcalina usada frequentemente com xilanas altamente acetiladas (BLUM et al., 1999). Acetilxilana esterase tem um papel muito importante na hidrólise da xilana, já que os grupos laterais acetil podem interferir com o modo de ação das enzimas que clivam a cadeia principal através de uma dificuldade estérica, assim a clivagem dos grupos acetil facilita a ação das endoxilanas (Figura 6) (BLUM et al., 1999).

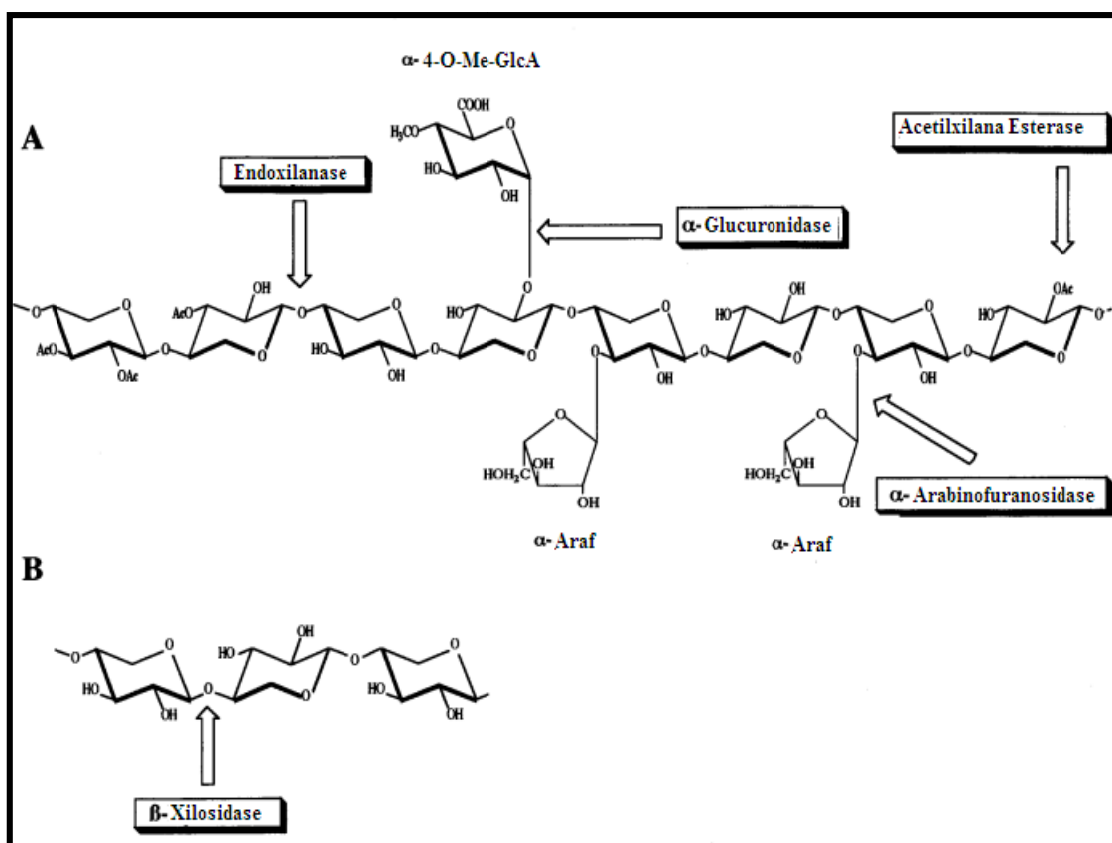


Figura 6. (A) Enzimas xilanolíticas envolvidas na hidrólise da xilana. Ac: grupo acetil; α -raf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: α -4-O-metilglucurônico (ácido glucurônico). (B) hidrólise de xilo-oligossacarídeos por β -xilosidase. Fonte: SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997 (com modificações).

1.3. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILANASES E CELULASES

As hidrolases compreendem aproximadamente 75% do total de enzimas comercializadas, incluindo celulasas, amilases e hemicelulasas, constituindo o segundo maior grupo, após as proteases. As endoxilanases constituem as principais hemicelulasas comerciais, atraindo atenção devido ao seu potencial para uso em diversas aplicações, cobrindo os três setores do mercado de enzimas industriais, têxtil, alimentício e rações para animais (BHAT, 2000). Outras aplicações menos documentadas incluem: fermentação da cerveja; na extração de café e na preparação de café solúvel; em detergentes; na produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos para uso como agentes antimicrobianos ou antioxidantes (TIKHOMOROV et al., 2003; WONG et al., 1988; KAMAL et al., 2004; RYTTERSGAARD et al., 2002 ; KATAPODIS et al., 2003).

A utilização de enzimas em rações animais é um setor de relevante importância no agronegócio, sendo que as xilanases usadas juntamente com glucanases, pectinases, celulasas, proteases, amilases, fitases, galactosidasas e lipases degradam a porção de arabinoxilana presente na ração, reduzindo a viscosidade do material bruto e aumentando a digestibilidade da ração (POLIZELI et al., 2005).

Na indústria têxtil, as xilanases livre de celulasas, podem ser utilizadas nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal e refinamento de polpas para a produção de tecidos como a viscose “rayon”. Nestes processos, as enzimas são usadas com o objetivo de facilitar a separação das fibras de celulose da matriz celular e remoção da lignina (MILAGRES & PRADE, 1994).

Uma das principais aplicações das endoxilanases é na indústria de papel e de celulose na etapa de branqueamento da polpa da celulose para produção de papel. O processo convencional usado por vários países, inclusive o Brasil, utiliza substâncias químicas como dióxido de cloro e cloro, gerando um efluente que não pode ser facilmente reciclado e contém grande quantidade de compostos organoclorados com efeitos altamente tóxicos e carcinogênicos (VIIKARI et al., 1994). A aplicação de xilanases em uma etapa anterior ao branqueamento convencional consiste na hidrólise da xilana, facilitando a remoção da lignina que se encontra ligada a ela através da desestruturação e rompimento das ligações físico- químicas. O emprego de xilanases no processo de biobranqueamento da polpa de celulose representa uma redução de aproximadamente 34% da quantidade de cloro utilizada na etapa inicial e ainda, uma

redução de 15 a 20% de organoclorados nos efluentes (PAICE et al., 1988; POLIZELI et al., 2005).

O uso das xilanases foi introduzido na indústria da panificação nos anos 70 (KULP, 1968). A AX é o principal tipo de hemicelulose encontrada na farinha de trigo (2-3%), sendo responsável por mais de 30% da capacidade de ligação da farinha com a água. O volume dos pães é considerado o parâmetro tecnológico mais importante devido a sua relação com as propriedades organolépticas (CAMACHO & AGUILAR, 2003). O uso de xilanases no preparo da massa está relacionado com o aumento de 14-60% no volume específico em comparação com pães não suplementados (GRUPPEN et al., 1993; CAMACHO & AGUILAR, 2003; SHAH et al., 2006). O aumento de 60 % no volume específico está relacionado com uso da xilanase termoestável de *T. maritima* que tem uma ação prolongada na hidrólise da arabinoxilana até o cozimento, sua ação pode ocorrer até a temperatura do interior da massa ultrapassar 90 °C, contribuindo para uma maior expansão dos pães no forno (JIANG et al., 2005a).

Resíduos de xilose, produtos da hidrólise da xilana, podem ser fermentados por levedura como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* para a produção de etanol ou xilitol. O xilitol é um poliálcool com poder adoçante comparável com a sacarose, utilizado como adoçante não cancerígeno recomendável para diabéticos e indivíduos obesos (POLIZELI et al., 2005).

As xilanases, também, são utilizadas na extração de café, formulação de detergentes e na produção de polissacarídeos com atividade farmacológica para o uso como agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes (COLLINS et al., 2005).

As celulasas assim como as xilanases possuem um grande potencial biotecnológico, podendo ser empregadas nas indústrias alimentícias, de rações animais, têxtil e de detergentes, na reciclagem de papel, além da possibilidade de aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais para a produção de etanol (BHAT, 2000).

Na indústria têxtil, as celulasas são empregadas nas fases de fiação, tingimento e acabamento dos tecidos para a redução das pilosidades, remoção do excesso de tinta e melhoramento das características da aparência e da maciez do Jeans (DILLON, 2004). Outro grande potencial biotecnológico das celulasas consiste no processo de reciclagem de papel, onde conseguem remover com eficácia partículas de tinta aderidas à superfície das fibras e favorecendo a alvura do papel (BHAT, 2000).

A sacarificação de resíduos lignocelulósicos por celulases, para a posterior produção de etanol de segunda geração, também chamado de etanol celulósico representa uma busca incessante por pesquisadores de vários países do mundo, no sentido de encontrar novas fontes alternativas aos combustíveis fósseis. A utilização ou reutilização da biomassa vegetal, além de reduzir a emissão de CO₂ na atmosfera, agrega valor à matéria e contribui para reduzir o impacto ambiental ocasionado pelo acúmulo de resíduos lignocelulósicos gerados em grande escala anualmente (LIN & TANAKA, 2006; PANDEY, 2000).

1.4. PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES FÚNGICAS

Há uma grande variedade de microrganismos envolvidos na produção de celulases e xilanases como fungos, bactérias aeróbias e anaeróbias (TANAKA et al., 2009; DASHTBAN et al., 2009; LJUNGDAHL & GILKES, 1991).

A produção do complexo de enzimas capaz de hidrolisar a celulose e a hemicelulose tem sido amplamente estudada em fungos, sendo estabelecido que a regulação da mesma está sujeita a indução, repressão catabólica na presença de glicose e expressão constitutiva destas enzimas (KULKARNI et al., 1999; SUTO & TOMITA, 2001). O crescimento de um microrganismo em uma fonte de carbono favorável, como a glicose, reprime a síntese de enzimas requeridas para o metabolismo de fontes de carbono alternativas como a xilana ou celulose. Assim, em geral, a produção das xilanases é reprimida pela glicose e induzida pela xilana, a produção de celulases é reprimida na presença de altas concentrações de glicose e induzida na presença de diversos indutores, como celulose e celobiose (KULKARNI et al., 1999).

Os fungos produzem altos níveis de celulases em meio contendo celulose, substratos lignocelulósicos, além de celobiose, sofrorose, gentiobiose e outros dissacarídeos. A produção de xilanases é observada em meios contendo xilana, substratos lignocelulósicos, além de xilobiose, xilotriose e xilotetrose (BÉGUIN, 1990; MANDELS & PARRISH, 1962; BASTAWDE, 1992; KULKARNI et al., 1999).

Uma vez que a celulose e a xilana não conseguem atravessar a membrana celular microbiana; o fungo produz celulases e xilanases constitutivas que são secretadas e clivam inicialmente os polissacarídeos. São geradas moléculas menores que penetram na célula e são responsáveis pela expressão dos genes das enzimas do sistema celulolítico e

xilanolítico. A maneira como estes fragmentos de substrato induzem a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas vem sendo estudado há décadas (KULKARNI et al. 1999). Segundo Mandels & Reese (1960), a celobiose gerada pela ação das endo e exoglicanases constitutivas sobre a celulose é responsável pela indução da produção das outras enzimas do sistema celulolítico pelo fungo *T. reesei*. Similarmente, xilanases constitutivas secretadas para o meio degradam parte da xilana em fragmentos de baixo peso molecular como xilose, xilobiose, xilotriose que penetram na célula sustentando o crescimento do fungo agindo como fonte de energia e de carbono, induzindo a síntese de mais xilanases (BASTAWDE, 1992).

Segundo, Wang e colaboradores (1992) e Gomes e colaboradores, (1994), os xilo-oligômeros liberados a partir da hidrólise da xilana pela ação de xilanases constitutivas, são transportados diretamente para dentro da matriz celular, sendo em seguida, degradados pela ação da β -xilosidase intracelular que libera os resíduos de xilose; ou estes xilo-oligômeros são hidrolisados a monômeros durante o seu transporte para dentro da matriz celular através da ação de β -xilosidases presentes no espaço periplasmático (SUBRAMANYAN & PRENA, 2002).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de analisar a indução da produção de celulasas e hemicelulasas em diferentes microrganismos, sendo o complexo celulolítico secretado pelo gênero *Trichoderma*, o mais estudado em toda a literatura, devido a produção de endoglicanases e celobiohidrolases com alta atividade enzimática (KARAFFA et al., 2006).

Recentemente, os substratos lignocelulósicos têm sido muito utilizados pelos pesquisadores para a indução da produção de diferentes enzimas celulolíticas e xilanolíticas por diversos fungos. Diferentes substratos induzem a produção de diferentes complexos enzimáticos, já que estes apresentam diferenças quanto ao conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina (SANCHEZ, 2009).

Sabugo de milho (SM), palha de arroz (PA), bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e farelo de trigo (FT) e outros substratos lignocelulósicos têm se mostrado eficiente para a indução da produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas por alguns fungos como *Aspergillus awamori*, *T. reesei*, *A. niger*, *Penicillium purpurogenum*, *H. grisea* e outros (HALTRICH et al. 1996; SANCHEZ, 2009). Diferentes resíduos lignocelulósicos induzem a produção de diferentes enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico desde que apresentam diferentes composições de celulose além de diferentes tipos de hemicelulose (Tabela 3).

Tabela 2. Composição da parede celular dos substratos: SM, PA, BCA e FT

Resíduo Lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
SM	45	35	15	HOWARD et al.(2003)
PA	32,1	24	18	HOWARD et al.(2003)
BCA	32-44	27-32	19-24	ROWELL (1992)
FT	29-35	26-32	16-21	ROWELL (1992)

Fonte: Sanchez, 2009. SM: sabugo de milho; PA: palha de arroz; BCA: bagaço de cana-de-açúcar; FT: farelo de trigo; NA: não avaliado.

O fenômeno da repressão catabólica ocorre devido a formação de uma cascata de sinais no interior da célula iniciada pela presença da molécula sinal (glicose), causando a ativação da molécula repressora, esta molécula se liga na região promotora dos genes de celulase e xilanase bloqueando a transcrição e expressão destes genes. A repressão catabólica tem sido observada em muitos microrganismos, mas amplamente estudada em *S. Cerevisae*. Proteínas repressoras catabólicas MIG1 são descritas em leveduras como *S. cerevisiae* e a proteína repressora CreA tem sido descrita em *A. nidulans* (RONNE, 1995; RUIJTER & VISSER, 1997; OZCAN & JOHNSTON, 1999; STRAUSS et.al., 1995; ILMÉM, 1996). Genes homólogos ao gene creA de *A. nidulans* foram clonados de *A. niger*, *T.reesei* e *H. grisea* (CUBERO & SCAZZOCCHIO, 1994; TAKASHIMA et al., 1996 ; TAKASHIMA et al., 1998). A repressão catabólica mediada por CreA em *A. nidulans* é o único exemplo bem conhecido a nível molecular (CUBERO & SCAZZICCIO, 1994; MARCH et. al.,1996).

1.4.1. Processos fermentativos para a produção de celulasas e xilanasas fúngicas

Estudos atuais têm testado o uso de resíduos agroindustriais como matéria-prima para a produção de celulasas e xilanasas por fungos como *T. reesei*, *A. niger* e outros, por fermentação líquida (FL) e fermentação sólida (FS), principalmente. Estes trabalhos têm avaliado a influência de vários parâmetros na fermentação como o tipo de substrato lignocelulósico, influência do pH, temperatura de incubação e suplementação do meio de cultura com fonte de nitrogênio (SINGHANIA, R. R., et al., 2009; NIEVES et al., 2009; KABEL et al., 2005).

A fermentação sólida (FS) é um processo pelo qual o microrganismo é cultivado na presença de um substrato insolúvel com baixa umidade e sem água livre enquanto que na fermentação líquida (FL) o microrganismo é cultivado na presença do substrato solubilizado ou suspenso em grande volume de água em diferentes concentrações finais (CHAHAL, 1982; HESSELTINE, 1976).

