



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

DIANA FORTKAMP

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE XILANASES  
PRODUZIDAS POR *Trichoderma viride*

GUARAPUAVA

2013

DIANA FORTKAMP

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE XILANASES  
PRODUZIDAS POR *Trichoderma viride*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Knob

GUARAPUAVA

2013

DIANA FORTKAMP

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE XILANASES  
PRODUZIDAS POR *Trichoderma viride*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Banca examinadora:

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Adriana Knob

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Marina Kimiko Kadowaki

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Sonia Alvim Veiga Pileggi

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Cedeteg

F743p Fortkamp, Diana  
Produção e caracterização físico-química de xilanases produzidas por  
*Trichoderma viride* / Diana Fortkamp. - - Guarapuava, 2013  
xiv, 86 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, em associação ampla  
com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de concentração em  
Biologia Evolutiva, 2013

Orientadora: Adriana Knob  
Banca examinadora: Marina Kimiko Kadowaki, Sonia Alvim Veiga  
Pileggi

#### Bibliografia

1. Biologia evolutiva. 2. Biotecnologia. 3. Cultivo submerso. 4. Enzimas.  
5. Fungos filamentosos. 6. Resíduos agroindustriais. I. Título. II. Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

CDD 660.6

*Dedico este trabalho aos meus  
pais por todo o amor, carinho e  
incentivo que sempre recebi.*

## AGRADECIMENTOS

### **A Deus**

Pelo dom da vida, por todas as oportunidades e por Sua presença constante, sempre me conduzindo e colocando pessoas maravilhosas no meu caminho.

### **A prof. Dra. Adriana Knob**

Por ter aceitado ser minha orientadora, por todos os ensinamentos e conselhos repassados ao longo desses dois anos, por ter me ajudado todas as vezes que precisei, além de ter me incentivado para eu prosseguir na carreira acadêmica.

### **Ao meu namorado Renan**

Por estar sempre presente durante toda a pesquisa e escrita deste trabalho, me apoiando, dando dicas, sendo bastante prestativo e contribuindo para que tudo ficasse melhor.

### **A Janaína, Simone, Thaiane, Susan, Alisson, Mariana, Juliana e Vanessa**

Meus colegas de laboratório, por tornarem o trabalho mais divertido e agradável, além de terem sido generosos em me ensinar muitas coisas.

### **A todos os colegas de mestrado**

Pelo companheirismo.

### **A todos os professores que estiveram presentes durante a graduação e o mestrado**

Por terem contribuído imensamente para a minha formação.

**As minhas amigas Bruna, Lidiane e Juliana**

Pelas conversas inspiradoras.

**Aos meus pais, meu irmão, minha vó e meus tios**

Por toda a paciência, amor e carinho.

**A Universidade Estadual do Centro-Oeste**

Pela oportunidade de ter cursado o mestrado e por ter cedido a estrutura para a  
realização desta pesquisa.

**A CAPES**

Pela bolsa concedida.

Muito obrigada!

*“Nosso medo mais profundo não é que sejamos inadequados. Nosso medo mais profundo é que sejamos poderosos demais. É nossa sabedoria, não nossa ignorância, o que mais nos apavora. Perguntamo-nos: ‘Quem sou eu para ser brilhante, belo, talentoso, fabuloso?’ Na verdade, por que você não seria? Você é um filho de Deus. Seu medo não serve ao mundo. Não há nada de iluminado em se diminuir para que outras pessoas não se sintam inseguras perto de você. Nascemos para expressar a glória de Deus que há em nós. Ela não está em apenas alguns de nós; está em todas as pessoas. E quando deixamos que essa nossa luz brilhe, inconscientemente permitimos que outras pessoas façam o mesmo. Quando nos libertamos de nosso medo, nossa presença automaticamente liberta as outras pessoas.”*

**Nelson Mandela**



## Resumo

As xilanases são hidrolases que despolimerizam os componentes de xilana presentes nas paredes celulares das plantas. Suas aplicações incluem uso nas indústrias de papel e celulose, de alimentos, de ração animal, têxtil, entre outras. Este estudo é o primeiro a reportar a produção de xilanases extracelulares utilizando casca de abacaxi como substrato por uma linhagem de *Trichoderma viride* e otimizar a sua produção. Adicionalmente, a caracterização bioquímica das xilanases produzidas foi realizada. A atividade xilanásica foi determinada de acordo com o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), utilizando-se xilose como padrão. A determinação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford modificado, utilizando-se soro albumina bovina como padrão. A casca de abacaxi foi o resíduo agroindustrial que induziu a maior produção de xilanases, na concentração de 2%, por sete dias em cultivo estacionário, a 28 °C, em pH 7,5. As xilanases apresentaram-se mais ativas a 50 °C, em pH 6,0, mantendo-se estáveis em pH 5,0-5,5 (93,8% e 85,25% de atividade residual, respectivamente). As xilanases produzidas por *T. viride* foram estáveis a 40 °C, apresentando meia-vida ( $T_{1/2}$ ) de 255 min. A enzima foi notavelmente ativada por  $Mg^{+2}$  e  $Zn^{+2}$ , enquanto que  $Pb^{+3}$  e  $Hg^{+2}$  inibiram fortemente a atividade xilanásica. Este trabalho demonstra o potencial do fungo filamentosso *T. viride* de crescer no resíduo agroindustrial casca de abacaxi e produzir níveis elevados de xilanases. As enzimas produzidas mostram-se promissoras para aplicações industriais, principalmente nos processos em que as celulases são indesejáveis, como indústrias de polpa, papel e têxteis.

**Palavras-chave:** biotecnologia, cultivo submerso, enzimas, fungos filamentosos, resíduos agroindustriais.

## Abstract

The xylanases are hydrolases which depolymerize the xylan components present in the plants cell walls. Applications include use in the pulp and paper industries, food, animal feed, textiles, among others. This study is the first report about the extracellular xylanase production using pineapple peel as substrate by a *Trichoderma viride* strain and optimizes their production. Additionally, the xylanases produced were biochemically characterized. The xylanase activity was determined according to 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method, using xylose as standard. The protein was determined by modified Bradford method, using bovine serum albumin as standard. Pineapple peel was the agro-industrial waste that induced higher xylanase production at 2% concentration, for seven days, in stationary cultivation at 28 °C, in pH 7.5. Xylanases were more active at 50 °C, pH 6.0, remaining stable at pH 5.0-5.5 (93.8% and 85.25% of residual activity, respectively). *T. viride* xylanase was stable at 40 °C, showing the half-life ( $T_{1/2}$ ) value of 255 min. The enzyme was remarkably stimulated by  $Mg^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ , while  $Pb^{3+}$  and  $Hg^{2+}$  were strong inhibitors of the xylanase activity. This work shows the ability of the filamentous fungus *T. viride* to grow on the agro-industrial waste pineapple peel and produce high levels of xylanases. The enzymes produced are promising for industrial application, mainly in process that cellulases are undesirable, such as pulp, paper and textile industries.

**Keywords:** biotechnology, submerged fermentation, enzymes, filamentous fungi, agro-wastes.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura da parede celular vegetal .....	4
FIGURA 2 - Estrutura química dos principais componentes da parede celular vegetal. .	5
FIGURA 3 - Estrutura esquemática da xilana.....	7
FIGURA 4 - Produção de abacaxi em toneladas em 2011 nos sete maiores países produtores mundiais da fruta .....	12
FIGURA 5 – Projeção do faturamento do mercado global de enzimas industriais (em milhões de dólares) de 2008-2015 .....	20
FIGURA 6 - Atuação da xilanase formando xilo-oligossacarídeos como produto. ....	23
FIGURA 7 - Filograma das xilanases produzidas por diferentes grupos de organismos. ....	25
FIGURA 8 - Culturas de <i>H. rufa</i> / <i>T. viride</i> depois de uma semana a 25 °C .....	36
FIGURA 9 – <i>T. viride</i> , IFO 30498. ....	36
FIGURA 10 - Conidióforo de <i>T. viride</i> , com ênfase nas fíalides, visto por meio de microscopia de contraste de fase. ....	37

### Capítulo I

Figure 1 .....	63
Figure 2 .....	64
Figure 3 .....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais propriedades de xilanases produzidas por fungos filamentosos. .	27
Tabela 2 – Principais propriedades de xilanases produzidas por bactérias. ....	31

### Capítulo I

Table 1. Influence of agro-industrial wastes on xylanase production by <i>T. viride</i> .....	59
Table 2. Effect of pineapple peel concentration on xylanase production by <i>T. viride</i> .	60
Table 3. Effect of different temperatures on xylanase production by <i>T. viride</i> .....	61
Table 4. Effect of different substances on xylanase from <i>T. viride</i> .....	62

## LISTA DE SIGLAS

**β:** Beta

**°C:** graus Celsius

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético

**FES:** Fermentação em estado sólido

**FSm:** Fermentação submersa

**g:** grama

**h:** hora

**M:** molar

**mg:** miligrama

**mg/mL:** miligramas por mililitros

**min:** minutos

**mL:** mililitros

**pH:** potencial hidrogeniônico

**rpm:** rotações por minuto

**SDS:** dodecil sulfato de sódio

**T ½:** meia vida

**U:** Unidade enzimática

**U/mL:** Unidades por mililitros

**v/m:** volume por massa

**μL:** microlitro

**μmol:** micro mol

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	3
2.1. Geral.....	3
2.2. Específicos.....	3
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	4
3.1. Composição da Parede Celular Vegetal.....	4
3.2. Xilana.....	6
3.3. Resíduos Agroindustriais.....	8
3.4. O Resíduo Agroindustrial Casca de Abacaxi.....	10
3.5. Produção de Enzimas Microbianas.....	13
3.6. Fatores que Afetam a Produção de Enzimas por Micro-organismos.....	15
3.6.1. Fermentação em Estado Sólido e Fermentação Submersa.....	15
3.6.2. pH.....	16
3.6.3. Temperatura.....	17
3.6.4. Substrato.....	17
3.6.5. Espécie Fúngica.....	18
3.7. Aplicações das Enzimas.....	19
3.8. Enzimas Desramificadoras da Xilana.....	22
3.9. Xilanases.....	23
3.9.1. Definição e Modo de Ação.....	23
3.9.2. Classificação.....	24
3.9.3. Fontes.....	24
3.9.4. Principais Características das Xilanases.....	26
3.9.5. Aplicações Biotecnológicas.....	33
3.10. O Gênero <i>Trichoderma</i> e a Espécie <i>Trichoderma viride</i> .....	34