O desenvolvimento de processos econômicos para a produção de celulases é impedido devido aos altos custos do substrato (celulose pura), alto preço de alguns reagentes do meio de cultura como a peptona e baixos rendimentos de celulases por unidade de celulose. Para superar estes gargalos, Chahal e colaboradores (1985) utilizaram resíduos agrícolas, resíduos de madeira e FT como fonte de celulose. Os resultados obtidos indicaram um aumento na produção de celulase de 250 (FL) para 430 UI/g de celulose (FS) quando o fungo *T. reesei* QMY-1 foi cultivado em FT. Representando, portanto, um aumento de 72% a favor da FS.

A literatura sobre a produção de celulases por *T. reesei* indica que vários mutantes deste fungo são capazes de produzir até 250 UI/g de celulose por FL. O alto rendimento de celulase (290 UI/g de celulose) pelo mutante Rut-C30 é registrado por Tanguy e colaboradores (1981).

Haltrich e colaboradores (1996) compararam a produção de xilanases pelo fungo *A. niger* por FS e FL. Os rendimentos na produção de xilanases por *A. niger* foram menores na FS do que na FL (DESCHAMPS & HUET, 1985). Nos trabalhos desenvolvidos por Tuohy e colaboradores (1990) e Purkarthofer e colaboradores (1993), os fungos *Talaromyces emersonii* e *Thermomyces lanuginosus* foram cultivados por FS e FL; os resultados obtidos apresentaram maior produtividade de xilanases por FS, enquanto o cultivo líquido apresentou os melhores resultados sobre rendimentos enzimáticos, considerando unidade por grama do substrato.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de analisar a produção de celulases e xilanases por FL por fungos cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos: uma linhagem mutante de *A. awamori* VTT-D-75028 foi cultivada na presença de 3% de FT, e observou-se a produção de xilanase (12,0 U/mL), FPase (2,52 U/mL) e CMCase (13,37 U/mL); quando *Cephalosporium* sp. NLC 87.11 foi cultivado em 5 % de FT, observou-se a produção de xilanases (36,2 U/mL), FPases (0,03 U/mL) e CMCases (0,05 U/mL); *Fusarium oxysporum* NTG-19 cultivado em 3% de FT foi capaz de produzir xilanases (3,7 U/mL), CMCase (0,7 U/mL) e FPase (0,1 U/mL);

Talaromyces stipitatus cultivados na presença de 2% de FT foi capaz de produzir xilanase (2,24 U/mL), após nove dias de incubação; quando o fungo *Cellulomonas flavigena* foi cultivado na presença de BCA e xilana de “birch-wood” observou-se a maior produção de xilanases na presença de BCA; o filtrado de cultura do fungo *A. niger* KKS cultivado em 1% de PA apresentou atividades de xilanase (13,8 U/mL), FPase (3,9 FPU/mL), CMCase (1,2 U/mL); *A. niger* NRCC 401129 cultivado em 1% de FT apresentou atividade de xilanase 27,1 U/mL; *Penicillium janthinellum* 87M-1 cultivado em 2,3% de BCA produziu xilanase (36,8 U/mL), FPase (0,03 FPU/mL) e CMCase (0,35 U/mL); *A. fumigatus*, cultivado na presença de vários substratos como SM, BCA, FT e PA produziu maior quantidade de β -xilosidase quando foi utilizado SM e FT em temperatura mais elevada (42 °C) (POUTENEN et. al., 1987; BANSOD et al., 1993; MANDALARI et al., 2008; PERES-AVALOS et al., 1996; KANG et al., 1995; JOHNSON et al., 1989; MILAGRES & DURAN 1992; LENARTOVICZ et al., 2003).

1.5. FUNGOS FILAMENTOSOS

Fungos filamentosos podem ser encontrados em larga escala na natureza em diversas partes: no solo, nos vegetais, nos grãos, nos animais, e normalmente crescem na superfície destes materiais ou seres. Estes microrganismos apresentam morfologia complexa, exibindo diferentes formas estruturais durante seus ciclos de vida. Em geral, eles apresentam filamentos, as chamadas hifas, com paredes rijas, ricas em quitina, o mesmo material que reveste insetos como besouros. Essa estrutura vegetativa básica de crescimento consiste em um filamento tubular denominado hifa, originado da germinação de esporo reprodutivo. Com o crescimento da hifa, esta se ramifica repetidamente, formando uma massa de hifas denominada micélio (PAPAGIANNI, 2004).

Fungos têm capacidade de degradar inúmeras substâncias e esta capacidade está relacionada ao seu sistema enzimático inespecífico a qual é capaz de desestabilizar moléculas com grande estabilidade química, além do fato de lançarem as enzimas no substrato onde colonizam (PAPAGIANNI, 2004).

Conforme Lynd et. al, (2002) a utilização microbiana da celulose é responsável por um dos maiores fluxos de matéria na biosfera. Fungos filamentosos ocupam papel fundamental na degradação dos biopolímeros de celulose e hemiceluloses sendo por isso, essenciais para a manutenção do ciclo do carbono. Entretanto, poucos são os microorganismos que

produzem e secretam eficientemente um conjunto de enzimas capazes de degradar completamente a celulose e hemicelulose. Esse motivo explica, na natureza, a associação de microrganismos produtores de enzimas que interagem sinergisticamente para levar à bioconversão completa da celulose em glicose (BÉGUIN & AUBERT, 1994) ou da xilana em xilose (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002).

Além do papel significativo desempenhado pelos fungos filamentosos na reciclagem de compostos orgânicos, estes microrganismos apresentam outras propriedades importantes, participando da produção de alimentos e produtos relacionados à saúde humana (HAJJAJ, et. al 2000).

Atualmente vem crescendo o número de produtos comercialmente importantes produzidos por fungos. Muitos fungos filamentosos têm sido utilizados como ótimos produtores de inúmeras enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e outros metabólitos comercialmente importantes. Estes microrganismos têm sido amplamente explorados na produção de proteínas homólogas e, mais recentemente, proteínas heterólogas, devido a alta capacidade de seus mecanismos de secreção de proteínas (SUTO & TOMITA, 2001).

Na produção industrial de enzimas, cultivos submersos são normalmente utilizados, devido à facilidade de manejo e controle do processo. Contudo, o acúmulo de produtos finais inibe o crescimento celular e a formação do produto desejado na maioria destes processos (DAIROT, 2007).

Os fungos filamentosos tornaram-se microrganismos de preferência nas pesquisas visando a hidrólise enzimática de celulose e hemiceluloses em escala industrial, devido ao seu potencial de produção e secreção das enzimas do sistema celulolítico e não celulolítico, da sua versatilidade de cultivo em meios líquidos e sólidos, de alternativas diversas de manipulação genética e da variedade de seus produtos metabólicos (DAIROT, 2007)

1.5.1. FUNGO TERMOFÍLICO *Humicola grisea* var. *thermoidea*

Dentre várias espécies de microrganismos capazes de produzir celulasas e xilanases e degradar substratos lignocelulolíticos destaca-se o fungo do gênero *Humicola*. Chaves em 1982, isolou de compostagem uma linhagem de fungo celulolítico que apresentou produção de celulasas em alta temperatura. Este fungo foi classificado como sendo *H. grisea* var. *thermoidea*. Vários trabalhos têm sido realizados no Brasil utilizando linhagens obtidas

a partir desse isolado. O grande interesse dos pesquisadores por esse fungo é justificado por sua capacidade em produzir um conjunto de enzimas termoestáveis como celulases, xilanases, β -glicosidases, β -xilosidases, amilases, trealases, entre outras (AZEVEDO et al., 1990; PERALTA et al., 1997; ARAÚJO et al., 1993; MONTI et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1991; CARDELLO et al., 1994; ALMEIDA et al., 1995; DE PAULA et al., 1998). O fungo *H. grisea* é aeróbico e termofílico moderado, cresce em temperaturas que podem variar de 20 a 50 °C apresentando crescimento ótimo entre 40 e 42 °C (DE PAULA, 1999).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o fungo *H. grisea* com o objetivo de analisar a produção de enzimas por FL utilizando substratos lignocelulósicos como fonte de carbono.

Em trabalhos desenvolvidos por De Paula e colaboradores (1999 e 2003), o fungo *H. grisea* cultivado em substratos lignocelulósicos como BCA e BMS foi capaz de produzir um complexo de enzimas com alta atividade celulolítica. Dentre estas enzimas destacou-se uma proteína de aproximadamente 47 kDa, 451 resíduos de aminoácidos e pI 5,27, que representa a principal proteína secretada pelo fungo sob o cultivo em substratos lignocelulósicos. Análises de homologia de aminoácidos demonstraram que esta proteína corresponde ao produto do gene *cbh1.2*, sendo então chamada de CBH1.2 ou celobiohidrolase II (EC 3.2.1.91). No presente trabalho, esta proteína foi utilizada como marcador para a análise do perfil de celulases presentes no sobrenadante de cultura do *H. grisea* (Tabela 3).

Em trabalho realizado por Azevedo e colaboradores (1990) identificaram dois genes de celobiohidrolases do fungo *H. grisea*, o primeiro foi descrito como uma celobiohidrolase *cbh1.1* e posteriormente o segundo gene foi analisado por Poças-Fonseca e colaboradores (1997) e descrito como o segundo gene de celobiohidrolase (*cbh1.2*) do fungo. O gene *cbh1.1* possui 3,5 kb e codifica uma celobiohidrolase (CBH1.1) com massa molecular de 55 kDa, sendo constituída de um domínio catalítico e um domínio de ligação à celulose (CBD), e apresenta 60% de identidade com um gene de celulase de *T. reesei*. O gene *cbh1.2* possui 5,0 kb e codifica uma celobiohidrolase (CBH1.2) com massa molecular de aproximadamente 47 kDa e constituída apenas pelo domínio catalítico (Tabela 3). Pela metodologia de RT-PCR foi analisada a regulação da expressão desses genes de celobiohidrolases, quando o fungo foi cultivado em glicose, lactose, celobiose, glicerol, xilose, CMC, Avicel, papel de

filtro, BCA ou a mistura de glicose/celulose com o objetivo de elucidar o provável mecanismo regulatório do sistema celulolítico do fungo *H. grisea*. O gene *cbh1.1* é expresso quando o fungo é cultivado em baixas concentrações (0,1%) de lactose e celobiose, mas não em alta concentração de celobiose (1.0%). Já o gene *cbh1.2* é expresso independentemente da fonte de carbono ou da concentração (POÇAS-FONSECA et al., 2000). Portanto, através deste trabalho concluiu-se que o *cbh1.1* possui expressão indutiva, enquanto o gene *cbh1.2* possui expressão constitutiva.

Varias enzimas foram purificadas e caracterizadas do sobrenadante de cultura do fungo *H. grisea* cultivado em FT, celulose e avicel e alguns genes do mesmo fungo foram clonados e expressos em *A. orizae*, sendo seis endoglicanases com massas preditas de 24.2, 32.2, 42, 45, 46.5 e 58 kDa; seis β -glicosidases com massas moleculares de 49 kDa a 115 kDa e uma celobiohidrolase de 38,5 kDa. Estas enzimas apresentaram pH ótimo entre 5,0 a 7,0 temperatura ótima entre 50 a 70 °C e estabilidade por 10 min a 45 °C e por 20 h em uma faixa de pH de 5,0 a 9,4 a 4 °C (TAKASHIMA et al., 1996; 1997 e 1999) (Tabela 3).

Segundo Peralta e colaboradores (1997), o *H. grisea* foi cultivado em BCA e produziu dois principais componentes proteicos que exibiram atividades β -glicosidase (formas I e II). A forma I foi purificada e apresentou massa molecular de 55 kDa (SDS-PAGE e filtração em gel). A proteína apresentou temperatura ótima de 60 °C em pH 6,0. A atividade enzimática foi estável em 60 °C e exibiu meia vida de 30 min em 70 °C (Tabela 3). Características bioquímicas de celulases do *H. grisea* encontram-se sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Enzimas do Sistema Celulolítico do fungo *H. grisea*

Código	MM	Temp.	pH	Referência
	(kDa)	(Ótima °C)	(Ótimo)	
EGL1	58	55-60	5,0	TAKASHIMA et al., (1996)
EGL2	46,5	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
EGL1	45	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
EGL3	32,2	60	5,0	TAKASHIMA et al., (1999)
EGL4	24,2	75	6,0	TAKASHIMA et al., (1999)
CBH 1	67			TAKASHIMA et al., (1996)
CBH1.1	55			AZEVEDO et al., (1990)
CBH1.2	47			POÇAS-FONSECA (1997)
Exoglucanase	38,5	50-7,0	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
BGL 1	115	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
BGL2	94	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
BGL3	94	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
BGL6	77	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
BGL4	54-57	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
FORMA 1	55	60	6,0	PERALTA (1997)
BGL5	49	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA et al., (1996)
BGL intracelular	45			TAKASHIMA et al., (1996)

EGL: endoglucanase; CBH: celobiohidrolase; BGL: β -glicosidase

Rana e colaboradores (1995) purificaram e caracterizam duas endoxilanases com massas moleculares de 95 (Xyl I) e 13 kDa (Xyl II) quando o fungo foi cultivado em meio líquido contendo palha de trigo como fonte de carbono (Tabela 4).

Monti e colaboradores (1991) purificaram e caracterizaram duas endoxilanases extracelulares com massa molecular estimada em 23,0 e 25,5 kDa produzidas pelo fungo *H. grisea* cultivado em xilana “larchwood”. A endoxilanase de 25,5 kDa apresentou-se como uma glicoproteína estável a 50 °C por 30 min com uma meia vida de 20 min a 60 °C, estabilidade entre 40 e 60 °C, pH ótimo de 5,0, temperatura ótima de 70 °C. A endoxilanase de 23,0 kDa apresentou termoestabilidade semelhante a de 25,5 kDa e atividade sobre xilana e celulose (Tabela 4) (MONTI, 2003).

Em trabalho realizado por Lucena-Neto e Ferreira-Filho (2004) observou-se que o fungo *H. grisea* secretou um complexo de enzimas xilanolíticas quando cultivado em meios sólidos e líquidos contendo, respectivamente, FT e engaço de bananeira - EB (suporte do cacho de banana) como substratos. Nesse trabalho foi estimada por SDS-PAGE uma nova xilanase de 29 kDa denominada de X2, obtida do meio sólido com FT. No processo de purificação foi observado a presença de pelo menos 5 picos com atividade xilanolíticas e a enzima purificada mostrou-se mais ativa numa faixa de pH de 4,5 a 6,5, temperatura ótima de 55 a 60 °C e reteve 50% de sua atividade após 5,5 h a 60 °C (Tabela 4).

O gene *xyn1* do *H. grisea* foi isolado por Iikura e colaboradores (1997). Este gene codifica uma xilanase com 429 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita de 47 kDa. A proteína XYN1 apresenta um domínio de ligação a celulose (CBD) e homologia com xilanases da família F/10. O gene *xyn1* foi expresso quando o fungo foi cultivado, por FL, na presença de xilana e celulose microcristalina (Avicel) e reprimido na presença de glicose (Tabela 4).

Em trabalho realizado por Lembo e colaboradores (2006), quando o *H. grisea* cresceu, por FL, no meio contendo xilana “oat spelt” como fonte de carbono produziu atividade de β -xilosidase. As enzimas purificadas apresentaram massas moleculares de 37 e 50 kDa por espectrometria de massa e SDS-PAGE respectivamente. As enzimas purificadas exibiram atividade máxima a 55 °C e pH 6,5, sendo que em pH 8,8, retiveram 60% de sua atividade após 6 h de incubação a 50 °C (Tabela 4).

Almeida e colaboradores (1995) purificaram a partir do sobrenadante de cultura do *H. grisea* uma β -xilosidase de 43 kDa, de pH ótimo de 6,0 e temperatura ótima de 50 °C (Tabela 4). As massas moleculares e a temperatura ótima e pH ótimo da maioria das xilanases do *H. grisea* podem ser vistas na Tabela 4.

Tabela 4. Enzimas do Sistema Xilanolítico do fungo *H. grisea*

Código	MM	Temp.	pH	Referência
	(kDa)	(Ótima °C)	(Ótimo)	
Xyl II	95			RANA et al., (1995)
X3	61,8			MONTI et al., (2003)
XYN1	47			IIKURA (1997)
				LUCENA-NETO &
X2	29	55-60	4,5-65	FERREIRA-FILHO (2004)
X2	25,5	70	5,0	MONTI et al., (1991)
HXYN2	23	65	5,5	CARVALHO (2003)
HXYN2r	23	60	6,5	FARIA (2000 e 2002)
X1	23	40	5,0	MONTI et al., (1991)
XYL1	13			RANA et al., (1995)
BXL 1 e 2	37 e 50	55	7,5	LEMBO et al., (2006)
BXL	43	50	6,0	ALMEIDA et al., (1995)

X₁, X₂, X₃: xilanases; XYL I e II: endoxilanases; HXYN2: endoxilanase; HXYN2r: endoxilanase recombinante; BXL: β-xilosidase

1.6. PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO FUNGO *H. grisea*

Nos estudos realizados por Faria (2000) e Moraes e colaboradores (2002) foi descrito que o fungo *H. grisea* produziu um conjunto de enzimas com atividade xilanolítica quando crescido em vários substratos como: bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de trigo, palha de cereal moída além de substratos menos complexos como a xilana “oat-spelt” e xilana “birch-wood”. Os resultados demonstraram que o bagaço de cana-de-açúcar foi o melhor indutor da produção das xilanases pelo fungo. As proteínas do sobrenadante de cultura foram analisadas quanto a atividade xilanolítica em gel pela metodologia de Zimograma, o sobrenadante de cultura apresentou um perfil proteico heterogêneo, com destaque para duas bandas com atividade de xilanase correspondentes às proteínas de 23 e 25 kDa. No sobrenadante de cultura do fungo cultivado na presença de glicose não se observou nenhuma banda de atividade.

Vários trabalhos foram realizados no grupo de pesquisa visando o entendimento

das enzimas do sistema xilanolítico e celulolítico do fungo *H. grisea*. Faria e colaboradores (2000, 2002) isolaram o gene que codifica a endoxilanase HXYN2. A expressão deste gene foi analisada por RT-PCR e foi observado que o gene foi expresso quando o fungo foi cultivado na presença de BCA e palha de cereal moída (BMS), e não expresso no cultivo em glicose. O gene *Hxyn2* foi expresso pela levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A enzima recombinante apresentou massa molecular de 23 kDa, pI 8,0 e atividade contra xilana. A enzima HXYN2r foi purificada por Carvalho e colaboradores (2008) e apresentou pH e temperatura ideais de 6,5 e 60 °C. A enzima manteve 100 % de sua atividade após 180 min de incubação, quando incubada a 60 °C. Em outro trabalho do grupo, Carvalho e colaboradores (2003) purificaram a xilanase de 23 kDa, a endoxilanase HXYN2r, confirmando a temperatura ótima de 65 °C, pH ótimo de 5,5 e o pI de 6,1. No pH ótimo, manteve 80% da atividade inicial mesmo após 120 min de incubação (Tabela 4).

A enzima HXYN2r foi utilizada no presente trabalho como marcador xilanase nos géis desnaturantes de poliacrilamida, como ferramenta de análise estimativa das massas do perfil proteico de sobrenadantes de cultura do *H. grisea* por SDS-PAGE e Zimograma.

Oliveira e colaboradores (2007), cultivaram o fungo *H. grisea* em diferentes substratos como SM, BCA e CMC nas concentrações iniciais de 1%. Os resultados obtidos no cultivo do *H. grisea*, com os substratos testados demonstraram que o SM foi o melhor indutor de atividade celulolítica, apresentando picos de atividade de 0,01 U/mL de FPase após 144 h, 0,16 U/mL de CMCase após 120 h e 0,19 U/mL de Avicelase após 72 h. No sobrenadante de cultura do fungo observou-se por SDS-PAGE, a presença de duas principais proteínas, com massa molecular estimada de 47 e 66 kDa, as quais podem corresponder às celobiohidrolases CBH1.2 e a CBH1.1 do *H. grisea*. Com intuito de se obter maior concentração enzimática no sobrenadante de cultura, realizou-se a expressão heteróloga do cDNA da celobiohidrolase1.2 do *H. grisea* em *P. pastoris*. Os valores de atividade enzimática para FPase, CMCase e Avicelase obtidos pela levedura recombinante (CBH1.2r) foram respectivamente 5, 1,87 e 1,2 vezes maiores do que aqueles obtidos pelo fungo *H. grisea*. Vale ressaltar que esta enzima recombinante (CBH1.2r) de 47 kDa produzida pela *P. pastoris* foi utilizada como marcador da presença da celulase CBH1.2 no sobrenadante de cultura do *H. grisea*.

A partir dos resultados descritos por Faria (2000), Carvalho e colaboradores (2003

e 2008) e Oliveira e colaboradores (2007) concluiu-se que no cultivo do fungo *H. grisea* por FL, os melhores indutores da produção de celulases e xilanases foi o BCA e o SM.

Os substratos SM e PA têm sido descritos como bons indutores da produção de celulases e xilanases por diferentes fungos por FL (LENARTOVICZ et al., 2003). Estes substratos ainda foram pouco explorados como indutores da produção de celulases e xilanases pelo fungo *H. grisea*. No trabalho de Oliveira e colaboradores (2007) foi analisada a indução da produção de celulases pelo *H. grisea* utilizando 1% de SM, BCA e CMC em meio não suplementado com fonte de nitrogênio, os resultados obtidos demonstram que o SM mostrou ser o melhor indutor. No presente trabalho foi proposta a análise da produção de xilanases e celulases pelo *H. grisea* em 1 e 2% de SM como fonte de carbono e em meio suplementado com de fontes de nitrogênio.

Os registros na literatura são menores ainda quando se trata do cultivo de *H. grisea* na presença de PA para indução da produção de xilanases. Estudos que visem analisar melhor o potencial indutor deste substrato para produção de xilanases são necessários.

3. MATERIAIS

3.1. LINHAGEM DO FUNGO *Humicola grisea* var. *thermoidea*

A linhagem do fungo *H. grisea* utilizada no presente trabalho foi isolada de compostagem na Universidade Federal de Viçosa (MG) por Chaves (1982).

3.2. SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Para a produção de enzimas, o fungo *H. grisea* foi cultivado em meio MM suplementado com os seguintes substratos lignocelulósicos: PA, SM, BCA e FT.

3.3. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura foram preparados com água bidestilada e esterilizados em autoclave (120 °C, 1 atm, 20 min).

3.3.1. Meio Ágar Aveia – AA

Farinha de aveia infantil (Quaker)	4,0% (p/v)
Ágar	1,5% (p/v)

3.3.2. Meio Mínimo – MM (Pontecorvo *et al.*, 1953)

NaNO ₃	0,6% (p/v)
KCl	0,05% (p/v)
KH ₂ PO ₄	0,15% (p/v)
ZnSO ₄	0,001% (p/v)
FeSO ₄	0,001% (p/v)
pH 6,8	

3.4. SUBSTRATOS PARA DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Na dosagem da atividade xilanolítica foi utilizada a xilana “oat-spelt” (xilana extraída de aveia - Sigma®). Na dosagem da atividade celulolítica foram utilizados os seguintes substratos: celulose micro-cristalina (CMC de baixa viscosidade – Sigma®), celulose semi-cristalina (Avicel - Sigmacell – Sigma®) e papel de filtro Whatman nº1.

3.5. SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas com água bidestilada e quando necessário foram esterilizadas por autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min) ou filtração em membrana com poros de 0,2 µm (Millipore®). As soluções foram agrupadas de acordo com a metodologia na qual foram empregadas.

3.5.1. Soluções para a Determinação da Atividade Enzimática

Solução de ácido dinitrosalicílico - DNS

Ácido 3,5-Dinitrosalicílico	0,75% (p/v)
NaOH	1,4% (p/v)
Tartarato de Sódio e Potássio	21,6% (p/v)
Fenol	0,54% (v/v)
Metabissulfito de Sódio	0,58% (p/v)

Inicialmente, o DNS e o NaOH foram dissolvidos em água bidestilada. Posteriormente adicionou-se o tartarato de sódio e potássio, o fenol aquecido a 50 °C e o metabissulfito de sódio. A solução final foi titulada com HCl 0,1 M utilizando fenolftaleína como indicador.

Tampão Citrato de Sódio 0,05 M pH 4,8

Ácido cítrico	50 mM
Citrato Trissódico	50 mM

Tampão Citrato de Sódio 0,05 M pH 6,0

Ácido Cítrico	50 mM
Citrato de Trisódio	50 mM

Uma solução é adicionada na outra até atingir o pH desejável.

Solução de Xilana “oat spelt” 1% (p/v)

A xilana “oat-spelt” foi dissolvida em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 após aquecimento da solução em microondas durante 1 min, agitação manual e repouso durante 1 min. Este procedimento foi repetido três vezes e após, a solução foi submetida

a centrifugação a 11.200 g durante 10 min. O sobrenadante foi estocado a -20 °C e utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

Xilose - 4,2 mg/mL

Xilose 0,42% (P/V)

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8.

Solução de Carboximetilcelulose (CMC)

CMC 4% (p/v)

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, sendo aquecida no microondas até solubilização completa do soluto

Solução de Avicel

Avicel 1,0% (p/v)

A solução foi preparada, no momento do uso, com água destilada sob agitação.

3.5.2. Soluções para Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)

Acrilamida 39,0% (p/v)

Bis-acrilamida 1,0% (p/v)

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada ao abrigo da luz a 4°C.

Ácido Tricloroacético (TCA) 100% (p/v)

Um volume de 1 mL de água destilada foi adicionado a 50 g de ácido tricloroacético. Após todo o ácido ser dissolvido, adicionou-se água destilada suficiente para um volume final de 50 mL e a solução obtida foi estocada a 4 °C.

Tampão de Amostra (2x)

Tris-HCl pH 6,8 0,2 M

SDS 4% (v/v)

β-Mercaptoetanol 4% (v/v)

Glicerol	4% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

Tampão de Corrida – Tris-Glicina (5x)

Trizma-base	1,5 % (p/v)
Glicina	7,2% (p/v)

No momento do uso, foi adicionado SDS para a concentração final de 0,1% (p/v).

3.5.2.1. Revelação das Proteínas por Coloração com Azul de Coomassie

Solução Corante

Azul de Coomassie (R- 250)	0,1% (p/v)
Metanol	45% (p/v)
Ácido Acético Glacial	10% (p/v)
Água destilada (q.s.p)	

Solução Descorante

Metanol	30% (v/v)
Ácido Acético Glacial	7% (v/v)
Água destilada (q.s.p)	

3.5.3. Soluções para o Zimograma para xilanase e celulase

Solução de Xilana “oat spelt”

A solução de xilana a 2% foi preparada em água bidestilada como descrito no item 3.5.1.

Tampão MES (ácido 2 – [N-Morfolino] etanosulfônico)

MES (USB®)	50 mM
pH 6,0	

A solução foi preparada no momento do uso com água bidestilada.

3.6. MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PARA PROTEÍNAS

Foi utilizado o kit de calibração para eletroforese, de baixa massa molecular – AmershamTM AMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare).

97,0 kDa – Fosforilase B – músculo de coelho

66,0 kDa – Soroalbumina bovina

45,0 kDa – Ovoalbumina – ovo branco

30,0 kDa – Anidrase carbônica – eritrócitos bovinos

20,1 kDa – Inibidor de tripsina - soja

14,4 kDa – α -Lactoalbumina – leite bovino

4. METODOLOGIA

4.1. Manutenção e cultivo do fungo *H. grisea*

O fungo *H. grisea* foi mantido em meio Ágar Aveia (AA). Para a produção de esporos, o fungo foi semeado em meio AA, incubado por 4 dias a 42 °C e deixado à temperatura ambiente por mais 3 dias. Os esporos foram ressuspensos em solução salina 0,15 M e contados em câmara de Neubauer.

4.2. Preparo dos substratos lignocelulósicos

Os substratos PA, SM, BCA e FT foram lavados em água corrente por 5 min, mantidos submersos na água por 24 h. Para a secagem dos substratos estes foram mantidos a 50 °C por 3 h e posteriormente mantidos a 30 °C por 2 dias. Os substratos foram moídos em moinho de facas e peneirados em peneira de 20 mesh.

4.3. Produção de celulasas e xilanases pelo fungo *H. grisea* cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos

Para a produção de enzimas, $0,35 \times 10^6$ esporos/mL do fungo foram inoculados em 100 mL de MM (3.3.2) acrescido dos substratos na concentração final de 1, 2 ou 3%. O cultivo foi realizado a 42 °C, sob agitação de 120 rpm. A cada 24 h foram retiradas alíquotas e submetidas à centrifugação de 11.200 g por 10 min. O sobrenadante de cultura coletado foi analisado quanto a atividade celulolítica e xilanolítica pela metodologia do DNS (3.5.1) e quanto ao perfil de proteínas por SDS-

PAGE (3.5.2). O crescimento do fungo foi realizado em duplicata.

4.4. Determinação das Atividades Xilanolítica e Celulolítica pelo Método dos Açúcares Redutores (MILLER, 1959).

As atividades enzimáticas de xilanase, celulase total (FPase), endoglicanase (CMCase), exoglicanase (CBH), foram avaliadas segundo metodologia proposta por Miller (1959). A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS e os substratos utilizados foram: xilana “oat spelt, papel de filtro, CMC e avicel respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como aquela que libera um μmol do açúcar redutor correspondente por min nas condições do experimento. Os ensaios de atividade enzimática da primeira bateria de experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.1 Dosagem da Atividade Xilanolítica

Este ensaio foi realizado utilizando-se como substrato a solução de xilana “oat spelt” 1% (p/v) (3.5.1). Adicionou-se 50 μL da amostra em 450 μL do substrato seguindo-se incubação a 50 °C por 5 min. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, onde foi adicionado 750 μL de DNS (item 3.5.1), as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidades enzimáticas, definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto sobre as condições do experimento. Para a determinação da atividade de xilanase pelo método de DNS, primeiramente foi realizada uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL.

4.4.2 Dosagem da Atividade Celulolítica

FPase - expressa a atividade de celulase total, utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (1 cm x 6 cm – 50 mg) como substrato.

CMCase - expressa a atividade de endoglicanase, utilizando CMC 1% como substrato.

Avicelase - expressa a atividade de exoglicanase, utilizando avicel 1% como substrato.

A atividade de FPase foi determinada homogeneizando-se 500 μL de amostra, 500 μL de tampão citrato pH 4.8 (3.5.1) e uma tira de papel de filtro (1x6 cm). A solução foi mantida a 50 °C por 1 h e, em seguida, a reação foi interrompida em

banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, onde foi adicionado 500 µL de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

A atividade de CMCase foi determinada homogeneizando-se 250 µL de amostra e 250 µL da solução de CMC 4% (3.5.1). A solução foi mantida a 50 °C por 1 h e em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, onde foi adicionado 500 µL de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

A atividade de Avicelase foi determinada homogeneizando-se 250 µL de amostra e 500 µL da solução de Avicel 1% (3.5.1). A solução foi mantida a 50 °C por 1 h sob agitação constante e, em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. Em seguida, a solução foi submetida a centrifugação a 11.200 g durante 10 min a 4 °C. Para a quantificação do teor de açúcares redutores liberados, 250 µL do sobrenadante foi homogeneizada com 700 µL de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

A curva padrão para os testes de FPase e CMCase foi estabelecida utilizando-se glicose nas concentrações de 1-20 µmoles/mL. A curva padrão para o teste de Avicelase foi estabelecida utilizando glicose nas concentrações de 0,15 a 1,5 mg/mL. As leituras foram plotadas em um gráfico (Absorbância X Concentração de glicose). Obtendo-se assim a equação da reta que foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática.

4.5. Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida segundo o método descrito por Laemmli (1970).