<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	39
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	40
Capítulo I .....	41
<b>Abstract</b> .....	43
<b>Introduction</b> .....	44
<b>Material and methods</b> .....	45
Fungal strain and culture conditions .....	45
Enzyme and protein assay .....	46
Culture conditions for xylanase production .....	46
<i>Agro-industrial wastes</i> .....	46
<i>Enzyme production on different carbon sources</i> .....	46
<i>Effect of incubation period, initial pH and temperature on xylanase production</i> ..	47
Enzyme characterization .....	47
<i>Optimum pH and temperature xylanase activity</i> .....	47
<i>Xilanase thermostability and pH stability</i> .....	47
<i>Effect of ions and other substances on xylanase activity</i> .....	47
<b>Results and discussion</b> .....	48
Influence of the carbon source and its concentration on the xylanase production .....	48
Effects of culture conditions on xylanase production .....	49
<b>Conclusions</b> .....	52
<b>References</b> .....	52
<b>6. Considerações finais</b> .....	67
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	68

## 1. Introdução

Com a diminuição das florestas e o aumento das grandes monoculturas e das indústrias, o aproveitamento dos resíduos agroindustriais vem sendo um assunto bastante investigado. Eles são gerados como sobras da agricultura, das indústrias de suco, de ração, têxteis e muitas outras, e quando descartados no meio-ambiente são fontes de poluição.

O abacaxi é uma importante cultura de frutas no Brasil, e seu processamento gera grande quantidade de resíduos lignocelulósicos, os quais, na maioria das vezes, não tem destino adequado.

Os resíduos lignocelulósicos, como o próprio nome indica, são ricos em lignina, celulose e hemicelulose, sendo o xilano o principal componente da hemicelulose. Para que esses resíduos sejam completamente degradados, faz-se necessária a ação conjunta de diversas enzimas, como as celulasas e xilanases.

As enzimas são produzidas por animais, vegetais, fungos e bactérias. Entretanto, os micro-organismos se mostram mais interessantes para essa finalidade, em especial os fungos. Estes secretam extracelularmente suas enzimas, além de apresentarem um crescimento rápido e poderem ser cultivados de modo a otimizar a produção das enzimas requeridas, por ajustes de temperatura, pH, fonte de carbono, entre outros.

As xilanases estão entre as enzimas que têm sido alvo de muitas pesquisas nos últimos anos, no intuito de diminuir seus custos de produção. As enzimas xilanolíticas são empregadas em vários setores industriais, como nas indústrias de papel e celulose para o clareamento de polpas kraft, na clarificação de sucos, melhoria na consistência de cerveja e aumento da digestibilidade de ração para animais.

Dessa forma, uma solução para o aproveitamento dos agro-resíduos é a sua utilização como fonte de carbono para o cultivo de fungos produtores de enzimas. Isso possibilitaria a redução em seus custos de produção, propiciando uma destinação ambientalmente mais correta a esses resíduos. As enzimas deverão permanecer estáveis e com alta atividade nas faixas de pH e temperatura condizentes com a dos processos industriais em que deverão atuar.

*Trichoderma viride* é um fungo filamentosos muito utilizado na agricultura por combater outros fungos causadores de doenças. Alguns estudos apontam este micro-organismo como um eficiente produtor de xilanases. Diante do exposto acima, o



objetivo deste trabalho foi determinar os parâmetros ótimos de produção de xilanases por uma linhagem de *T. viride* utilizando resíduos agroindustriais, bem como caracterizá-las bioquimicamente.

## 2. Objetivos

### 2.1. Geral

Determinar a influência de fatores físico-químicos sobre a produção de xilanases pelo fungo *T. viride* e caracterizá-las bioquimicamente, a fim de se inferir possíveis aplicações industriais.

### 2.2. Específicos

1. Verificar a influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de xilanases;
2. Avaliar a porcentagem de fonte de carbono capaz de induzir a maior produção de xilanases;
3. Verificar a cinética de produção em estado estacionário;
4. Avaliar as influências do pH e da temperatura de cultivo sobre a produção de xilanases;
5. Determinar o pH e a temperatura ótimos da atividade enzimática;
6. Verificar a estabilidade das xilanases frente à temperatura e ao pH;
7. Avaliar o efeito de íons metálicos e de outras substâncias sobre a atividade das enzimas produzidas.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Composição da Parede Celular Vegetal

Os vegetais são a fonte mais abundante de biomassa terrestre e são usados para o consumo humano, tanto para a alimentação, como para a produção de energia renovável. O conhecimento sobre a constituição da parede celular vegetal é de suma importância, visto que o carbono atmosférico fixado durante a fotossíntese é incorporado em sua estrutura sob a forma de polímeros (FARINAS, 2011). A parede celular é responsável pela resistência mecânica das estruturas vegetais, promoção da junção das células, atua como exoesqueleto, controlando a forma e permitindo altas pressões de turgência, além de proporcionar proteção contra agressões físicas e químicas. Ela também é essencial na maioria dos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007; LIEPMAN et al., 2010). Apesar da sua importância, relativamente pouco se sabe sobre a identidade dos genes e funções das proteínas envolvidas em sua biossíntese (LIEPMAN et al., 2010).

As células vegetais são unidas de maneira firme por uma lamela média, conforme mostrado na Figura 1.

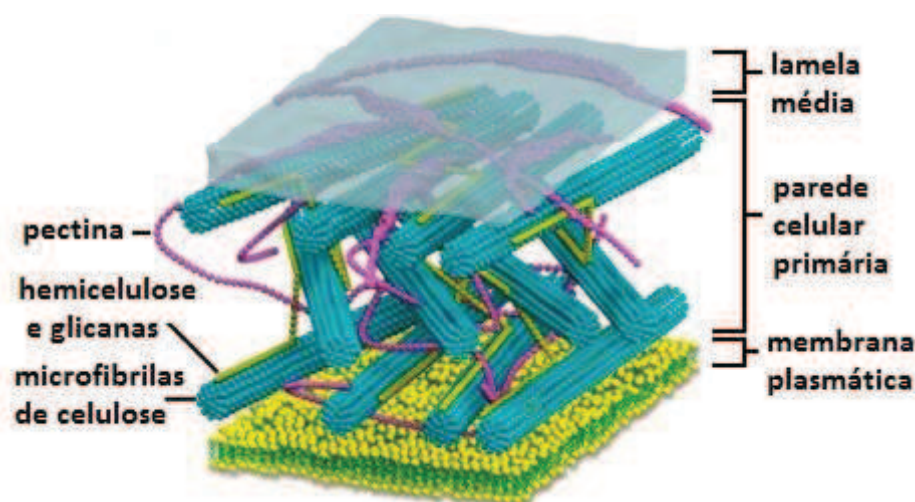
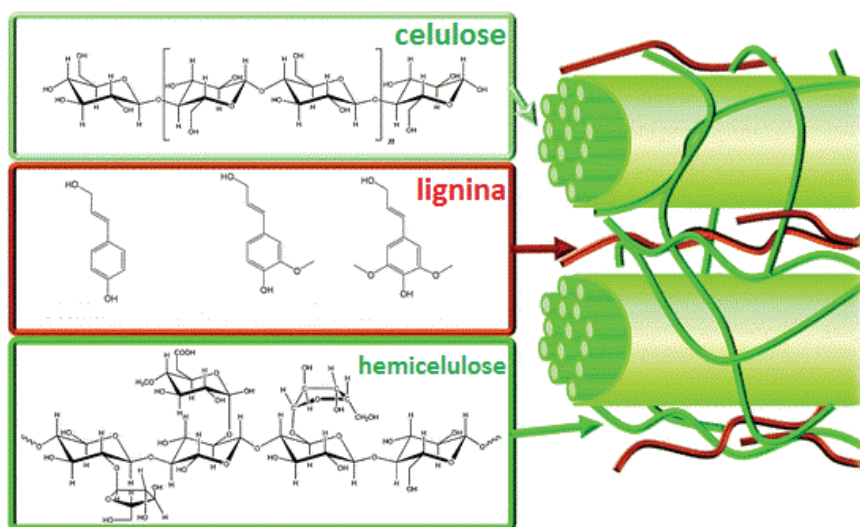


FIGURA 1 - Estrutura da parede celular vegetal. Fonte: Adaptado de Davidson (2013).

A parede celular é composta por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2), em proporções que variam em cada camada e também dependem da espécie vegetal. Em geral, a lignina representa até 84% do peso da lamela média composta, enquanto que a parede secundária interna é constituída por até 87% de hemicelulose, com pouca ou nenhuma lignina. Já a parede secundária média apresenta em torno de 54% de celulose, sendo esta mais resistente que a primária devido à presença de lignina (ROWELL, 2005; TAIZ e ZEIGER, 2009).



**FIGURA 2** - Estrutura química dos principais componentes da parede celular vegetal. Fonte: Adaptado de Alonso, Wettstein e Dumesic (2012).

Khandeparker e Numan (2008) ressaltam que a disposição desses diferentes polímeros na parede celular forma uma barreira para a degradação por uma única enzima. Assim, uma combinação de xilanases e outras enzimas atuantes em xilana torna a degradação mais eficaz. Lo et al. (2008) também mencionam a estrutura do complexo de lignocelulose de plantas lenhosas como sendo limitante à acessibilidade dos microorganismos e suas enzimas. Segundo Murashima, Kosugi e Doi (2003), celulases e hemicelulases isoladamente apresentam dificuldades em degradar a parede celular vegetal.