4.5.1. Preparo das Amostras

As amostras (0,9 mL) a serem analisadas no gel de poliacrilamida, foram incubadas com 0,1 mL de TCA (3.5.2) por 1 h a 4 °C em banho de gelo e água. Após a incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação (11.200 g, 10 min a 4 °C), o precipitado foi lavado com acetona gelada, seco e ressuspensão em tampão de amostra

2x. As amostras foram mantidas a 100 °C por 5 min, para desnaturação, e posteriormente transferidas para banho de gelo.

4.5.2. Corrida Eletroforética

Os géis foram preparados conforme descrito a seguir:

	Concentrador 4%	Separador 13%
Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)	500 µL	4,1 mL
Tampão Tris-HCl pH 8,8	—	3,1 mL
Tampão Tris-HCl pH 6,8	630 µL	—
Água destilada	3, 80 mL	5,150 mL
SDS 10%	50 µL	125 µL
Persulfato de amônia 10%	50 µL	125 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Para a corrida eletrofóretica, as amostras foram aplicadas em gel separador (13%), tampão de corrida (1x) acrescido de 0,1% de SDS com voltagem de 100 V, utilizando o sistema de eletroforese vertical.

4.5.3. Coloração com Coomassie Blue

Ao término da corrida eletroforética, as bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após incubação deste por 18 h, sob agitação, na solução corante preparada com Coomassie Blue (3.5.2.1), seguida pela descoloração incubando o gel por 30 min, sob agitação, na solução descorante (3.5.2.1).

4.6. **Gel de Atividade (Zimograma)**

As análises de Zimograma foram realizadas segundo metodologias descritas por Teather & Wood, 1982 (atividade xilanase) e Takenaka et al.,1999 (atividade celulase), ambas com modificações. As amostras foram inicialmente dialisadas contra água destilada a 4 °C por 24 h, em sacos de celulose regenerada (INLAB), com porosidade de 25 Å, e tamanho de corte de 12 a 16 kDa. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (Liofilizador EC Apparatus - Micro Modulyo), ressuspensas em tampão de

amostra 2x, fervidas por 5 min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.

O preparo do gel e a corrida eletroforética seguem o mesmo procedimento descrito no itens 3.5.1 e 3.5.2. Para a revelação da atividade xilanolítica adicionou-se xilana “oat-spelt” a 0,1% na malha do gel separador, e para a revelação da atividade celulolítica adicionou-se 0,2 % de CMC a 2%. Ao término da corrida, o gel foi incubado durante 1 h, sob agitação, em solução de Triton X-100 2,5% (para atividade xilanolítica) e Triton X-100 1% (para atividade celulolítica) e em seguida, lavado 3 vezes com água destilada e incubado a 50 °C durante 1 h em tampão MES (3.5.3), pré-aquecido a 50 °C, (para atividade xilanolítica) e incubado a 50 °C, em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, pré-aquecido a 50 °C, durante 12 h, sob agitação, (para atividade celulolítica). Após a incubação em tampão MES ou em tampão citrato o gel foi lavado com água destilada, incubado em solução de Vermelho do Congo 0,1% sob agitação durante 20 min e lavado com NaCl 1 M até o aparecimento dos halos de atividade enzimática. Para uma melhor visualização, adicionou-se HCl 0,1 M sobre a solução de NaCl. As bandas de atividade xilanolítica e celulolítica foram visualizadas como bandas de atividade no gel.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F. (1995). Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. FEMS Microbiol. Lett. 130:171-176.

ARAÚJO, E.F.; BARROS, E.G.; CALDAS, R.A.; SILVA, D.O. (1993). β -glycosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp. Biotechnol. Lett. 5: 781-784.

ASPINALL, G.O. (1959). Structural chemistry of the hemicelluloses. Adv. Carbohydrate Chemich., 14:429-468.

AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; ASTOFI, S.F.; RADFORD, A. (1990). Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglycanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. J. Gen. Microbiol., 136: 2569-2576.

BANSOD, S.M.; DUTTA-CHOUDHARY, M.; SRINIVASAN, M.C. & RELE, M.V. (1993). Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium* species. Biotechnol.Lett., 15: 965-970.

BASTAWDE, K.B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J. of Microbiol. and Biotechnol., 8: 353-368.

BAYER, E.A. & LAMED, R. (1992). The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? Review Biodegradation, 3(2-3): 171-88.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology, 56, 326–338.

BÉGUIN, P. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. Annu. Rev. Microbiol., 44: 219-248.

- BÉGUIN, P. & AUBERT, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiological Reviews*, 13: 25-58.
- BÉRA-MAILLET, C.; ARTHAUD, L.; ABAD, P.; ROSSO, M. (2000). Biochemical characterization of MI-ENG1, a family 5 endoglucanase secreted by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Eur. J. Biochem.* 267: 3255-3263.
- BERGHEM, L.E.R.; PETTERSSON, L.G.; AXIO-FREDRIKSSON, U. (1975). The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation - Characterization and Enzymatic Properties of a p-1,4-Glucan Cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.*, 53: 55-62.
- BHAT, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Advances*, 18: 355-83.
- BIELY, P.; MARKOVIK, O.; MISLOVICOVA, D. (1985). Sensitive detection of endo-1,4- β -glycanases and endo-1,4- β -xylanases in gels. *Anal. Biochem.* 144: 147.
- BLUM, D.L.; LI, X.L.; CHEN, H.; LJUNGDEHL, L.G. (1999). Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. *Appl Environ Microbiol* 65:3990–3995.
- BOUVENG, H.O. (1961). Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates. II. Location of Oacetyl groups in birch xylan. *Acta Chemica Scandinavica*, 15: 96-100.
- CAMACHO, N.A & AGUILAR, G.O. (2003). Production, purification and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp and its application in baking. *Applied biochemistry and biotechnology*, 104:159-171.
- CARDELLO, L.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. (1994). A cytosolic trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Microbiol.*, 140:1671-1677.
- CARVALHO, W.R. (2003). Produção e Purificação da Xilanase de 23 kDa do Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena-SP.

CARVALHO, W.R. (2008). Caracterização Bioquímica da Endoxilanase Recombinante (HXYN2r) do Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sua Aplicação na Sacarificação de Resíduos Agrícolas. Tese (DOUTORADO), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

CHAHAL, D.S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production, Appl Environ Microbiol. 49: 205-210.

CHAHAL, D.S. (1982). Growth characteristics of microorganisms in solid state fermentation for upgrading protein values of lignocelluloses and cellulase production, p. 421-442. In H. W. Blanch and E. T. Popoutsakis (ed.), Foundations of biochemical engineering: kinetics and thermodynamics in biological systems. American Chemical Society, Washington, D.C.

CHAVES, V.M.G. (1982). Algumas características fisiológicas e propriedades do complexo celulase de um fungo termófilo isolado de compostagem. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa-MG.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. (2005). Xylanases, Xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews, 29: 5-23.

COUGHLAN, M.P. & HAZLEWOOD, G.P. (1993). β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. Biotechnol. Appl. Biochem., 17:259-289.

COUGHLAN, M.P. (1992). Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In: Xylans and xylanases. (Visser, J.; Beldman, G.; Kusters-van Someren, M.A. & Voragen, A.G.J., eds.), pp. 111-139, Elsevier, Amsterdam.

COWLING, E.B. (1963). Structural features of cellulose. In: Reese, E.T. Enzymic hydrolysis of Cellulose and Related Materials. The Macmillan Company, New York.

CUBERO, B. & SCAZZOCHIO, C. (1994). Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CRE-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. EM60 J. 13: 407-415.

- DAROIT, D.J. (2007). Caracterização de uma B-Glicosidase de *Monascus purpureus*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia, UFGRS.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *Int J Biol Sci.* 5(6): 578–95.
- DE PAULA, E.H.; FARIA, F.P.; BARBOSA, C.D.; CORNÉLIO, I.N.; PEREIRA, L.R.; AZEVEDO, M.O. (1998). Sacarificação de Compostos Lignocelulósicos pelo extrato enzimático do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Anais da Enzitec*, Rio de Janeiro, Brasil.
- DE PAULA, E.H.; RAMOS, L.P.; AZEVEDO, M.O. (1999). The potential of *Humicola grisea* var *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. *Biores. technol*, 68: 35-41.
- DE PAULA, E.H.; POÇAS-FONSECA, M.J.; AZEVEDO, M.O. (2003). The product of *Humicola grisea* var. *thermoidea* *cbh1.2* gene is the major protein under induction by lignocellulosic residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19: 631-635.
- DEKKER, R.F.H. (1989). Biodegradation of the hetero-1,4-linked xylans. *ACS Symp. Ser.* 399: 619-629.
- DESCHAMPS, F. & HUET, M.C. (1985). Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 177-180.
- DILLON, A.J.P. (2004). Celulases. In: Said, S. & Pietro, R.C.L.R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ed. Leigis Summa, Ribeirão Preto.
- DUSTERHOFT, E.M.; LINSSEN, V.A.J.M.; VORAGEN, A.G.J.; BELDMAN, G. (1997). Purification characterization and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20: 437.
- EBRINGEROVA, A.; HROMADKOVA, Z.; HEINZE, T. (2005). Hemicellulose. *dv. Polym. Sci.* 186, 1–67.

LO, C.M.; ZHANG, Q.; LEE, P.; JU, L.K. (2005). Cellulase production by *Trichoderma reesei* using sawdust hydrolysate. Appl. Biochem. Biotechnol. 122:561–573.

ENEYSKAYA, E.V.; IVANEN, D.R.; BOBROV, K.S.; ISAEVA-IVANOVA, L.S.; SHABALIN, K.A.; SAVELOEV, A.N.; GOULUBEV, A.M.; KULMINSKAYA, A.A., (2007). Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family β -xylosidase. Environ. Microbiol. , 63:1298-1306.

FARIA, F.P. (2000). Clonagem, Caracterização e Análise de Expressão de um gene de xilanase (Hxyn2) do Fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

FARIA, F.P.; TEÓ, V.S.J.; AZEVEDO, M.O.; NEVALAINEN, H. (2002). Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. Letters in Applied Microbiology, 34:119-123.

GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-TUKASIK, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresource Technology 101 (2010) 4775–4800

GOMES, D. J.; GOMES, J.; STEINER, W. (1994). Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. J. Biotechnol., 33: 87-94.

GRUPPEN, H.; KORMELINK, J.M.; VORAGEN, A.G.J. (1993). Enzymic degradation of Water-unextractable cell wall material and arabinoxylans from Wheat Flour. Journal of Cereal Science, 18: 129-143. 1993.

HAJJAJ, H. ; BLANC, P. ; GROUSSAC, E. ; URIBELARREA, J. ; GOMA, G. ; LOUBIERE, P. (2000). Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 27, p. 619-625.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. (1996). Production of fungal xylanases. Bioresource Technology, 58:137-161.

- HARRIS, M. The EU Cellulase Project. (1999)
<<http://xray.bmc.uu.se/markh/cbh/index.html>>. Acesso em: 21/10/2011.
- HAYASHI, S.; OHNO, T.; ITO, M.; YOKOI, H. (2001). Production and properties of the cell-associated β -xylosidase from *Aureobasidium*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26, 276–279.
- HAYASHIDA, S.; MO, K.; HOSODA, A. (1988a). Production and Characteristics of Avicel-Digesting and Non-Avicel-Digesting Cellobiohydrolases from *Aspergillus fucum*. Applied and Environmental Microbiology, 54(6): 1523-1529.
- HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. J. Biochem. 293: 781-788.
- HESELTIME, C.W. (1976). Solid state fermentations. Biotechnol.Bioeng. 14:517-532.
- HOU, Y.; WANG, T.; LONG, H.; ZHU, H. (2007). Cloning, Sequencing and Expression Analysis of the First Cellulase Gene Encoding Cellobiohydrolase 1 from a Coldadaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39(2): 101-107.
- IIKURA, H.; TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. (1997). Cloning of a gene encoding a putative xylanase with a cellulose-binding domain from *Humicola grisea*. Biosci Biotechnol Biochem. 61.nº 9:1593-5.
- ILMÉN, M.; SALOHEIMO, A.; ONNELA, M.L.; PENTILLÄ, M.E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Appl.Environ. Microbiol., 63: 1298-1306.
- ITO, T.; YOKOYAMA, E.; SATO, H.; UJITA, M.; FUNAGUMA, T.; FURUKAWA, K.; HARA, A. (2003). Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674. J Biosci Bioeng 96:354–359.
- JANES, R.L. (1969). The chemistry of wood and fibres. In: The pulping of wood. MacDonald, R.G. & Franklin, J.N. Mc Graw-Hill, New York, USA.

JIANG, Z.Q.; YANG, S.Q.; TAN, S.S.; LI, L.T. LI, X.T. (2005). Characterization of a xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 69–76.

JOHNSON, P.E. & MCKNIGHT, S.L. (1989) Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 58:799–839.

JOSELEAU, J.P. ; COMTAT, J. ; RUEL, K. (1992). Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: *Xylans and xylanases*, Eds. Visser, J.; Beldman, G.; vanSomerén, M. A.K. & Voragen, A. G. J., Elsevier, Amsterdam, pp 1-15.

KABEL, M.A, VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; KLIP, G.; VORAGEN, A.G.J.; SCHOLS, H.A.B. (2005). Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnol Bioeng*. 93:56–63.

KAJI, A. (1984). L-Arabinosidases. *Adv. Carbohydr. Chem.Biochem*. 42:383-394.

KAMAL KUMAR, B.; BALAKRISHNAN, H.; RELE, M.V. (2004). Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Epub ahead of print, 2004.

KANG, M.K.; MAENG, P.J.; RHEE, Y.H. (1996). Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. strain RYM-202. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3480.

KARAFFA, L.; FEKETE, E.; GAMAUF, C.; SZENTIRMAI, A.; KUBICEK, C. P.; SEIBOTH, B. (2006). D-Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiology*, 152: 1507-1514.

KATAPODIS, P.; VRSANSKA, M.; KEKOS, D., NERINCKX, W.; BIELY, P.; CLAEYSSSENS, M.; MACRIS, B.S.; CHRISTAKOPOULOS, P. (2003). Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*, *Carbohydrate Research*, 338: 1881-1890.

KATAPODIS, P.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M.; CHISTAKOPOULOS, P. (2006). Purification and characterization of a thermostable intracellular bxylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Process Biochem.* 41, 2402–2409.

KATAYEVA, I.A. et al. (1992). *Clostridium thermocellum* β -glucosidases A and B: purification, properties, localization, and regulation of biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*. New York. 14: 407-412.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Reviews*, 23:411-456.

KULP, K. (1968). Enzymolysis of pentosans of wheat flour. *Cereal Chemistry*. v.45, p.339–350.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

LAMA, L.; CALANDRELLI, V.; GAMBACORTA, A.; NICOLAUS, B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Research in Microbiology*. 155: 283–289.

LEMBO, T.; AZEVEDO, M.O.; BLOCH JR. C.; FERREIRA-FILHO, E.X. (2006). Purification and partial characterization of a new b-xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *World J Microbiol Biotechnol.* 22: 475–479

LENARTOVICZ, V.; DE SOUZA, C.G.M.; MOREIRA, F.G.; PERALTA, R.M. (2003). Temperature and carbon source affect the production and secretion of thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem.* 38:1775–1780.

LIN, Y. & TANAKA, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current states and prospects. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 627-642.

LINDBERG, B. ; ROSSEL, K.G. ; SVENSSON, S. (1973). Position of the O-acetyl groups in birch xylan. *Svensk Papperstid*, 76: 30-32.