Além disso, as hemiceluloses dificultam o acesso enzimático à superfície da celulose. As xilanas e os seus oligômeros, os quais são um tipo de hemicelulose, podem impedir a atividade das celulases, exercendo um efeito muito maior daquele que é observado em presença de glicose e celobiose, os quais são inibidores das enzimas

celulolíticas. Sendo assim, com a eliminação da hemicelulose, a celulose pode ser removida com quantidades inferiores de enzimas celulolíticas (QING e WYMAN, 2011). Por essa razão, a interação de várias enzimas é necessária para que haja a conversão completa dos substratos lignocelulósicos em açúcares solúveis (BILLARD et al., 2012).

A celulose é um polissacarídeo composto por moléculas de glicose unidas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas e ligações de hidrogênio (WYMAN et al., 2005). As ligninas são redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas. Já as hemiceluloses são polímeros heterogêneos, apresentando uma estrutura aparentemente amorfa e cadeias mais curtas e ramificadas que a celulose. Adicionalmente, não formam regiões cristalinas, sendo as cadeias principais de hemicelulose substituídas por uma variedade de outros açúcares (WYMAN et al., 2005; SCHELLER e ULVSKOV, 2010). Sua função é essencialmente de suporte (SJÖSTRÖM, 1981).

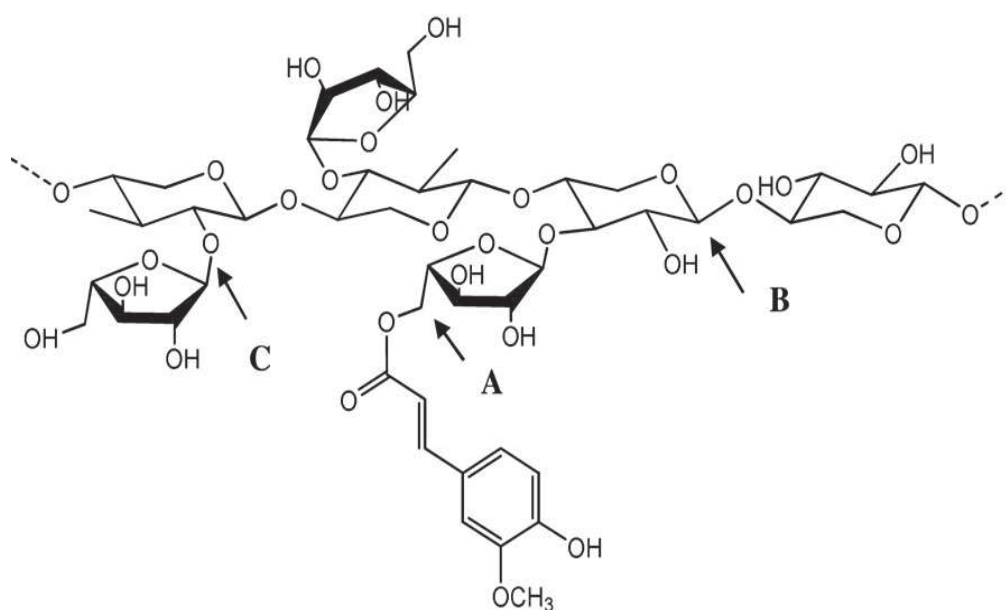
As hemiceluloses apresentam sua cadeia principal unida por meio de ligações  $\beta$ -1,4 de açúcares em uma configuração equatorial, sendo que cadeias laterais curtas são ligadas à cadeia principal de alguns desses polímeros (WYMAN et al., 2005; SCHELLER e ULVSKOV, 2010). Podem ser compostas por uma variedade relativamente pequena de monossacarídeos, sendo os mais comuns: D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ácido glucurônico e ácido galacturônico. Além disso, podem apresentar grupos acetil, feruloil e cinamoilo esterificados (COLINS, GERDAY, FELLER, 2005).

Devido à sua complexidade estrutural, a hidrólise das hemiceluloses é dificultada (JOVANOVIC et al., 2009). No entanto, micro-organismos produzem enzimas capazes de quebrar alguns ou todos os componentes da biomassa lignocelulósica. Apesar de requererem um grupo mais diverso de enzimas para obter completa hidrólise dos açúcares, as hemiceluloses são mais acessíveis ao ataque químico ou enzimático.

### 3.2. Xilana

A xilana é o principal tipo de hemicelulose que compõe a parede celular das plantas. De um modo geral, esse polissacarídeo apresenta uma estrutura linear que

consiste de resíduos de xilose, unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, podendo ainda apresentar resíduos substituintes como L-arabinofuranosil, acetil, glucuronosil e 4-O-metilglucuronosil, conforme mostrado na Figura 3. Sua hidrólise envolve a participação de endo- $\beta$ -1,4-xilanases e  $\beta$ -xilosidases, entre outras enzimas do complexo xilanolítico (NAKAMURA, 2003; MONISHA, UMA, MURTHY, 2009).



**FIGURA 3** - Estrutura esquemática da xilana. A: Ácido ferúlico ligado a um resíduo de arabinose ; B: Cadeia principal da xilana, constituída por resíduos de xilose unidos por ligações do tipo  $\beta$ ,1-4; C: Resíduo de arabinose ligado à cadeia principal da xilana. Fonte: Adaptado de Buanafina, 2009.

A estrutura da xilana confere resistência à célula vegetal contra a degradação microbiana por meio de suas ligações entre as unidades de xilose, pela presença de grupos substituintes laterais e por sua interação com outros polissacarídeos da parede celular. Por esta razão, os micro-organismos produzem diversas enzimas com funções especializadas para alcançar a hidrólise total deste polissacarídeo (KHENG e IBRAHIM, 2005).

Segundo Gupta e Kar (2009), a hidrólise da xilana gera vários compostos mais simples, com inúmeras aplicações biotecnológicas. Apesar de possuir um enorme potencial como fonte de açúcar, é composta, predominantemente, de pentoses, as quais ainda não são convertidas de modo eficiente em etanol (YANG e WYMAN, 2004; JEOH et al., 2007).

A hidrólise da xilana pode ser feita de forma química ou enzimática. A conversão química tem a desvantagem de empregar ácido e temperaturas elevadas, além

de poder causar a degradação do produto final, enquanto que a hidrólise enzimática é ambientalmente correta e propicia um melhor controle para evitar a degradação dos açúcares formados (MARAIS, 2008).

### 3.3. Resíduos Agroindustriais

Os resíduos agroindustriais são compostos de material lignocelulósico e são gerados em grandes quantidades nas agroindústrias, como as de papel e celulose, madeiras, alimentícias, entre outras, como sobras de produção.

O aumento da conscientização ecológica iniciada no final do século XX evidenciou a necessidade de um equilíbrio na sustentabilidade ambiental (PINTO et al., 2005). Por esta razão, durante as duas últimas décadas, muitas mudanças foram feitas na legislação ambiental, o que obrigou as indústrias a encontrar usos alternativos para a eliminação dos seus resíduos, especialmente a agroindústria, onde se produzem milhares de toneladas de subprodutos como bagaço de cana, bagaços cítricos, cascas de frutas, sabugo de milho e soro de queijo (ROSA et al., 2001; RAGHAVARAO, RANGANATHAN, KARANTH, 2003; GRAMINHA et al., 2008). O descarte de resíduos agrícolas na terra e nos corpos de água provoca um sério risco ecológico, assim como sua queima ou decomposição em céu aberto (LAUFENBERG, KUNZ, NYSTROEM, 2003; ALI e ZULKALI, 2011).

Somente a América Latina produz 500 milhões de toneladas de resíduos agroindustriais por ano, sendo o Brasil responsável por mais de metade desta quantidade (SOUZA, SOUZA, SANTOS, 2007). Entretanto, a reutilização destes resíduos é possível, de forma que eles podem servir como substratos para processos fermentativos e gerar produtos de alto valor agregado, sendo este um método de gestão de resíduos que respeita o meio ambiente (BIRCH, BLACKBROUGH, PARKER, 1981; COUTO, 2008; ALI e ZULKALI, 2011).

A composição média dos resíduos lignocelulósicos é de 50% celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (CHIACCHIO, MESQUITA, SANTOS, 2006), sendo que a maior parte da hemicelulose é composta de xilana (PADMAVATHI et al., 2011). Também apresentam outros compostos em menores quantidades como gorduras, gomas, alcalóides, resinas, óleos essenciais, sílica, carbonatos e oxalatos. Estes últimos podem

conferir características a estes resíduos, como cor, sabor e resistência ao apodrecimento (KUHAD e SING, 1993).

Por serem ricos em açúcares devido a sua natureza orgânica, os resíduos agroindustriais são facilmente consumidos por micro-organismos. Estes fazem dessas substâncias residuais muito adequadas para a exploração como uma matéria-prima para a produção de componentes de valor elevado (RAGHAVARAO, RANGANATHAN, KARANTH, 2003; GRAMINHA et al., 2008). Desta forma, apresentam grande valor biotecnológico para a obtenção de novos materiais, de produtos químicos e de energia (MAHESWARI e AISWARYA, 2012).

Jamal, Saheed e Alam (2012), afirmam que os avanços recentes na biotecnologia industrial oferecem importantes oportunidades econômicas para a utilização de resíduos agroindustriais. Apesar da estrutura dos resíduos não ser muito adequada para a alimentação de animais monogástricos, devido à grande quantidade de fibras, eles possuem outras aplicações mais rentáveis (BIRCH, BLACKBROUGH, PARKER, 1981).

Ballesteros (2001) afirma que há uma abundância de materiais lignocelulósicos no mundo inteiro, além de uma carência de fontes de energia. Assim, os resíduos podem ser usados para a produção de biocombustíveis (QUIROZ-CASTANEDA et al., 2011). Por esta razão, as bioconversões de materiais celulósicos estão sendo alvo de intensa investigação como um processo benéfico para a humanidade quando utilizado em larga escala. Tal processo ajudaria a aliviar a escassez de alimentos e rações, resolvendo o problema moderno de eliminação de resíduos, diminuindo a dependência do homem em relação aos combustíveis fósseis. Também atuaria fornecendo uma fonte conveniente e renovável de energia na forma de glicose (MUKHERJEE, KARMAKAR, RAY, 2011).