- LUCENA-NETO, S.A. & FERREIRA-FILHO, E.X. (2004). Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var *thermoidea*. Brazilian Journal of Microbiology, 35:86-90.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. (2002). Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology . Microbiology and molecular biology reviews, 66: 506-577.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64: 461-488.
- MANDALARI, G.B.; CURTO, R.B.; WALDRON, K.W.; FAULDS, C.B. (2008). Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. Biorsource Technolgy, 99: 5130- 5133.
- MANDELS, M. & PARRISH, F.W. (1962). Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma reesei*. J. Bacteriol., 83: 400-408.
- MARCH, R.L.; STRAUSS J.; ZEILLINGER S.; SCHINDLER M.; KUBICEK, C.P. (1996) Carbon catabolite repression of xylanase I xyn1 gene expression in *Trichoderma reesei*. Mol Microbiol 216:1273–1281.
- McMILLAN, J.D. (1993). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel ME, Baker JO, Overend RP, editors. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuel Production. Washington, DC: American Chemical Society, 1993. pp. 292–323.
- MILAGRES, A.M.F. & DURAN, N. (1992). Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp. Prog. Biotechnol.7: 539-545.
- MILAGRES, A.M.F. & PRADE, R.A. (1994). Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. Enzyme and Microbial Technology, 16:627-632.
- MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrossalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Analytical Chem. 31: 426-428

MONTI, R.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. (1991). Purification of an extracellular xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Can. J. Microbiol. 37: 675-681.

MONTI, R.; CARDELLO, L.; CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; SAYAMA, A.H.; CONTIERO, J. (2003). Production and Purification of an endo-1,4 β - xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution. Brazilian Journal of Microbiology, 34:124-128.

MORAES, W.P.; FARIA, F.P.; AZEVEDO, M.O. (2002). Produção de Enzimas Xilanolíticas pelo Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes Substratos. 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. p.121.

NAKASHIMA, K. & AZUMA, J. (2000). Distribution and Properties of Endo- β -1,4-glucanase from a Lower Termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki). Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 (7): 1500-1506.

NIEVES, R.A.; EHRMAN, C.I.; ADNEY, W.S.; ELANDER, R.T.; HIMEEL, M.E. (2009). Technical communication: survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. World J Microb Biot. 14:301–4.

OLIVEIRA, A.R.; XIMENES, E.A.; FELIX, C.R. (1991). Amylolytic activity of *Humicola* sp. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 63: 409-414.

OLIVEIRA, G.S. (2007). Expressão heteróloga do gene de celobiohidrolase (*cbh1.2*) do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás.

OLIVEIRA, G.S.; CARVALHO, W.R.; FARIA, F.P. (2007). Produção de celulasas pelo fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em celulose e substratos lignocelulolíticos. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - Sinaferm, 2007, Curitiba. Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - Sinaferm, v. 1. p. 1-7.

OZCAN, S. & JOHNSTON, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63, 554–569.

PAICE, M.G.; BERNIER, R.; JURASEK, L. (1988). Viscosity enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnol. Bioeng.*, 32: 235-239.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74:69-80.

PAPAGIANNI, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 22, p. 189-259.

PERALTA, R.M.; KADOWAKI, M.K.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. (1997). A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 146: 291-295.

PERES-AVALOS, O.; PONCE-NOYOLA, T.; MAGAÑA-PLAZA, I.; DE LA TORRE, M. (1996). Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *App. Microbiol Biotechnol*, 46: 405-409.

POÇAS-FONSECA, M.J.; LIMA, B.D.; BRIGIDO, M.M.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M.A.; AZEVEDO, M.O. (1997). *Humicola grisea* var. *thermoidea* *cbh1.2*: A new gene in the family of cellobiohydrolases is expressed and encodes a cellulose-binding domain-less enzyme. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43(2): 115-120.

POÇAS-FONSECA, M.J.; SILVA-PEREIRA, I.; ROCHA, B.B.; AZEVEDO, M.O. (2000). Substrate-dependent differential expression of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 749-752.

POLIZELI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577-591, 2005.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.; HEMMONS, L.H.; MCDONALD, BUFTON, W. J. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.

- POUTANEN, K.; RATTO, M.; PULS, J.; AND VIIKARI, L. (1987). Evaluation of different microbial xylanolytic systems, *J. Biotechnol.* 6: 49.
- PULLS, J. (1997). Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromol. Symp.*, 120: 183.
- PURKARTHOFFER, H.; SINNER, M.; STEINER, W. (1993). Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization production in submerged and solid-state culture. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 15: 677-682.
- RANA, B.K.; JOHRI, B.N.; THAKUR, I.S. (1995). Formation and activities of xylanhydrolyzing enzymes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12: 12-15.
- RANSOM, R.F. & WALTON, J.D., (1997). Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and α -arabinosidase from the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Carbohydr. Res.* 297, 357–364.
- RONNE, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11(1): 12-7.
- RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; PASTORE, G.M. (2001). Isolamento de fungos produtores de ácido γ -linolênico de solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. *Revista Ciências Farmacêuticas*, São Paulo. 23 (1): 49-58.
- RUIJTER, G.J.G & VISSER, J. (1997). Carbon repression in *aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 151: 103-114.
- RYTTERSGAARD, C.; LO LEGGIO, L.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; LARSEN, S. (2002). *Aspergillus aculeatus* beta-1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A, *Biochemistry* 41: 15135–15143.
- SÁNCHEZ, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* Mar-Apr; 27(2):185-94.

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Bioph. Mol. Biol.*, 89: 246-291.

SCHÜLEIN, M. (1997). Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *J. Biotechnol.*, 57: 71-81.

SHAH, A.R.; SHAH, R.K.; MADAMWAR, D. (2006). Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*, 97: 2047-2053.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 44(1):13–8.

STRAUSS J.; MACH, R.L.; ZEILINGER, S.; STOFFLER, G.; WOLSCHEK, M.; HARTLER, G.; STOFFLER, G.; WOLSCHEK, M.; KUBICEK, C.P. (1995). Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* 376: 103–107.

SUBRAMANIYAN, S. & PREMA, P. (2002). Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1):33-64.

SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F. (2003). Multiple forms of endo-1,4- β -glucanases in the endosperm of *Euphorbia heterophylla* L. *J. Experim. Bot.* 54 n.390: 2045-2052.

SUNNA, A., & ANTRANIKIAN, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17: 39-67.

SUTO, M. & TOMITA, F. (2001). Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 305-311.

TAJANA, E.; FIECHTER, A.; ZIMMERMANN, W. (1992). Purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces diastaticus*. *Appl Environ Microbiol.* 58: 1447–1450.

TAKASHIMA, S.; IIKURA, H.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZOMI, T. (1999a). Comparison of gene structures and enzymatic properties between two endoglucanases from *Humicola grisea*. J. Biotechnol. 67, 85 – 97.

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZOMI, T. (1999). Molecular Cloning and Expression of Novel Fungal β -Glucosidase Genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. J. Biochem. 125, 728 - 736.

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; TAKESHI, U. (1996). Cloning, sequencin, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var *thermoidea*. Journal of Biotechnology, 50: 137-147.

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. (1998). Isolation of the creA gene from the cellulolytic fungus *Humicola grisea* and analysis of CreA binding sites upstream form the cellulase genes. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62: 2364-2370 .

TAKENAKA, A.; COLIN, G.D.; KUDO, H.; ITABASHI, H.; CHENG, K. (1999). Molecular cloning, expression, and characterization of an endo- β -1,4-glucanase cDNA from *Epidinium caudatum*. J. Gen. Appl. Microbiol., 45: 57-61.

TANAKA, H. ;KOIKE, K.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. (2009). Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota*. Enzyme Microb Technol 2009;45(5):384–90.

TANGNU, S.K.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. (1981). Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut-C30). Biotechnol. Bioeng. 23:1837-1849.

TEATHER, R.M. & WOOD, P.J. (1982). Use of Congo Red polysaccharide interaction in numeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied and Environmental Microbiology, 43: 777-780.

TEERI, T.T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of Cellobiohydrolases. Trends Biotechnol. 15:160–7.

TENKANEN, M. & SIIKA-AHO, M. (2000) An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *J Biotechnol* 78(2):149–161

THOMPSON, N.S. (1983). Hemicellulose as a biomass resource. In: *Wood and Agricultural Residues; research on use for feed, fuels and chemicals*. Soltes, J. (ed), J. New York, Academic Press, p. 101-119.

TIKHOMIROV, D.F.; SINITSYN, A.P.; ZOROV, I.N.; WILLIAMS, C. (2003). Non-starch polysaccharide hydrolysing microbial enzymes in grain processing In: *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing* (Courtin, C.M., Veraverbeke, W.S. and Delcour, J.A., Eds.), pp. 413–418. Kat. Univ. Leuven, Leuven.

TÍMAR-BALÁZSKY, A. & EASTOP, D. (1998). *Chemical Principles of Textile Conservation*. Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann.

TUOHY, M.G.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKÁS, M.; COUGHLAN, M.P. (1993). The xylan-degrading enzymes system of *Talaromyces emersonii*: novel enzymes with activity against aryl β -D-xylosides and unsubstituted xylans. *Bioche. J.* 290: 515-523.

UFFEN, R.L. (1997). Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 19:1-6.

VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. (1994). Xylanases in bleaching: from anidea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.13, p. 335-50.

WANG, P.; ALI, S., MASON, J.C.; SIMS, P.F.G.; BRODA, P. (1992). Xylanases from *Streptomyces cyaneus*, in *Xylans and Xylanases*. Visser, J.; Kusters-van Someran, M. A. & Voragen, A. G. J. Eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam BV, p. 225.

WHISTLER, R.L. & RICHARDS, E.L. (1970). Hemicelluloses. In: *The Carbohydrates*. pp. 447-469. Vol. 2a. Pigman, W. & Horton, D., Eds., Academic Press, New York.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. (1988). Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52: 305-317.

WOOD, T.M. (1992). Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Trans.*, 20: 46-53.

WOODWARD, J. & WISEMAN, A. (1982). Fungal and other α -D-glucosidases their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 4: 73-79.

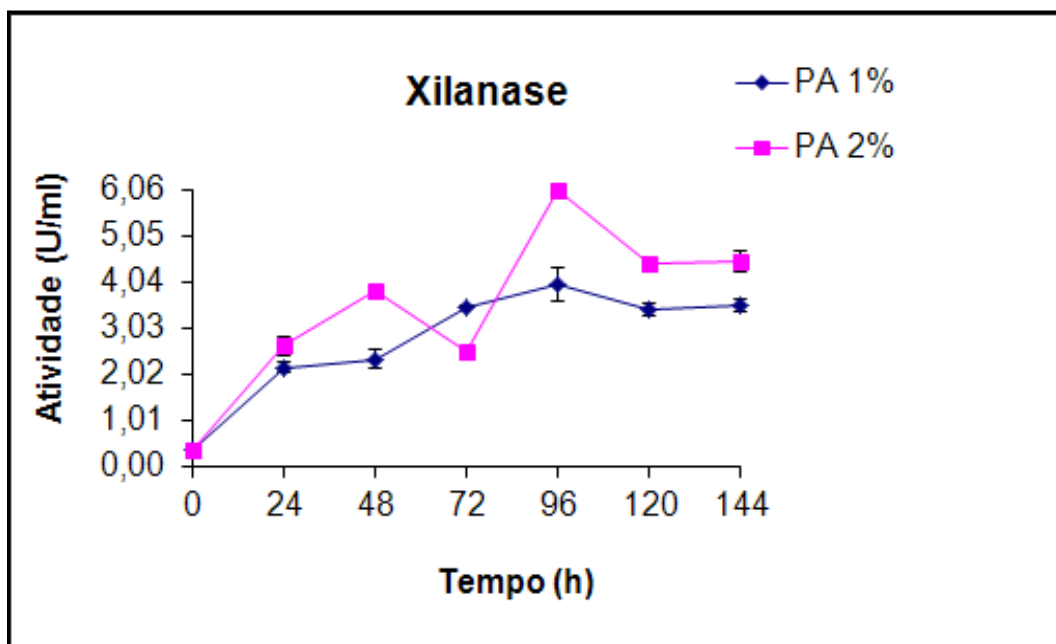
ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.; JORGE, J.A. (2004). Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 170–176.

ZEILINGER, S.; MARCH, R.L.; SCHINDLER, M.; HERZOG, P.; KUBICEK, C.P. (1996). Different Inducibility of Expression of the Two Xylanase Genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei**. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, No. 41, pp. 25624–25629.

ANEXO I

PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM PA

1A



1B

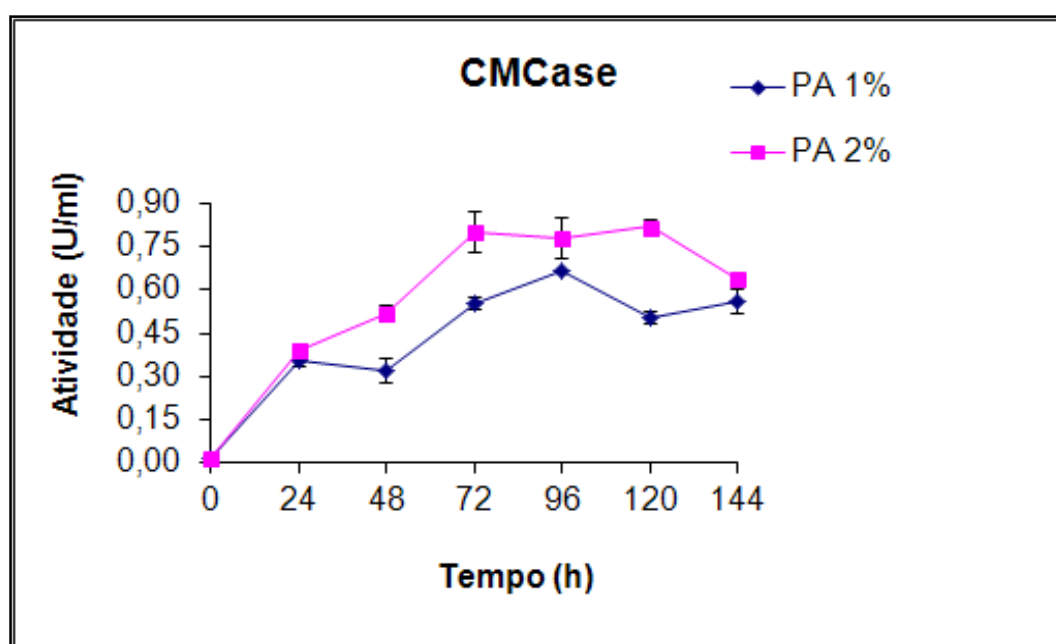
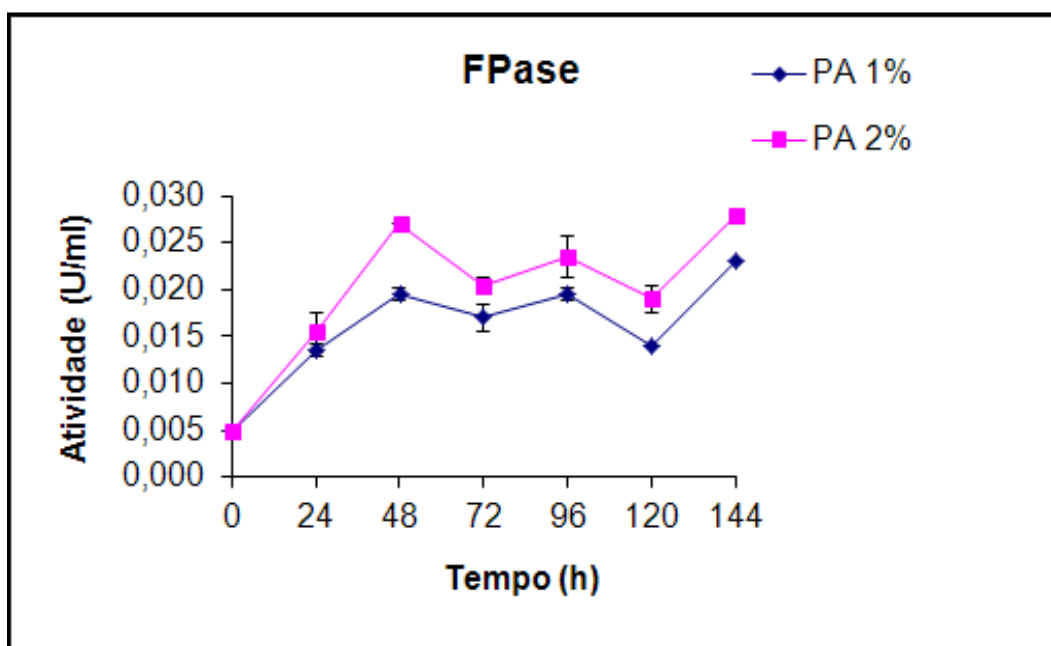


Figura 1. Produção de xilanases e CMCase pelo *H. grisea* na presença de 1 e 2% de PA.

2A



2B

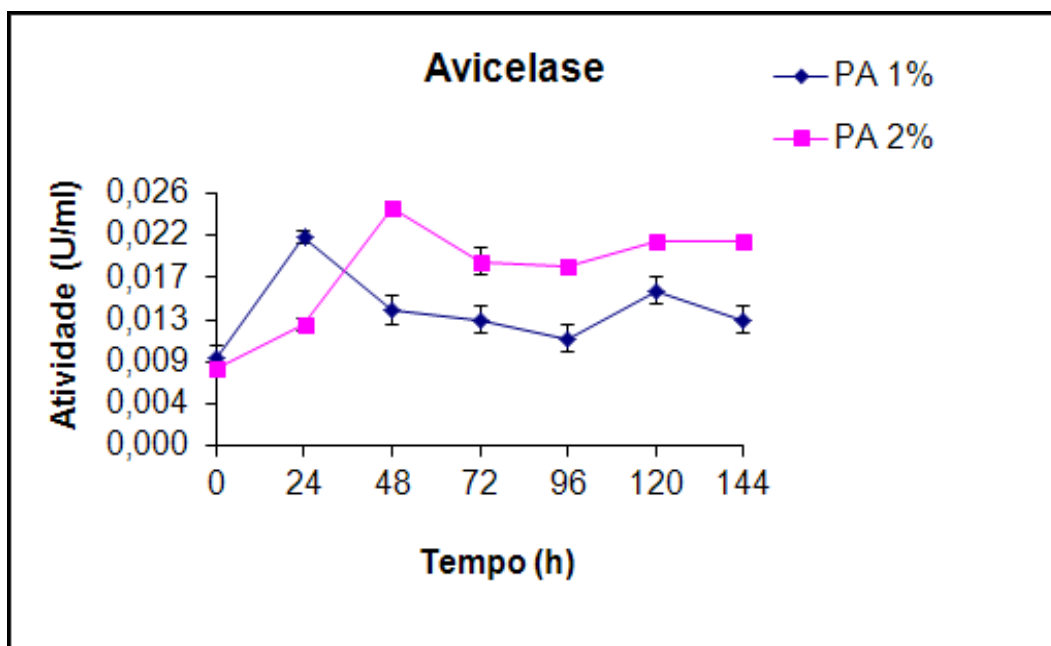
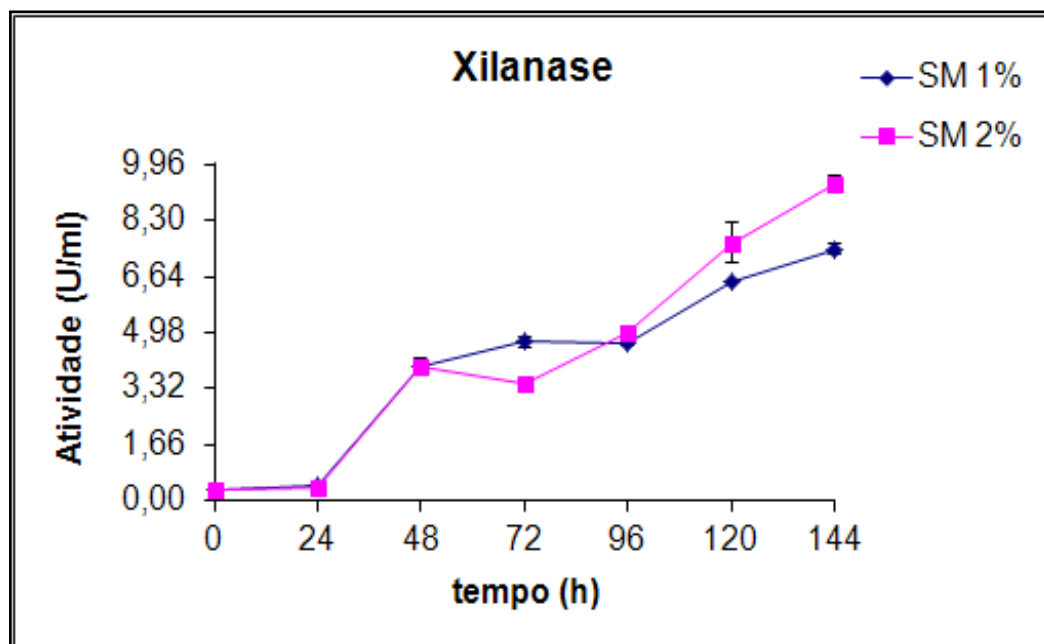


Figura 2. Produção de FPases e Avicelases pelo *H. grisea* na presença de 1 e 2% de PA.

ANEXO II

PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM SM

1A



1B

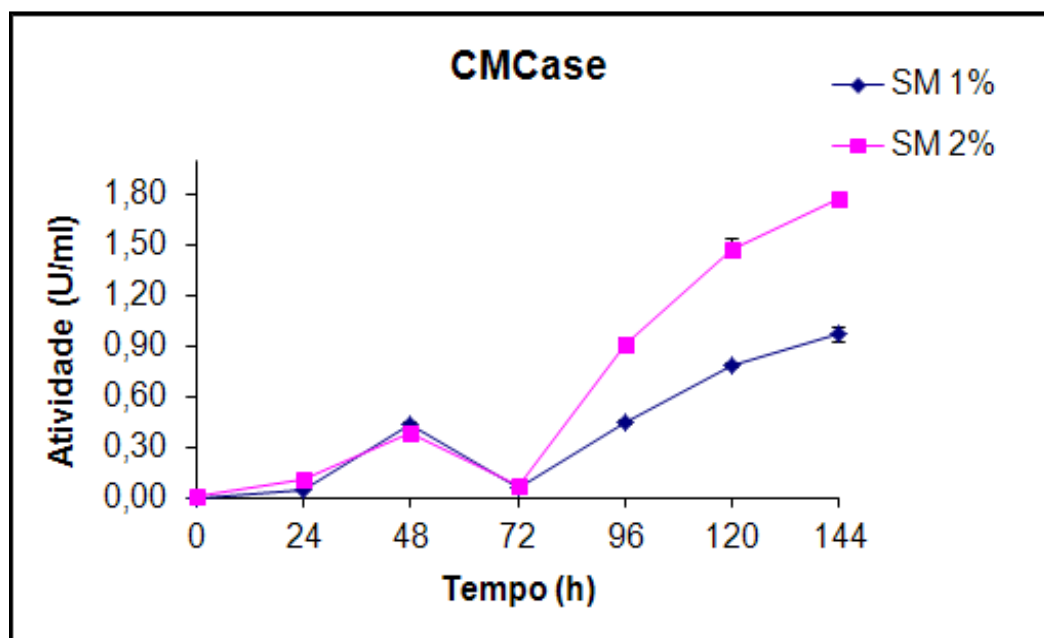
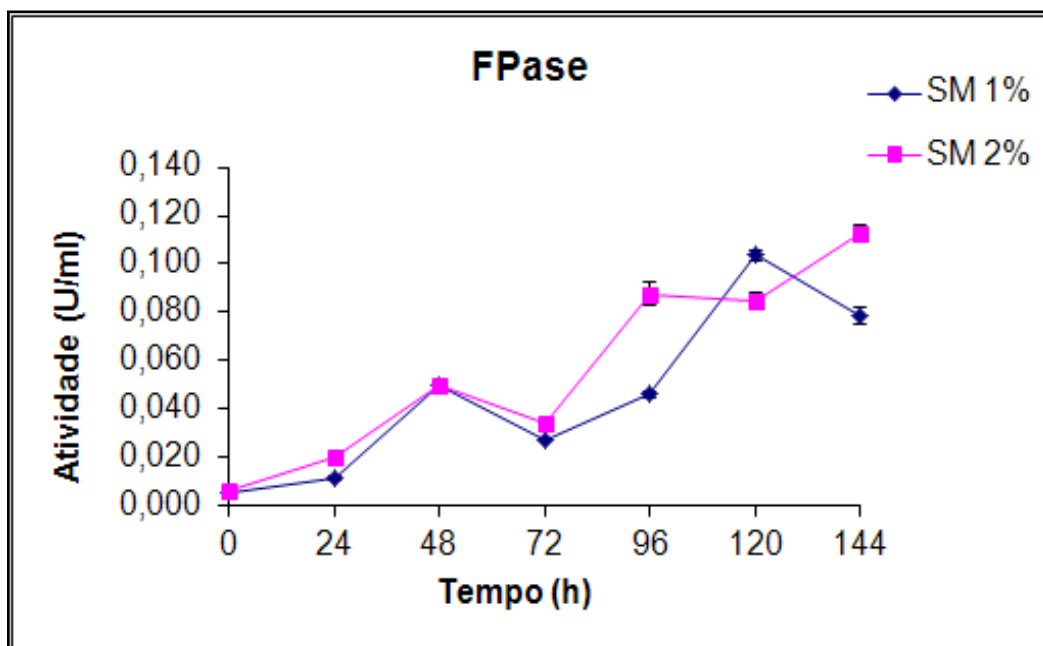


Figura 1. Produção de xilanases e CMCases pelo *H. grisea* na presença de 1 e 2% de SM.

2A



2B

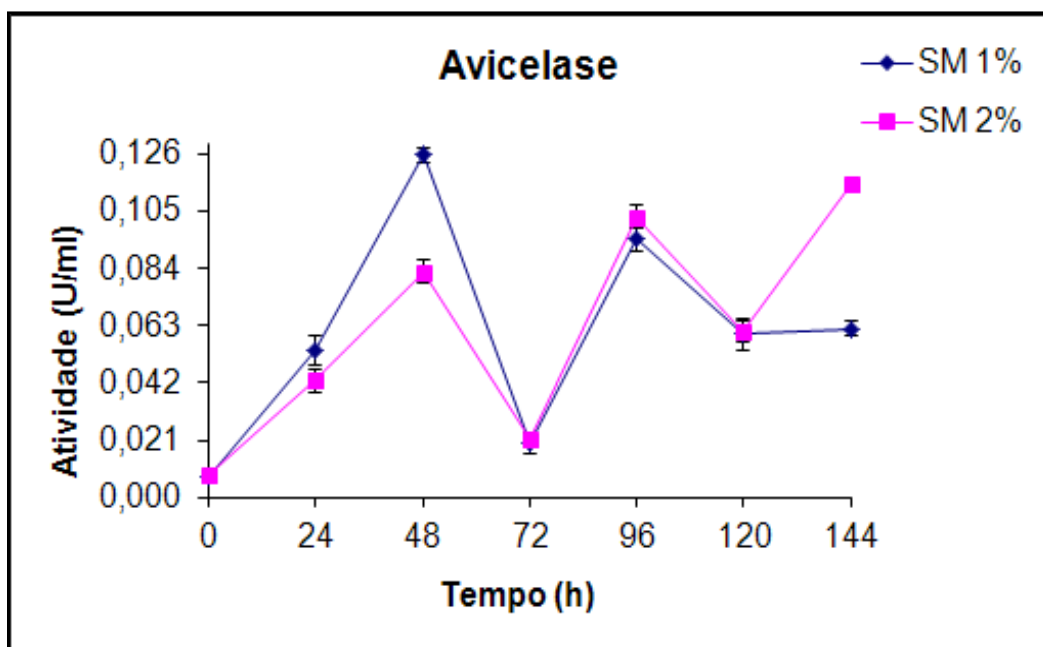
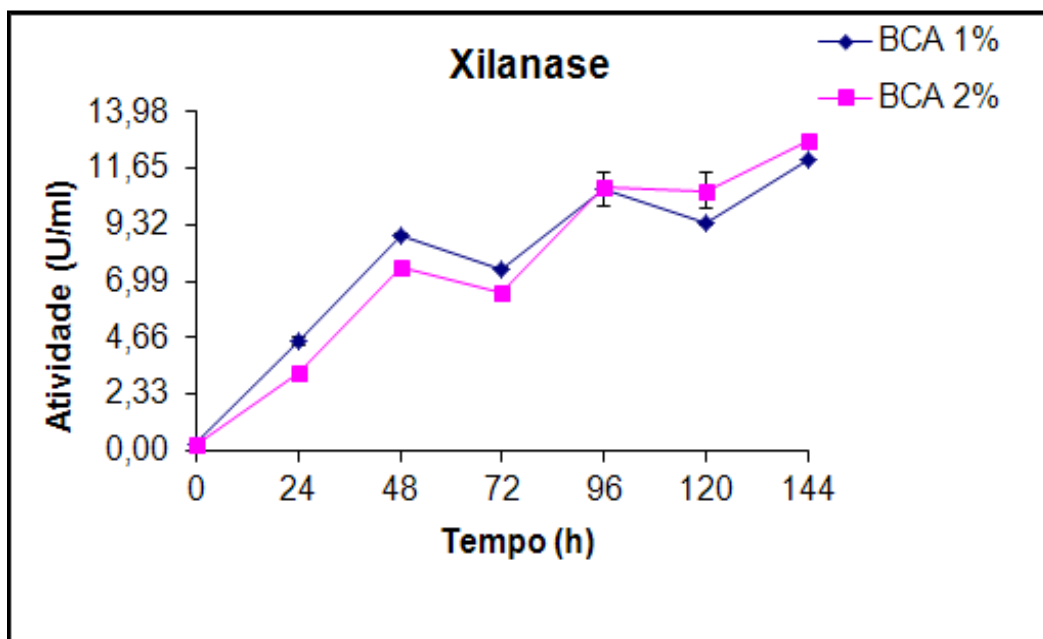


Figura 2. Produção de FPases e Avicelases pelo *H. grisea* na presença de 1 e 2% de SM.