Nos últimos anos, os resíduos como bagaço, palha de arroz, casca de arroz e resíduos de amido têm sido utilizados como substrato para o crescimento de micro-organismos. O grande volume desses materiais os torna econômicos, sendo que seu uso diminui os problemas de poluição e promove uma destinação correta dos resíduos. Resíduos agrícolas são substratos úteis para a produção de proteínas microbianas, porém devem satisfazer alguns critérios, como: serem atóxicos, abundantes, totalmente regeneráveis, não exóticos, baratos e capazes de suportar a rápida multiplicação de organismos, resultando em biomassa de elevada qualidade (DHANASEKARAN et al., 2011).



A xilana, em geral, induz a biossíntese de xilanase, uma vez que é seu substrato natural. Entretanto, existem outras alternativas mais viáveis a serem empregadas em sua produção, como os resíduos agro-industriais (CHIACCHIO, MESQUITA, SANTOS, 2006). Segundo Okafor et al. (2007a) a produção de xilanases com a utilização de resíduos agroindustriais tem a dupla vantagem de diminuir os custos e reduzir a poluição ambiental devido aos resíduos que seriam depositados no meio ambiente. Nesse sentido, vários resíduos agroindustriais como farelo de trigo, farelo de aveia, espiga de milho, bagaço de cana e bagaço de malte têm sido investigados nos últimos anos como substratos para a produção de xilanases fúngicas (PAPAGIANNI, 2003; VAN DEN BRINK e DE VRIES, 2011; DELABONA et al., 2012; KNOB et al., 2013).

Apesar da enorme utilização em todo o mundo de fontes naturais de celulose, ainda existem quantidades abundantes desse polímero em resíduos que deixam de ser utilizados. Em alguns países, partes de plantas descartadas, como cascas de frutos secos e pétalas de flores, são uma fonte de desperdício na área civil e geram odores desagradáveis. Uma alternativa é utilizá-los para a produção de enzimas, como a exemplo de uma linhagem de *Rhizopus oryzae* que foi capaz de sintetizar uma quantidade elevada de exoglucanase extra-celular utilizando como substrato flores secas e cascas de limão doce (MUKHERJEE, KARMAKAR, RAY, 2011).

### 3.4. O Resíduo Agroindustrial Casca de Abacaxi

O abacaxi (*Ananas comosus*) é uma fruta tropical pertencente à classe Magnoliopsida e à família Bromeliaceae (NATIONAL PLANT DATA CENTER, 2000). Mede de seis a oito polegadas, sendo um fruto composto e de forma oval, com folhas pontudas e robustas, casca dura e cerosa e com cores na escala de verde, marrom e amarelo (OMOJASOLA, JILANI, IBIYEMI, 2008).

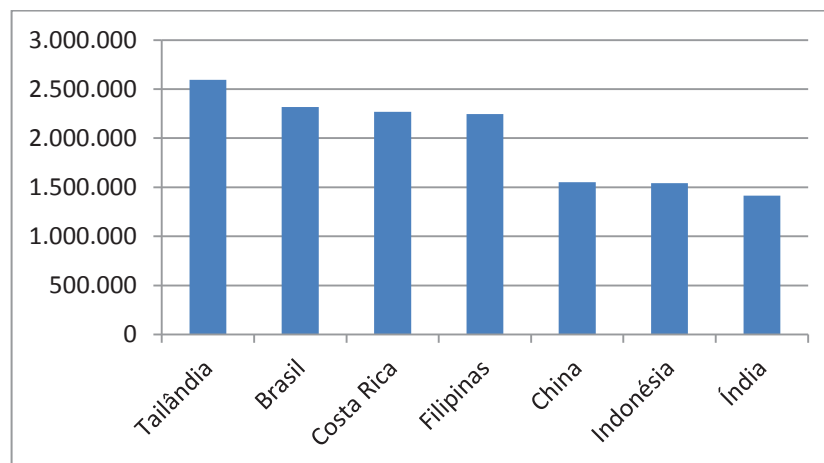
É uma fruta usada há tempos na medicina popular para despertar o apetite, como diurético, contraceptivo, vermífugo, para prevenir úlceras, aumentar a excreção de gordura, entre outros (TAUSSIG e BATKIN, 1988). Segundo Okafor et al. (2011) as cascas ainda são usadas na medicina popular no tratamento de várias doenças, tais como malária e febre tifóide. Além disso, o abacaxi é fonte da enzima proteolítica bromelina, a qual é utilizada em amaciadores de carne comerciais. Esta enzima possui algumas propriedades que incluem a interferência no crescimento de células malignas, a inibição

da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação anti-inflamatória, e propriedades de desbridamento da pele, o que em parte está relacionado com sua modulação da cascata de araquidonato. Além disso, é rica em flavonoides (antioxidantes), vitamina A e C (TAUSSIG e BATKIN, 1988).

Esta fruta cresce nos trópicos e subtropicais, sendo nativa da América Central e do Sul (TAUSSIG e BATKIN, 1988). Sua origem tem sido atribuída ao Brasil e Paraguai na bacia Amazônica. A zona compreendida entre Panamá superior e Brasil, Paraguai e Argentina, incluindo a Floresta Amazônica do norte e as regiões semi-áridas do Brasil, Venezuela e Guianas tem sido definida como a área mais provável de sua origem (COLLINS, 1949).

O abacaxi é uma cultura importante de frutas. Em relação à produção mundial, o abacaxi é a segunda safra de maior importância depois da banana, representando mais de 20% da produção mundial de frutas tropicais (COVECA, 2002). Na Índia, cerca de 100 cultivares diferentes são conhecidas, dos quais 'Kew' e 'Queen' são mais úteis e amplamente cultivadas. As estimativas da área de abacaxi plantada nesse país variam de 24.350 ha a 56.000 ha (ARGYRO, COSTAS, ATHANASIOS, 2006; CATHERINE e VANITHA, 2012).

O Brasil apresenta a segunda maior produção mundial de abacaxi (Figura 4), correspondendo a 2.318.120 toneladas (FAO, 2013). No país, o abacaxi é a terceira fruta mais produzida. Em 2012 ela representou 6,9% do volume total da fruticultura brasileira, com 3,1 milhões de toneladas, sendo os estados de Minas Gerais, Paraíba e o Pará os principais produtores, responsáveis por 48,4% da produção nacional. Com relação à produção de abacaxi por região, o Nordeste se destacou com 41,7 % do total, quando comparados ao Sudeste (28,9 %), Norte (21,1%), Centro Oeste (8%) e Sul (0,9 %) (IBGE, 2011).



**FIGURA 4** - Produção de abacaxi em toneladas em 2011 nos sete maiores países produtores mundiais da fruta. Fonte: Adaptado de FAO (2013).

O suco de abacaxi é o terceiro na preferência mundial, perdendo apenas para os sucos de laranja e maçã (CABRERA et al., 2000). Como subprodutos da extração do suco de abacaxi são gerados resíduos, tais como as cascas, miolos, coroas, folhas e hastes, que constituem cerca de 50% do peso original da fruta (BARTOLOMÉ, RUPÉREZ, FÚSTER, 1995).

De acordo com Rani e Nand (2004), os resíduos de casca de abacaxi representam um grave problema de poluição ambiental. A casca, em particular, é rica em celulose, hemicelulose e outros carboidratos sendo um substrato potencial para a geração de metano pela digestão anaeróbica. Possui um pH de 4,7 e é composta de 11% de lignina, 12% de celulose, 6,5% de hemicelulose, 7,1% de pectina, 3,3% de proteínas, 27,8% de açúcares redutores, 4,9% de açúcares não redutores e 6,7% de sólidos solúveis de éter. Dev e Ingle (1982) apontam os resíduos de abacaxi como substratos para a produção de bromelina, vinagre, vinho, alimentos, rações e ácidos orgânicos.

A reconversão econômica de recursos renováveis em produtos industrialmente úteis tem atraído atenção nos últimos anos, gerando um aproveitamento de grande número de resíduos agrícolas, sendo a casca de abacaxi um deles (CATHERINE e VANITHA, 2012). Uma vez que o tratamento de resíduos de abacaxi é caro, os mesmos são normalmente utilizados como ração animal ou são depositados em aterros, onde a digestão anaeróbia pode ocorrer, seguida por vazamento de metano do aterro sanitário (NAMSREE et al., 2012).

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de encontrar um destino ambientalmente mais favorável aos resíduos provenientes do processamento do abacaxi

(SRUAMISRI, 2007; DACERA, BABEL, PARKPIAN, 2009; MAINOO et al., 2009). Porém, a maior parte da casca de abacaxi ainda é utilizada quase que exclusivamente na ração animal.

Dhanasekaran et al. (2011) realizaram um estudo para a produção de proteínas por *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* crescidas em meio suplementados com resíduos de casca de abacaxi. Foi provado que o aumento da concentração de abacaxi hidrolisado melhorou a produção de biomassa e a formação de proteínas dentro das células leveduriformes.

No trabalho realizado por Guo et al. (2003), foram testados os níveis de antioxidantes presentes nas cascas, polpas e sementes, sendo que das 29 frutas testadas a casca de abacaxi ficou em 19º lugar, com  $2.01 \pm 0.03$  mmol de atividade antioxidante para cada 100 g de peso úmido.

Saravanan, Muthuvelayudham e Viruthagiri (2013) otimizaram a produção de celulases por *Trichoderma reesei* utilizando resíduos de abacaxi como substrato e concluíram que este é um bom substrato a ser empregado na produção de celulases.

### 3.5. Produção de Enzimas Microbianas

Enzimas são biocatalisadores proteicos muito eficientes com alta especificidade pelo substrato. Elas apresentam uma estrutura proteica globular terciária ou quaternária, sendo termolábeis. Um mol de enzima purificada pode catalisar a transformação de até 1.000.000 de moles de substrato por minuto (MADIGAN et al., 2010).