ANEXO III

PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM BCA

1A



1B

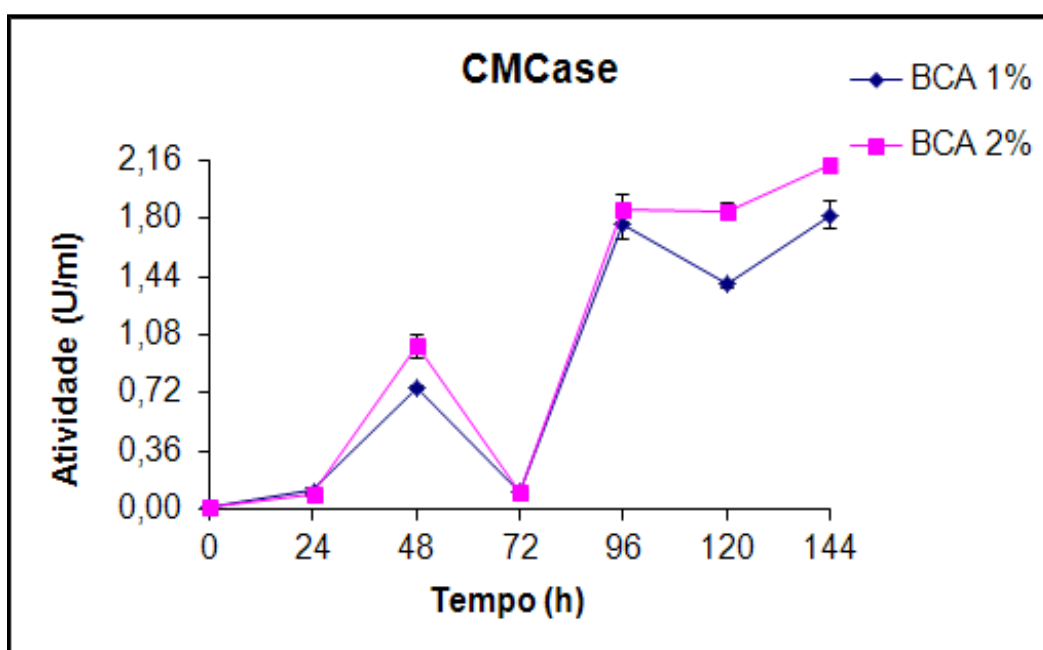
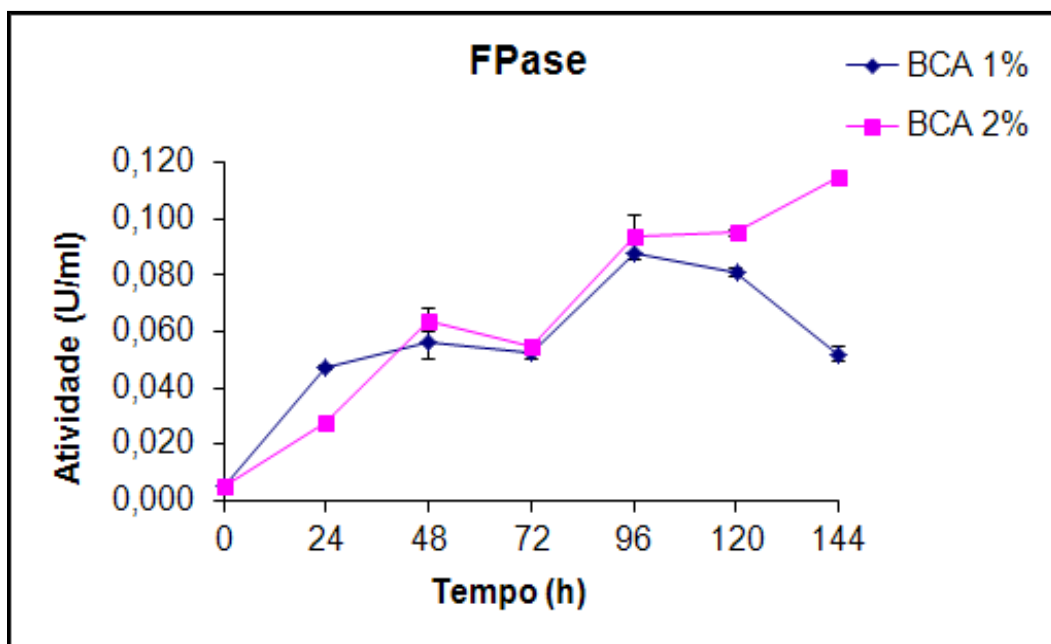


Figura 1. Produção de xilanases e CMCase pelo *H. grisea* na presença de 1 e 2% de BCA.

2A



2B

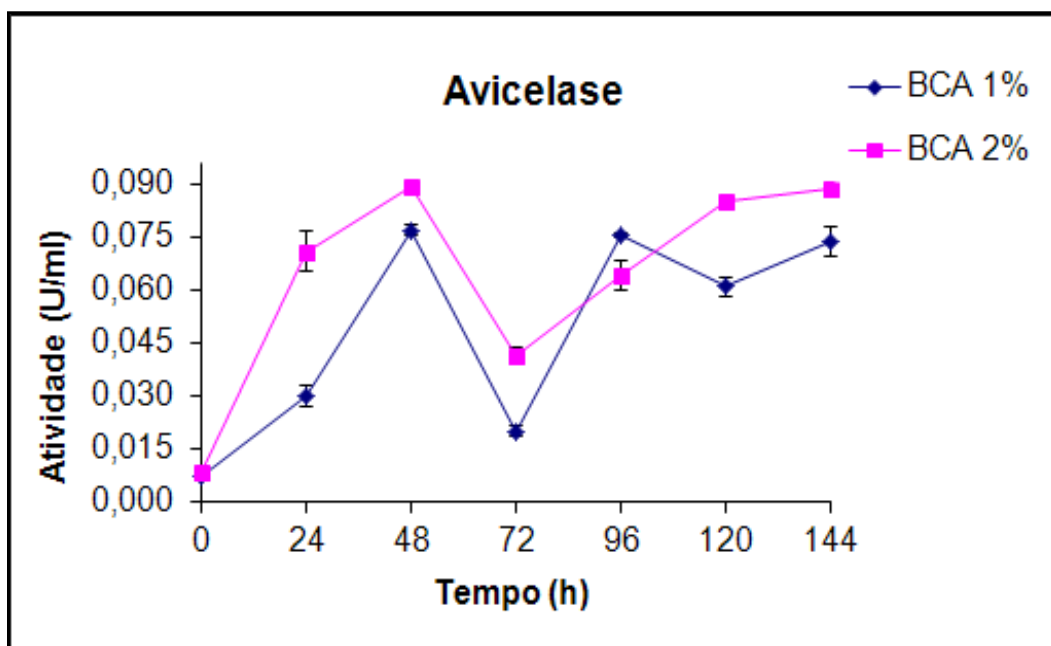
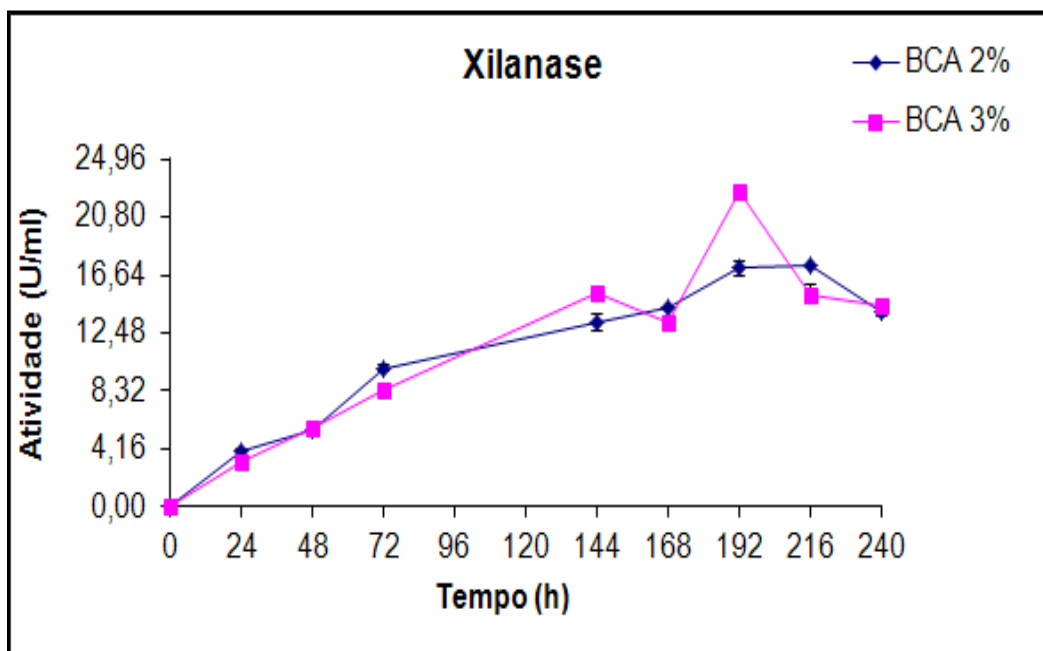


Figura 2. Produção de FPases e Avicelases pelo *H. grisea* na presença de 1 e 2% de BCA.

3A



3B

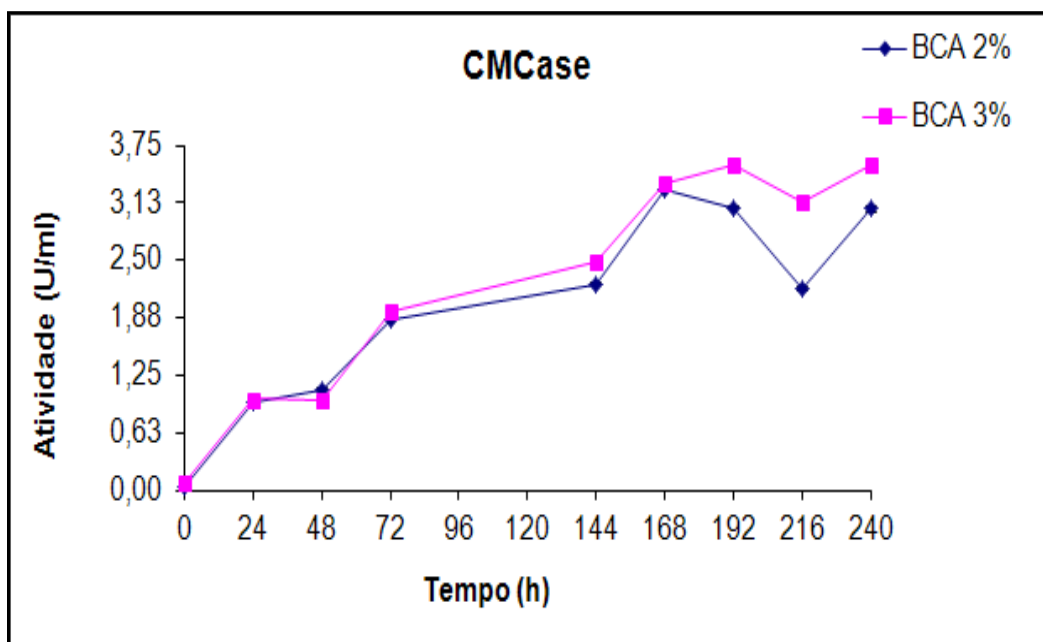
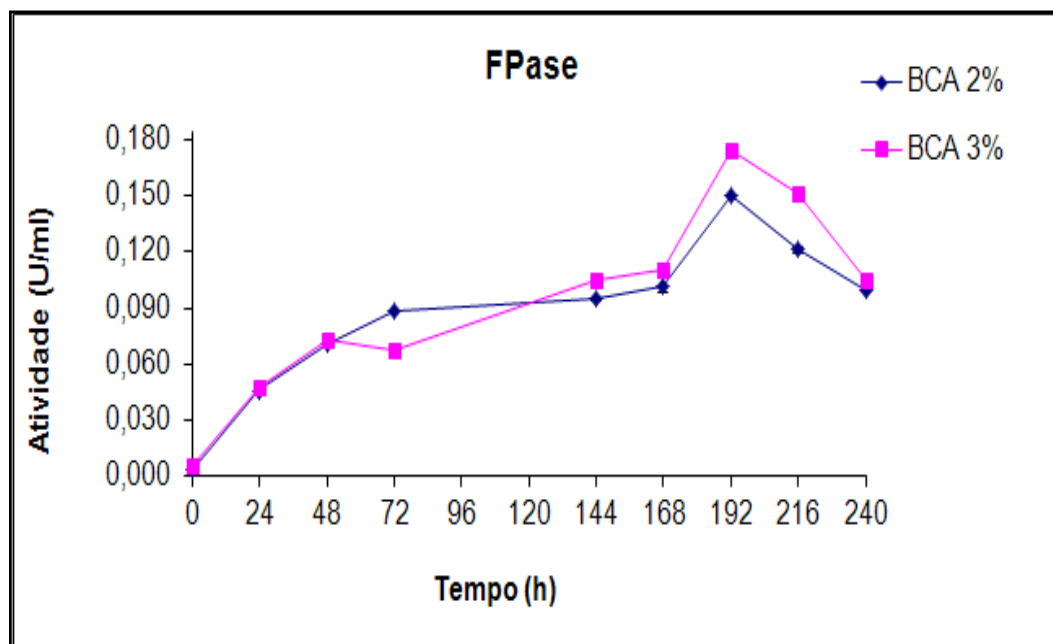


Figura 3. Produção de xilanases e CMCase pelo *H. grisea* na presença de 2 e 3% de BCA.

4A



4B

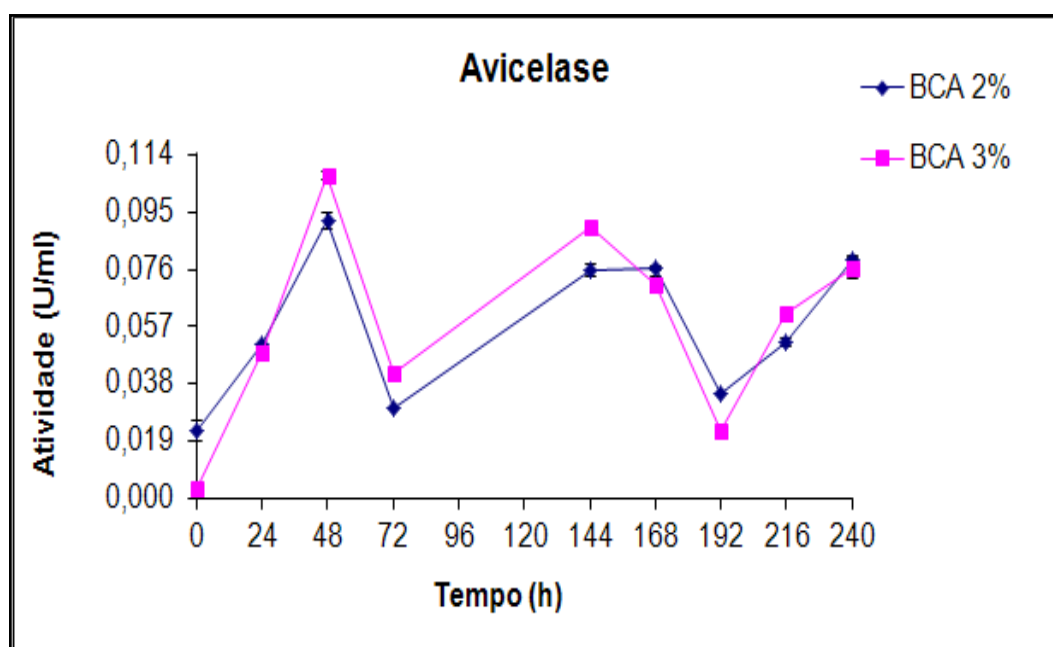
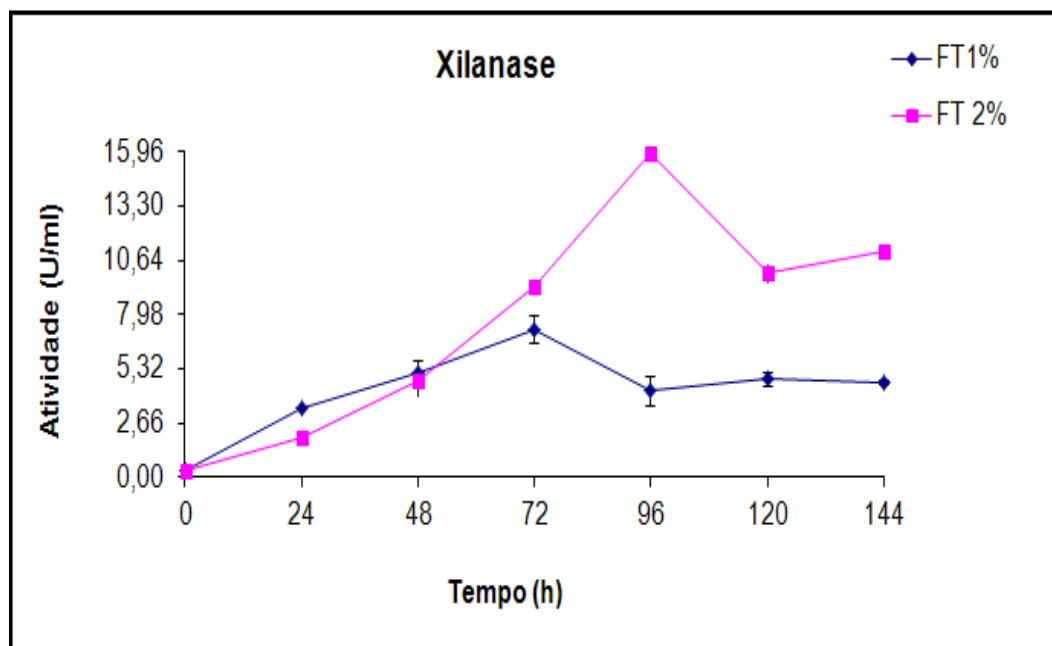


Figura 4. Produção de FPases e Avicelases pelo *H. grisea* na presença de 2 e 3% de BCA.