Os micro-organismos são um grupo muito variado, sendo foco de intensa pesquisa e muitas descobertas. Lugares onde há acúmulo de matéria vegetal deteriorando são muito propícios para encontrar micro-organismos bioquimicamente capazes de assimilar componentes da biomassa como fontes de carbono. A produção de enzimas hidrolíticas pelos micro-organismos pode ter muitas utilidades, como aumentar o número de opções para uma fonte primária de carbono ou então para infectar e colonizar células de plantas (PRADE, 1995).

A maioria das enzimas utilizadas nas indústrias é de origem microbiana, pois os micro-organismos são facilmente cultivados em laboratório, onde as condições de crescimento são controladas e as enzimas são extraídas de modo mais fácil em comparação com as de tecidos animais e vegetais (SIMÕES, 2006). O interesse na

produção microbiana é aumentado porque os micro-organismos podem utilizar material residuário, que causa problemas de poluição e riscos sanitários. Segundo Simões (2006) e Dhanasekaran et al. (2011), com aumento da poluição ambiental como consequência direta do desenvolvimento tecnológico, o uso de novas tecnologias que minimizem os danos ao meio ambiente são necessárias, como as enzimas hemicelulósicas, dentre elas as xilanases. Os micro-organismos produzem naturalmente diversas enzimas. Porém, para que haja a utilização industrial das mesmas, a sua produção precisa ser otimizada, tendo um destaque o uso de resíduos agroindustriais, que diminuem os custos de produção.

Os fungos apresentam vantagem frente aos outros micro-organismos por secretarem suas enzimas diretamente no meio em que estão se desenvolvendo, não havendo a necessidade de ruptura celular para a sua liberação (POLIZELI et al., 2005; GOSWAMI e PATHAK, 2013). Estas enzimas irão fazer a digestão de compostos orgânicos a seus constituintes monoméricos, que serão utilizados como fontes de energia e para a produção de biomassa. Existem tanto enzimas específicas para um único substrato como aquelas que podem atacar muitos substratos relacionados (KRISANA et al., 2005; ROSGAARD et al., 2006; BOENISCH, 2009; MADIGAN et al., 2010).

Muitas espécies de fungos presentes no meio ambiente ainda não estudadas podem apresentar grande potencial biotecnológico para a produção enzimática, como, por exemplo, os fungos endofíticos. As enzimas produzidas por esses micro-organismos auxiliam na degradação da parede celular vegetal, de modo a permitir a colonização das plantas (FIRÁKOVÁ, STURDÍKOVÁ, MÚCKOVÁ, 2007). Dentre as principais enzimas produzidas por estes micro-organismos podem ser citadas as ligninases e as celulases (SCHULZ et al., 2002). Adicionalmente, recentes análises genômicas apontam alguns fungos fitopatogênicos como uma fonte ainda inexplorada de enzimas hidrolíticas para a conversão de biomassa (KING et al., 2009).

Os fatores responsáveis pelo aumento da atividade enzimática são muito importantes do ponto de vista industrial (WIDJAJA et al., 2009). Por esta razão, estudos têm sido conduzidos no intuito de obter maiores níveis de atividade enzimática em sua forma bruta por linhagens fúngicas. Outro fator que deve ser considerado são os custos de produção enzimáticos. De acordo com Buthelezi, Olaniran e Pillay (2011) e Santos e Ishii (2011), o principal fator limitante para a utilização de enzimas em escala industrial

é seu custo, tornando necessário o desenvolvimento de sistemas de produção de baixo custo a fim de tornar estes processos economicamente viáveis.

### 3.6. Fatores que Afetam a Produção de Enzimas por Micro-organismos

#### 3.6.1. Fermentação em Estado Sólido e Fermentação Submersa

Existem dois importantes métodos para a produção de enzimas microbianas: a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm). Ambos os processos apresentam suas vantagens e desvantagens (KAVITHA e UMESH-KUMAR, 2000; MARTIN et al., 2004)

A FES é definida como o cultivo de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato). Nesse tipo de processo, o conteúdo de líquido deve assegurar o crescimento e metabolismo das células, sem exceder a capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI, CAPALBO, MORAES, 2001; SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012). A FES reproduz de forma melhor o ambiente natural onde crescem os fungos (JECU, 2000). Ela apresenta a vantagem de ser um processo mais simples, de pouco consumo de energia e de difícil contaminação devido ao baixo nível de umidade no sistema. Também podem ser utilizados substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Segundo Hölker e Lenz (2005), o crescimento microbiano e a formação do produto geralmente ocorrem na superfície de partículas de substrato sólido com baixo teor de umidade. Por esta razão a fermentação em estado sólido parece ser vantajosa para a produção de enzimas microbianas. As vantagens sobre o processo de fermentação submersa incluem maior rendimento de produtos, geração de menor volume de efluentes, maior estabilidade dos produtos obtidos, menores taxas de repressão catabólica das enzimas produzidas e requerimento de equipamentos mais simples (PANDEY, SOCCOL, MITCHELL, 2000; VINIEGRA-GONZÁLES et al. 2003; AYYACHAMY e VATSALA, 2007).

As desvantagens da FES incluem o fato de que ela é restrita a micro-organismos capazes de crescer em níveis reduzidos de umidade. Além disso, a variedade de produtos obtidos é mais restrita e a remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano pode ser um problema. A natureza sólida do substrato também causa

problemas no monitoramento dos parâmetros do processo. A transferência de massa na fase sólida é limitada à difusão, e o tempo de cultivo é relativamente mais longo devido à taxa de crescimento específico dos micro-organismos ser mais baixa (PALMA, 2003).

A FSm é utilizada comumente para a produção enzimática, pois há maior controle de parâmetros como pH, temperatura e crescimento celular, além da recuperação de enzimas extracelulares e a determinação da biomassa serem facilitadas (FERNANDES, 2006). A FSm tem como característica principal a utilização de um meio de cultura líquido, com nutrientes solúveis. Entretanto, uma de suas limitações é a diluição dos produtos extracelulares, sendo necessária uma etapa de concentração mais trabalhosa na purificação (ALONSO, 2001; MARTINS, 2001; SUBRAMANIAM e VIMALA, 2012).

Linhagens fúngicas são preferencialmente cultivadas em FES, enquanto que as linhagens bacterianas se desenvolvem melhor em FSm (WIDJAJA et al., 2009). No entanto, do ponto de vista industrial, a FSm é a mais utilizada, principalmente pela maior facilidade de monitoramento e pelo desenvolvimento de novos equipamentos para esse fim (BEG et al., 2001; KIRK, BORCHERT, FUGLSANG, 2002). De acordo com Subramaniyam e Vimala (2012), mais de 75% das enzimas industriais são produzidas por meio da FSm. Uma das principais razões reside no fato de que este tipo de fermentação suporta melhor o emprego de micro-organismos geneticamente modificados quando comparada à FES.

### 3.6.2. pH

Entre os fatores de natureza físico-química, o pH pode influenciar tanto o número, como a atividade enzimática dos micro-organismos (SUDHARHSAN, SENTHIKULMAR, RANJITH, 2007). Os micro-organismos geralmente mostram um pH ótimo de crescimento bem definido, o qual pode variar de 2 a 3 unidades, sendo que existem outras faixas de pH que não são ótimas, mas que o crescimento é possível (MADIGAN et al., 2010). Os fungos filamentosos, mais tolerantes às condições ácidas, se desenvolvem melhor em valores de pH entre 6.0 e 8.0, onde geralmente também são observados os maiores níveis de atividade enzimática (GUPTA et al., 2003). Porém, nem sempre existe uma correlação entre o pH ótimo para o crescimento e para a produção de uma determinada enzima. Segundo Prior, Preez e Rein (1992), o intervalo

de pH ideal para o crescimento microbiano e aquele para a formação do produto podem diferir consideravelmente.

Normalmente, a produção de xilanases por diversos fungos filamentosos obedece a um padrão dependente do pH. A produção ótima de xilanases por *Penicillium verruculosum* foi verificada quando este micro-organismo foi cultivado na faixa de pH de 4.5 - 5.0. O mesmo ocorreu com *Cochliobolus sativus*, quando este foi cultivado em pH 4.5 (ARABI, JAWHAR, BAKRI, 2011) e com *Penicillium chrysogenum*, quando cultivado em pH 5.6 (OKAFOR et al., 2007b).

Diferentemente, Padmavathi e Kavya (2011) definiram o pH 8.0 como ótimo para a produção de xilanases por *Aspergillus niger*, semelhante ao valor de pH 8.5 encontrado por Bhosale et al. (2011) para a produção de xilanases por *Streptomyces rameus*.

### 3.6.3. Temperatura

Por ser o crescimento microbiano um processo exotérmico, o calor gerado deve ser dissipado, uma vez que temperaturas elevadas não são favoráveis aos micro-organismos. Nos fungos filamentosos, a temperatura exerce influência em seu crescimento, na germinação de esporos e na formação de produtos (ROCHA, 2010). Segundo Rahman et al. (2005), ao provocar alterações nas propriedades físicas da membrana celular, a temperatura afeta, também, a síntese de enzimas extracelulares.

Kavya e Padmavathi (2009) verificaram que o fungo *A. niger* produziu uma quantidade mais elevada de xilanases quando cultivado a 28 °C. Similarmente, Solov'eva et al. (2005) também estabeleceram a temperatura de cultivo de 28 °C como ótima para a produção destas enzimas por *P. verruculosum*. Maiores níveis de xilanases foram obtidas quando *P. chrysogenum* e *Aspergillus ochraceus* foram cultivados a 30 °C (OKAFOR et al., 2007b; MICHELIN et al., 2009).

A produção de xilanases por fungos termofílicos também tem sido relatada. Recentemente, a temperatura de 45 °C foi estabelecida como ótima para a produção de xilanases por *Thermomyces lanuginosus* e *Thermoascus aurantiacus*. (GAFFNEY, DOYLE, MURPHY, 2009; MONTE, CARVALHO, MILAGRES, 2010).