ANEXO IV

PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM FT

1A



1B

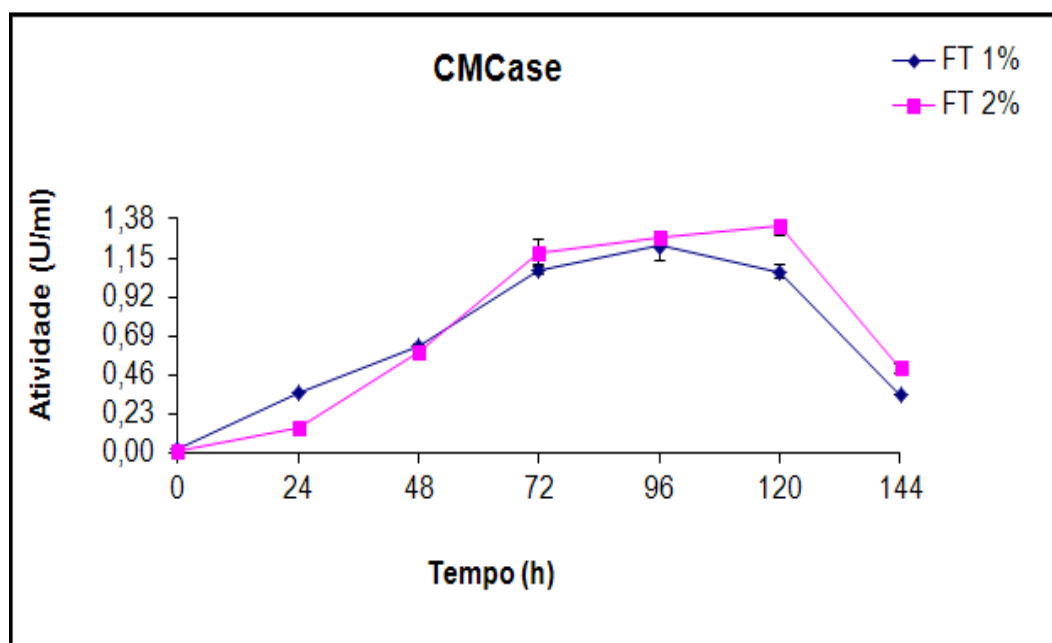
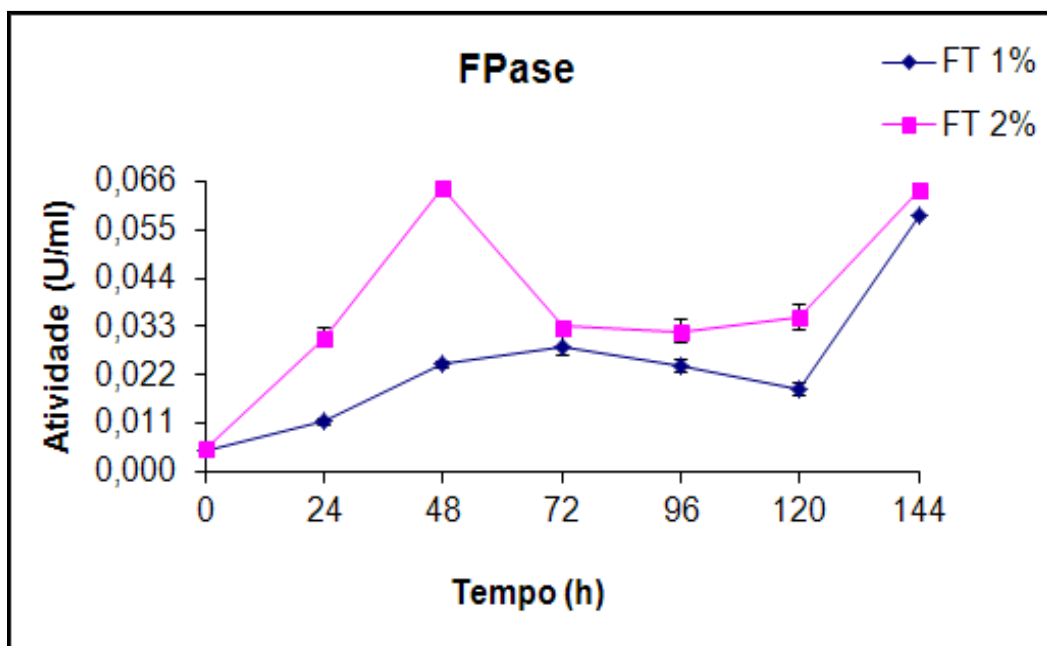


Figura 1. Produção de Xilanases e CMCase pelo *H. grisea* na presença de 1 e 2 % de FT.

2A



2B

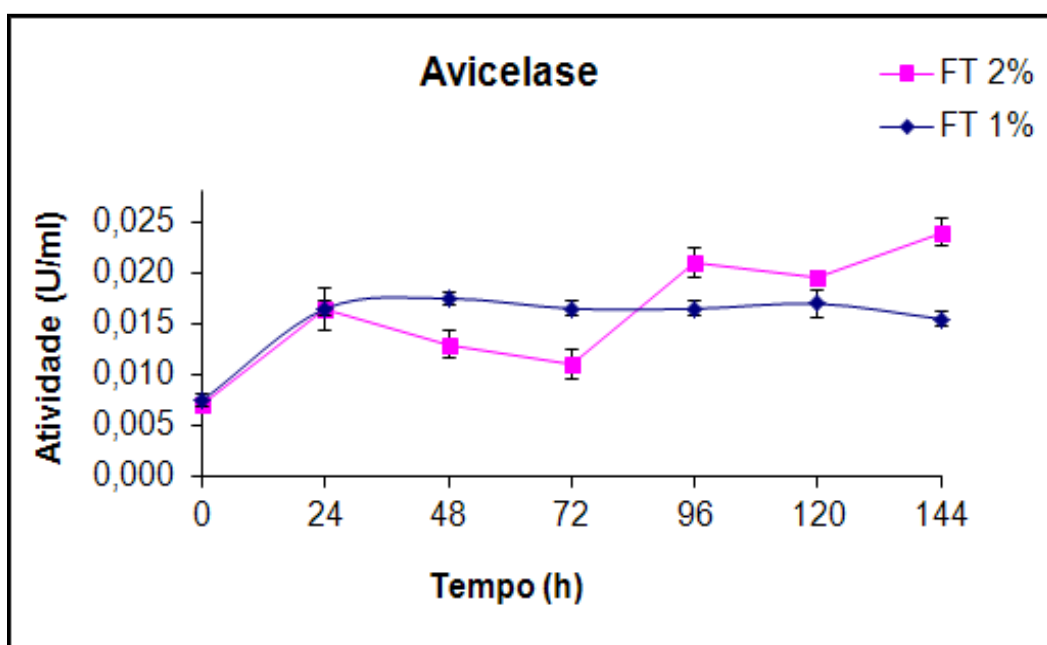
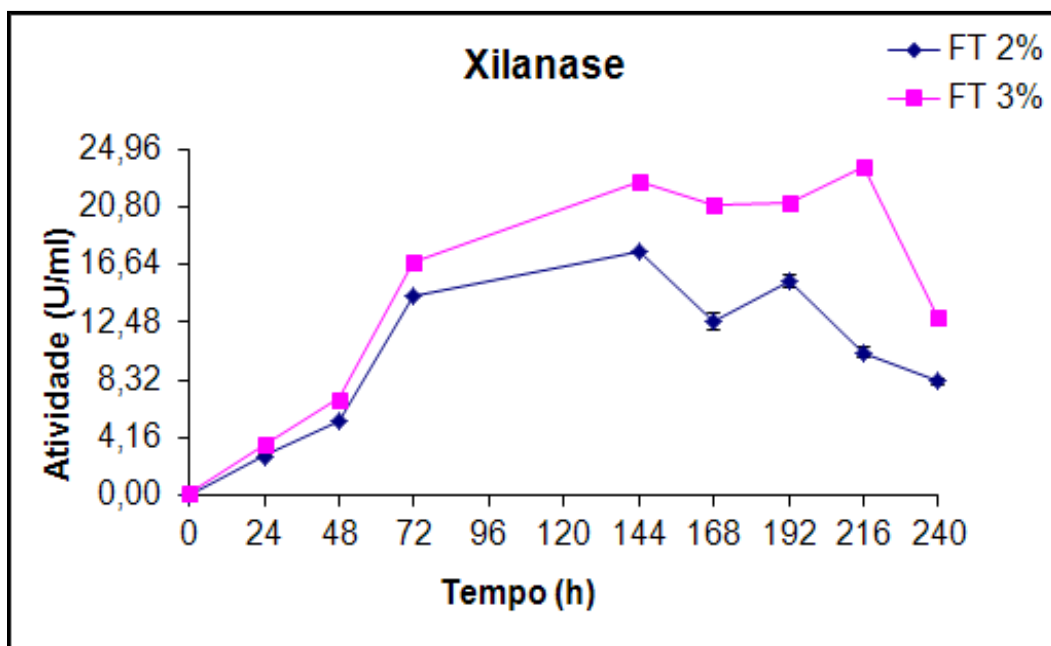


Figura 2. Produção de FPases e Avicelases pelo *H. grisea* na presença de 1 e 2 % de FT.

3A



3B

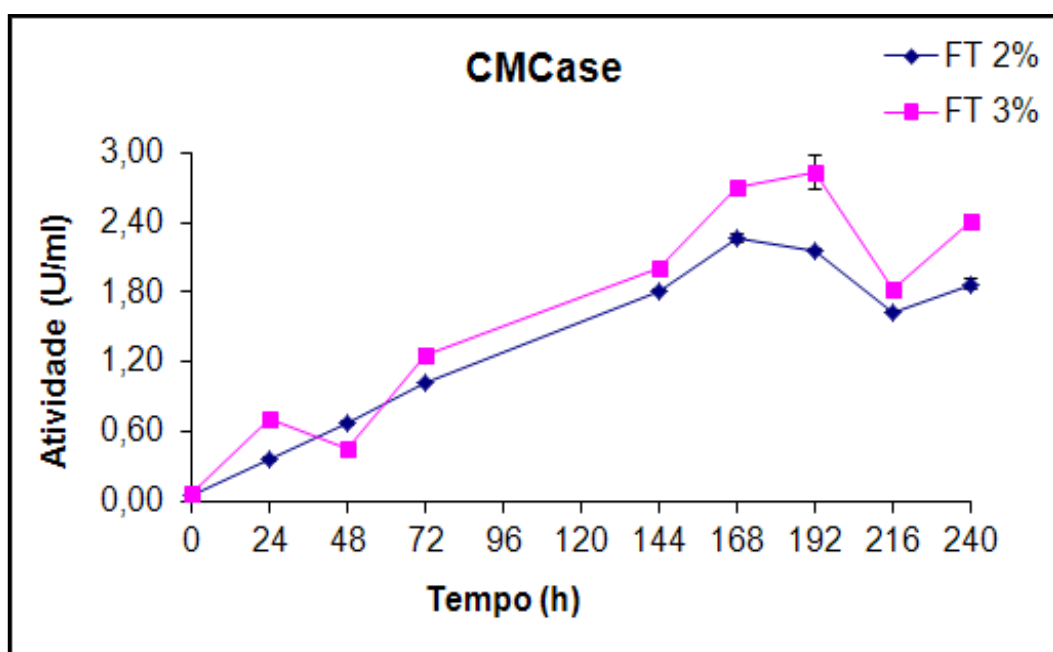
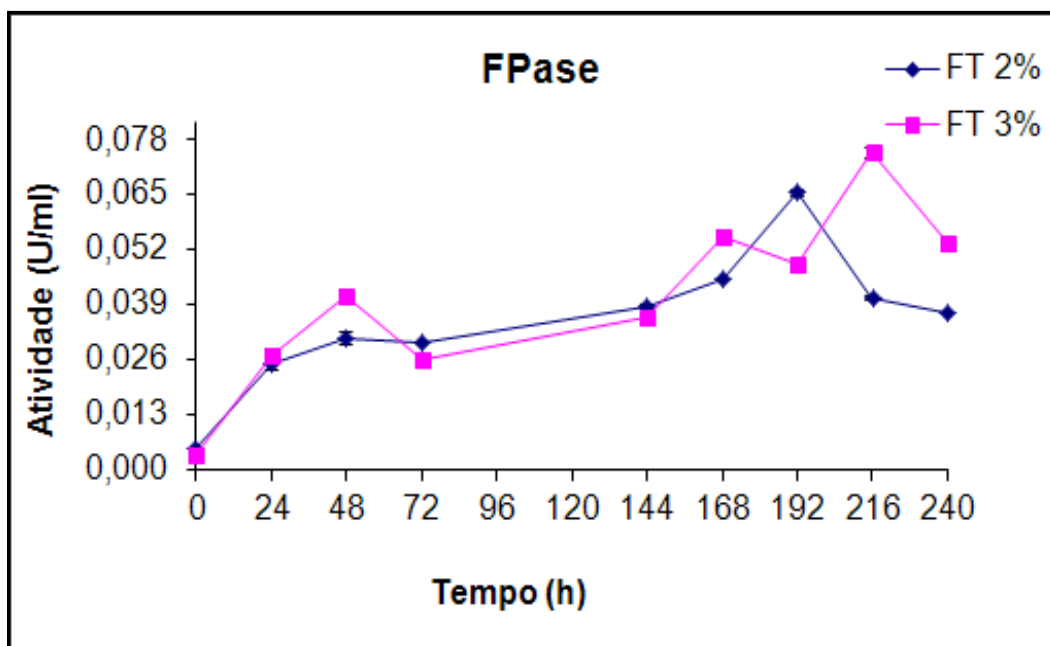


Figura 3. Produção de Xiilanases e CMCases pelo *H. grisea* na presença de 2 e 3% de FT.

4A



4B

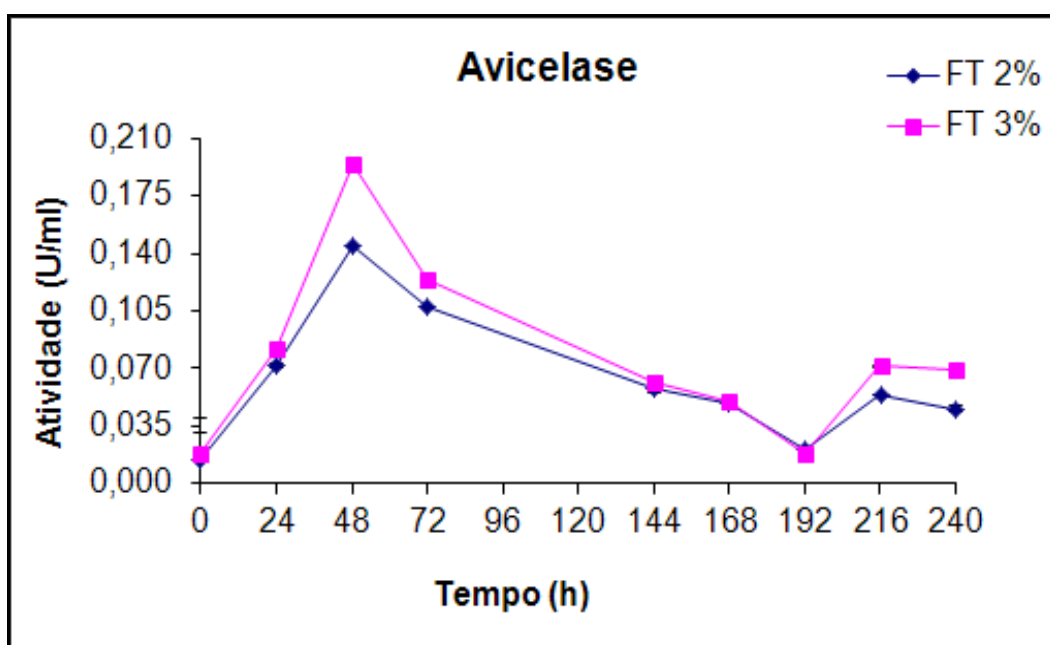


Figura 4. Produção de FPases e Avicelases pelo *H. grisea* na presença de 2 e 3% de FT.