### 3.6.4. Substrato



Os nutrientes presentes no meio determinam o crescimento dos organismos, que produzem metabólitos à medida que crescem (ALTAF, UMAR, MUHAMMAD, 2010).

Segundo Joo e Chang (2005), a produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos empregados. Estima-se que cerca de 30 a 40% dos custos de produção de uma enzima estejam relacionados ao meio de cultura utilizado. Desta forma, o emprego de substratos de baixo valor é de grande importância para a viabilização destes processos.

No Brasil, especialmente por suas características climáticas, existe uma abundância de substratos lignocelulósicos (CASTRO e PEREIRA JR, 2010), os quais podem ser potencialmente empregados para a obtenção de enzimas microbianas (MINAFRA, 2007). Sabe-se que a lignina e seus derivados podem se mostrar tóxicos aos micro-organismos e suas enzimas. Dessa forma, substratos com uma concentração menor de lignina proporcionam a produção de maiores níveis de enzimas (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

Em relação à produção de enzimas em substratos lignocelulósicos, a umidade também exerce influência. Quando em níveis elevados, ela pode reduzir a porosidade da biomassa e aumentar as chances de contaminação bacteriana. Em níveis baixos, pode comprometer o crescimento devido à baixa difusão de nutrientes e gases (NUNES et al., 2012).

Para a produção de xilanases por fungos, vários resíduos agroindustriais têm sido relatados, como farelo e palha de trigo para o cultivo de *Trichoderma longibrachiatum* (AZIN, MORAVEJ, ZAREH, 2007); bagaço de cana para *T. viride* (IRFAN e SYED, 2012); torta de girassol para *Trichoderma harzianum* (SAKTHISELVAN, NAVEENA, PARTHA, 2012); palha de madeira e casca de arroz para *Flamulina velutipes* e *Pleurotus eryngii* (ALTAF, UMAR, MUHAMMAD, 2010); bagaço de cevada, bagaço de cana, casca de amendoim, resíduo fibroso da mandioca, germe de trigo, bagaço de milho verde e casca de laranja para *Aspergillus casielus* (KRONBAUER et al., 2007); sabugo de milho para *Aspergillus fumigatus* (PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008); bagaço de cerveja para *Penicillium glabrum* (KNOB et al., 2013), entre outros.

### 3.6.5. Espécie Fúngica

Fungos da mesma espécie, porém linhagens distintas, diferem quanto aos níveis de produção enzimática. Esse fato foi verificado por Stroparo et al. (2012) com linhagens de *P. glabrum* e *A. niger*. Da mesma forma, os estudos conduzidos por Saparrat et al. (2000) observaram diferentes níveis de produção de enzimas lignolíticas por linhagens distintas de *Fusarium solani*. Além da produtividade enzimática, as diferentes linhagens também podem diferir quanto às características físico-químicas das enzimas produzidas.

### 3.7. Aplicações das Enzimas

Enzimas têm desempenhado papéis centrais desde os tempos mais antigos, quando eram usadas para produção de vinhos, queijos e pães. O conhecimento sobre o uso de micro-organismos, seus produtos metabólicos, suas enzimas e aplicações industriais aumentou significativamente na última metade do século XX, sendo foco de pesquisas intensas, não só por biólogos, mas também por engenheiros químicos e de processos, entre outros pesquisadores (BEG et al., 2001).

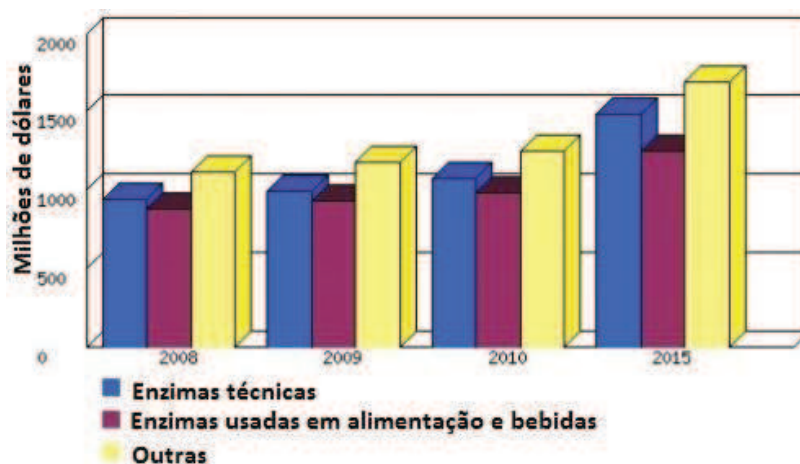
O uso dos fungos na biotecnologia remonta há muito tempo. Como exemplo tem-se o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na panificação e vinicultura e do fungo *A. niger* para produzir ácido cítrico para alimentos e bebidas. Também há espécies de *Trichoderma* que são usadas na produção de celulases para a indústria de sucos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

E, apesar de todo esse avanço, o uso comercial nas indústrias de polpa e papel, rações animais, indústria têxtil e de alimentos só ocorreu após a década de 1980 (BHAT, 2000; BEG et al., 2001). Celulases do fungo *Trichoderma* foram usadas na década de 80 no processo de fabricação de um brim mais macio, denominado “stone-washed”, o qual tinha um pouco da celulose do seu algodão digerida. Hoje em dia, suas celulases também são utilizadas comercialmente para a produção de sucos, uma vez que as mesmas realizam a remoção da parede celular de plantas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

As enzimas possuem algumas vantagens que diminuem os custos operacionais de indústrias, como especificidade de reação, alta eficiência de conversão, pouca formação de metabólitos secundários, operação em condições brandas de temperatura e

pH, são biodegradáveis e não produzem resíduos tóxicos (SIMÕES, 2006; ZIMMER et al., 2009).

A produção de enzimas é um campo crescente da biotecnologia com faturamento anual de bilhões de dólares (GONZALES et al., 2003), conforme demonstrado na Figura 5.



**FIGURA 5** – Projeção do faturamento do mercado global de enzimas industriais (em milhões de dólares) de 2008-2015. Fonte: Adaptado de BBC Research (2013).

Segundo dados do grupo de consultoria Business Communication Company, Inc., a previsão é que em 2014 o mercado de enzimas movimentará valores na ordem de US\$ 4 bilhões (SÁ-PEREIRA et al., 2008). Entretanto, dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2013) preveem que até o final do ano a movimentação será de US\$ 7 bilhões, sendo 60% deste mercado na América Latina representado pelo Brasil. Segundo Zimmer et al. (2009), estima-se que este mercado cresça 7,6% ao ano, sendo responsáveis por este crescimento tanto a queda no preço, quanto o maior acesso às enzimas de aplicação industrial.

A mistura de enzimas aumenta a eficiência do processo de sacarificação. Por exemplo, para a completa degradação da celulose à glicose, diversas enzimas devem atuar em sinergismo, tais como endoglucanases,  $\beta$ -glicosidases e exoglucanases (TRIBEWAL, KUMARI, CHOUHAN, 2011). Da mesma forma, para a completa conversão de xilano em xilose, xilanases,  $\beta$ -xilosidases,  $\alpha$ -arabinofuranosidases e outras enzimas xilanolíticas atuam de forma sinérgica sobre este substrato (KNOB, TERRASAN, CARMONA, 2010).

Em formulações alimentares, a cooperação das xilanases, glucanases, amilases e proteases reduz a viscosidade dos alimentos e aumenta a absorção de nutrientes. Estas enzimas liberam nutrientes tanto pela hidrólise de fibras não-degradáveis, como pela liberação de nutrientes presos nessas fibras (LEISOLA et al., 2004). Um maior conhecimento sobre a interação entre a biomassa pré-tratada, as enzimas e seu sinergismo para a produção de açúcares fermentáveis pode ser benéfico para gerar substratos mais digeríveis e modificar coquetéis enzimáticos hidrolíticos de modo a obter procedimentos mais eficazes (QING e WYMAN, 2011).

Enzimas que quebram fibras, proteínas, amido e fitato estão sendo muito utilizadas nas rações animais. Elas melhoram a digestão e a absorção de nutrientes, impedindo o crescimento de bactérias causadoras de doenças. Também reduzem custos, diminuindo o volume de dejetos produzidos e a excreção de nitrogênio e fósforo, além de diminuírem a variação nutricional em ingredientes alimentares (LAURENTIZ et al., 2007; LIMA et al., 2007; RAVINDRAN e SON, 2011).

Na indústria de sucos, elas servem para a clarificação, sacarificação, melhorias na cor e no aroma, maior rendimento, prevenção de formação de géis, além de tornarem menores os gastos com energia durante o processo de produção (BON, GÍRIO, PEREIRA, 2008; RIBEIRO et al., 2010).

As amilases são utilizadas na produção de xarope, de glicose, em detergentes e na produção de cerveja. As proteases atuam no glúten dos produtos de panificação e servem como amaciantes de carnes. A glicose isomerase é utilizada na fabricação de doces e converte a glicose em frutose. As pectinases clarificam os sucos de frutas, enquanto que as celulases são utilizadas em sucos de frutas, produção de café e de papel (LI et al., 2012).

Enzimas produzidas por bactérias geneticamente modificadas são usadas nos sabões em pó para promover a degradação de gorduras presentes nas roupas e resistir às condições do processo de lavagem (CIB, 2013).

Nos últimos anos, uma tendência é o uso de extremozimas, que são produzidas por organismos extremófilos. Elas são termoestáveis, e podem ser usadas em processos industriais que ocorrem a altíssimas temperaturas, sendo que outras resistem ao congelamento. Há aquelas usadas em rações animais, que atuam muito bem em pH baixo, como o do estômago, ajudando a digerir o alimento e fazendo com que o animal ganhe peso (GOMES et al., 2007; MADIGAN et al., 2010).

Além da falta de conhecimento sobre as características enzimáticas, o alto custo de produção das enzimas é uma barreira para a sua comercialização. No entanto, segundo Merino e Cherry (2007), a pesquisa nessa área tem sido incentivada pelo fato delas serem muito úteis na conversão dos resíduos lignocelulósicos em combustíveis e químicos. Pode-se dizer que o custo é em função da grande quantidade de enzimas requeridas para transformar açúcares poliméricos constituintes da celulose e da hemicelulose em monômeros fermentáveis.

Segundo Jovanovic et al. (2009), para que as enzimas sejam viáveis comercialmente elas devem ser bastante ativas, com elevada atividade específica, apresentando custo-benefício competitivo com o etanol produzido a partir da cana de açúcar ou do amido de milho enzimaticamente sacarificados.

De acordo com Ali, Muthuvelayudham e Viruthagiri (2012), o custo da utilização de enzimas em processos biocatalíticos pode ser diminuído pela descoberta das condições ótimas para sua produção. Desta forma, esforços têm sido realizados nos últimos anos, no intuito de reduzir o custo da produção enzimática em escala industrial, focando na otimização da produção de enzimas conhecidas, identificação de novas enzimas mais ativas e na elaboração de misturas mais eficientes em degradar substratos específicos (MERINO e CHERRY, 2007).

### 3.8. Enzimas Desramificadoras da Xilana

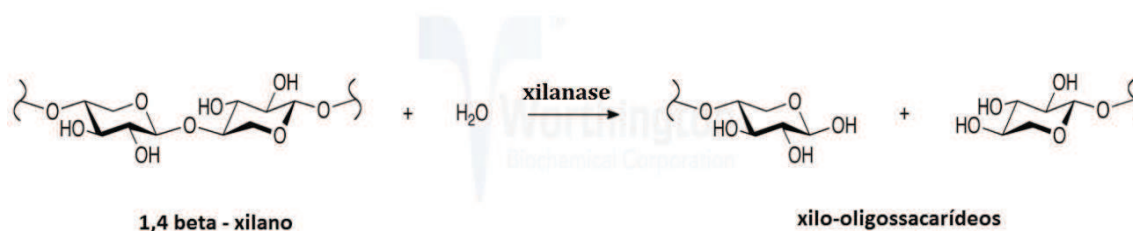
A hidrólise completa da xilana a monossacarídeos é feita pela ação sinérgica de diferentes enzimas. Esse sistema de degradação inclui principalmente  $\beta$ -1,4-D-xilanases (E.C. 3.2.18) e  $\beta$ -D-xilosidases (E.C 3.2.1.37), além de outras enzimas auxiliares. As xilanases são responsáveis por hidrolisar a cadeia principal. As  $\beta$ -xilosidases fazem a hidrólise dos xilo-oligossacarídeos, como a xilobiose, à xilose. Adicionalmente, as enzimas auxiliares, também conhecidas como enzimas desramificadoras da xilana, eliminam os resíduos substituintes específicos (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005; POLIZELI et al., 2005; KNOB, 2009; TERRASAN, 2011). Dentre estas, podem ser citadas as  $\alpha$ -arabinofuranosidases, acetilxilano esterases,  $\alpha$ -D-glucuronidases, ácido ferúlico esterases e ácido p-cumárico esterases (FERREIRA-FILHO, 1994; COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005; SHAO et al., 2011).

### 3.9. Xilanases

#### 3.9.1. Definição e Modo de Ação

Na natureza, a xilana é completamente hidrolisada a monossacarídeos pela ação conjunta de diferentes enzimas. A heterogeneidade da xilana conduz a uma diversidade de enzimas degradadoras desse polímero (DWIVEDI et al., 2009). Dentre estas, a  $\beta$ -1,4-endo-xilanase (EC 3.2.1.8) é a enzima mais importante (BIELY, 1985).

As xilanases clivam aleatoriamente a cadeia principal  $\beta$ -1,4 da xilana presente na complexa parede celular das plantas (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005; SANTOS e ISHII, 2011), liberando xilo-oligossacarídeos de vários tamanhos, conforme a Figura 6, o que resulta em um decréscimo do grau de polimerização deste substrato (PAI et al., 2013). O mecanismo de clivagem não é ao acaso, sendo o ataque ao substrato dependente da presença de grupos substituintes, de seu comprimento e grau de polimerização. Algumas xilanases preferencialmente clivam a cadeia principal da xilana em regiões sem substituições, o que promove a formação de oligossacarídeos não substituídos e ramificados ou esterificados. No entanto, outras xilanases são dependentes da presença de grupos substituintes para exercerem sua ação (BIELY, 2003).



**FIGURA 6** - Atuação da xilanase formando xilo-oligossacarídeos como produto. Fonte: Adaptado de Worthington Biochem (2013).

As xilanases estão sujeitas a repressão catabólica e são induzíveis pelos produtos de sua própria atuação (PRADE, 1995; ARO, PAKULA, PENTTILÄ, 2005). Compostos como xilana, xilo-oligossacarídeos (xilotrioses, xilobiose e xilose), lactose, L-sorbose e sofrorose são indutores da produção de xilanases (ZEILINGER et al., 1996, XU et al., 1998). Altas concentrações dos seus produtos de hidrólise frequentemente

inibem as xilanases (WOOD e McCRAE, 1986). Acredita-se que altas concentrações de xilobiose inibem as endoxilanases, enquanto que o mesmo não ocorre com as mesmas concentrações de xilose (POLIZELI et al., 2005).

Nos últimos anos, diversas formas dessas enzimas foram descritas, exibindo diferentes conformações tridimensionais, mecanismos de ação, especificidades por substrato e características físico-químicas (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005).

### 3.9.2. Classificação

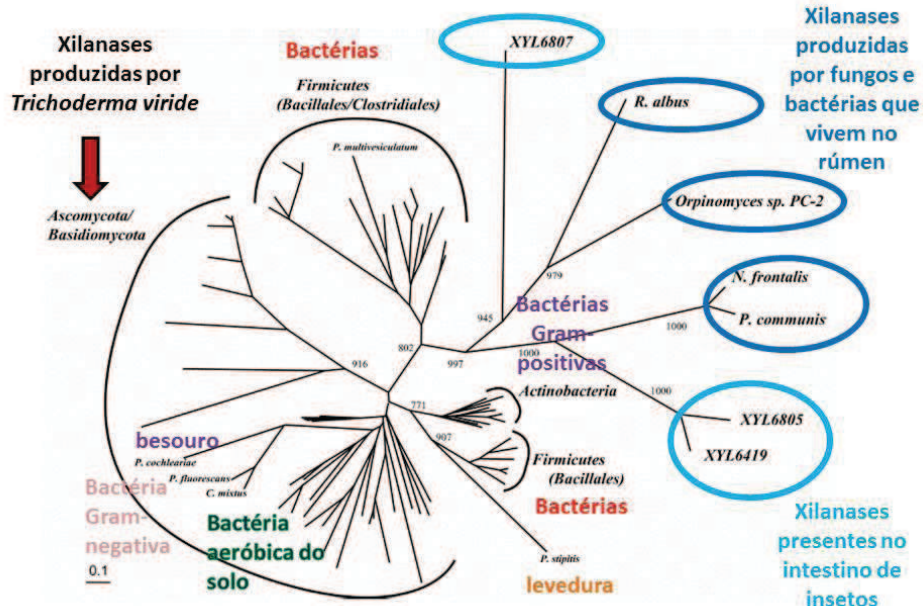
As endoxilanases são classificadas em específicas ou não-específicas, baseadas em sua ação em diferentes polissacarídeos. As específicas atuam apenas em xilanas com ligações  $\beta$ -1,4, enquanto que as não-específicas hidrolisam xilanas, xilanas mistas e outros polímeros como a carboximetilcelulose unidos por meio de ligações  $\beta$ -1,4 (COUGHLAN et al., 1993).

Porém, a classificação dessas enzimas baseando-se apenas em suas especificidades por substratos é limitada, devido à heterogeneidade e complexidade da xilana (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005). Atualmente, as xilanases são agrupadas em famílias de acordo com a similaridade em suas sequências de aminoácidos. Uma vez que essa classificação baseia-se na estrutura primária dessas enzimas, membros de uma mesma família apresentam similaridade em sua estrutura e características mecanísticas, porém diferem em suas características físico-químicas, modo de ação e especificidade por substratos (KNOB, TERRASAN, CARMONA, 2010). De acordo com o Carbohydrate Active Enzymes Database (CAZy), as xilanases são divididas nas famílias 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62 das glicosil hidrolases, sendo prevalentes nas famílias 10 e 11 (CANTAREL et al., 2009). As endoxilanases ácidas e de alta massa molecular pertencem principalmente à família 10 das glicosil hidrolases, enquanto que a família 11 comporta as xilanases básicas e de baixa massa molecular (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005).

### 3.9.3. Fontes



As xilanases são produzidas por vários organismos, como bactérias, leveduras, fungos filamentosos, entre outros (NAKAMURA, 2003; MONISHA, UMA, MURTHY, 2009), como indicado na Figura 7.



**FIGURA 7** - Filograma das xilanases produzidas por diferentes grupos de organismos. Fonte: Adaptado de Brennan et al. (2004).

A maioria das bactérias, fungos e leveduras produzem extracelularmente essas enzimas (SILVEIRA et al., 1999). As bactérias e fungos usam os produtos da hidrólise da xilana como fonte primária de carbono (PRADE, 1995).

Muitas xilanases extremofílicas foram isoladas, em particular as termofílicas, alcalinofílicas e acidofílicas, enquanto que pouca atenção tem sido dada às xilanases adaptadas ao frio, devido aos interesses industriais (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005).

Embora as xilanases de arqueobactérias e eubactérias tenham temperaturas ótimas e estabilidade superior a dos fungos, em geral, o nível de xilanases na cultura fúngica é tipicamente superior àqueles obtidos a partir de leveduras ou bactérias (SINGH, PILLAY, PRIOR, 2003; FANG et al., 2008). Sua produção é feita principalmente por processos de fermentação microbiana (BUTHELEZI, OLANIRAN, PILLAY, 2011). Espécies de fungos produtores de xilanases incluem as do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, entre



outros. Entretanto, apenas os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* têm sido empregados para a obtenção de xilanases em escala industrial (LU et al., 2008; AHMED, RIAZ, JAMIL, 2009).

#### 3.9.4. Principais Características das Xilanases

As características bioquímicas de algumas xilanases fúngicas estão apresentadas na Tabela 1, e das xilanases bacterianas na Tabela 2. A grande maioria das xilanases fúngicas apresentam uma faixa de pH ótimo de atuação em torno de 4.5 até 6.0, como as de *Penicillium corylophilum* (MEDEIROS, HANADA, FERREIRA FILHO, 2003). Mas há exceções. As xilanases de *Penicillium sclerotiorum* (KNOB, 2009) tem um pH ótimo de atuação de 2.5, enquanto que as de *Talaromyces thermophiles* (MAALEJ et al., 2009) de 7.5. A temperatura ótima de atuação oscila entre 50 e 70 °C. Porém, as xilanases de *Marasmius* sp. BCC7928 (RATANACHOMSRI et al., 2006) apresentam temperatura ótima de 90 °C, e as de *Aspergillus terreus* UL 4209 (CHIDI et al., 2008) de 35 °C. A estabilidade em pH se mantém em torno de 3.5 até 7.5. Incomumente, as xilanases de *P. sclerotiorum* (KNOB, 2009) se mantem estáveis do pH 1.6 até 7.5 e as de *Sporotrichum thermophile* (TOPAKAS et al., 2003) na faixa de pH de 6.0 a 11.0. A termoestabilidade das xilanases fúngicas se encontra entre 40 e 60 °C, na maioria dos casos. Entretanto, as xilanases de uma linhagem de *A. niger* CCMI 850 (COSTA-FERREIRA et al., 1994) são estáveis a 40 °C, enquanto que as de *Fomitopsis pinicola* (SHIN et al., 2010) se mantém estáveis de 40 a 80 °C.

Em relação às xilanases bacterianas, tanto pH ótimo de atuação como a estabilidade em pH oscilam entre 6.0 e 9.0. Uma linhagem de *Bacillus* sp. (BUTHELEZI, OLANIRAN, PILLAY, 2011) produz xilanases que se mantém estáveis do pH 6.0 até o 12.0. A temperatura ótima está entre 50 e 60 °C, mas as enzimas de *Arthobacter* sp. MTCC 5214 e *Enterobacter* sp. MTCC 5112 (KHANDEPARKAR e BHOSLE, 2006) atuam melhor a 100 °C. A termoestabilidade da maioria das xilanases bacterianas está entre 40 e 80 °C. Entretanto, as de *Bacillus* sp. (BUTHELEZI, OLANIRAN, PILLAY, 2011) se mantém estáveis até 90 °C.

**Tabela 1** – Principais propriedades de xilanases produzidas por fungos filamentosos.

ESPÉCIE	FONTE DE CARBONO	MASSA MOLECULAR (KDA)	ATIVIDADE ÓTIMA		ESTABILIDADE		REFERÊNCIA
			pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura	
<i>Aspergillus awamori</i>	Bagaço de cana	-	-	60	5.0	30 – 50	Lemos et al., 2000
<i>A. awamori</i>	Farelo de trigo	32.87	5.0 – 5.5	50	5.0 – 7.0	50	Teixeira et al., 2010
<i>A. casielus</i>	Bagaço de cevada	-	6.5	50	-	45	Kronbauer et al., 2007
<i>A. fumigatus</i> RP04	Sabugo de milho em pó	-	5.0 – 5.5	70	6.0 – 8.0	-	Peixoto-Nogueira et al., 2008
<i>A. niger</i> BCC14405	Farelo de trigo com xilano	21	5.0	55	5.0 – 10.0	-	Krisana et al., 2005
<i>A. niger</i> CCMI 850	Xilano	-	4.0 – 6.0	55	-	40	Costa-Ferreira et al., 1994
<i>A. niger</i> LPM 93	Bagaço de cana	33	4.5	50	4.5	45	Milanezi, 2010
<i>A. niger</i>	Xilano	-	4.0 –	40	5.5	45 – 60	Medeiros, Hanada e Ferreira

<i>Aspergillus niveus</i>	Farelo de trigo	-	4.5 – 5.0	60 – 65	4.5 – 6.0	-	Filho, 2003 Peixoto-Nogueira et al., 2008
<i>A. terreus</i> UL 4209	Xilano	22	6.0	35	4.0 – 6.0	35 – 40	Chidi et al., 2008
<i>Bispora</i> sp.	-	49.8	3.0	60	1.0 – 6.0	60	Luo et al., 2010
<i>Chaetomium</i> sp.	Espiga de milho	25.1	7.5	65	-	-	Jiang et al., 2010
<i>Chaetomium thermophilum</i>	Xilano	-	6.0	70	-	-	Ahmed, Imdad e Jamil, 2012
<i>F. pinicola</i>	Xilano	58	4.5	70	-	40 – 80	Shin et al., 2010
<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>ciceris</i>	Xilano	21.6	5.5	55	-	-	Jorge et al., 2005
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Pinus	69.3	3.0	80	-	60	Lee et al., 2009
<i>Marasmius</i> sp. BCC7928	Xilano	40	6.0	90	3.0 – 9.0	50 – 70	Ratanachomsri et al., 2006
<i>Penicillium capsulatum</i>	Farelo de trigo	-	4.0	47 – 48	-	-	Filho, Puls e Coughlan, 1993

<i>P. corylophilum</i>	Xilano	-	4.5 – 6.0	45	5.5	45 – 50	Medeiros, Hanada e Ferreira Filho, 2003
<i>P. glabrum</i>	Bagaço de cerveja	18.36	3.0	60	2.5 – 5.0	50	Knob et al., 2013
<i>P. sclerotiorum</i>	Farelo de trigo	-	4.5	50	3.5 – 7.5	40	Knob, 2009
<i>P. sclerotiorum</i>	Xilano	23.9	2.5	50	1.6 – 7.5	40 – 45	Knob, 2009
<i>P. sclerotiorum</i>	Xilano	33.1	4.5	55	3.5 – 7.5	45 – 50	Knob, 2009
<i>S. thermophile</i>	Farelo de trigo	24; 48	5.0	60	-	50	Vafiadi, Christakopoulos e Topakas, 2010
<i>S. thermophile</i>	Palha de milho	90; 120	5.0	70	6.0 – 11.0	40 – 60	Topakas et al., 2003
<i>T. thermophiles</i>	-	25	7.5	75	-	50	Maalej et al., 2009
<i>T. lanuginosus</i> THKU-56	Sabugo de milho	-	7.0	70	6.0 – 9.0	50 – 80	Khonzue et al., 2011b
<i>T. harzianum</i> 1073 D3	Xilano	-	5.0	60	3.0 – 7.0	30 – 60	Isil e Nilufer, 2005
<i>T. harzianum</i>	Xilano	-	5.0	60	-	-	Ahmed, Imdad e Jamil, 2012

<i>T. longibrachiatum</i>	Xilano	-	4.0 – 4.5	45	5.5	45 – 50	Medeiros, Hanada e Ferreira Filho, 2003
<i>T. viride</i> IR-05	Bagaço de cana	-	5.0	50	4.0 – 7.0	30 - 60	Irfan e Syed, 2012

---

**Tabela 2** – Principais propriedades de xilanases produzidas por bactérias.

ESPÉCIE	FONTE DE CARBONO	MASSA MOLECULAR (KDA)	ATIVIDADE ÓTIMA		ESTABILIDADE		REFERÊNCIA
			pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura	
<i>Arthobacter</i> sp. MTCC 5214	Farelo de trigo	20	9.0	100	7.0 – 11.0	50 – 80	Khandeparkar e Bhosle, 2006
<i>Bacillus arseniciselenatis</i> DSM 15340	Farelo de trigo	29.8	8.0	50	6.0 – 11.0	30 – 40	Kamble e Jadhav, 2011
<i>Bacillus pumilus</i>	Xilano	19	7.0	35	-	-	Monisha, Uma e Murthy, 2009
<i>Bacillus</i> sp. BP-7	Xilose	24	6.0	60	4.5 – 8.5	50	Gallardo, Diaz e Pastor, 2004
<i>Bacillus</i> sp.	Espiga de milho	22; 23; 40	6.5	70	4.5 – 10.0	40 – 50	Avcioglu, Eypoglu e Bakir, 2005
<i>Bacillus</i> sp.	Serragem	-	6.0	50	6.0 – 12.0	40 – 90	Buthelezi, Olaniran e Pillay, 2011
<i>Enterobacter</i> sp. MTCC 5112	Xilano	43	9.0	100	7.0 – 9.0	50 – 80	Khandeparkar e Bhosle, 2006

<i>Escherichia coli</i> BL21	-	22	6.0	50 – 60	4.0 – 9.0	30 – 65	Weng e Sun, 2005
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Bagaço de cana	-	8.0	45	-	-	Padmavathi et al., 2011
<i>Streptomyces</i> sp. SU 9	Palha de trigo	-	9.0	80	6.0 – 9.0	60	Bajaj, Razdan e Sharma, 2010

---

### 3.9.5. Aplicações Biotecnológicas

As xilanases têm amplas aplicações econômicas, industriais e biotecnológicas (BUTHELEZI, OLANIRAN, PILLAY, 2011; SANTOS e ISHII, 2011). Um exemplo é a bioconversão de resíduos lignocelulósicos em seus açúcares constituintes. Essas enzimas vêm ganhando importância devido ao seu papel na produção de xilose (LAXMI et al., 2008; MICHELIN et al., 2009).

Um dos problemas no campo do branqueamento de papel é a remoção da lignina e dos seus derivados, que estão ligados à celulose e à xilana (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002). Em relação ao branqueamento de polpas de celulose, as xilanases são as enzimas mais estudadas. Elas reduzem a utilização dos produtos organoclorados altamente poluentes, pois substituem o cloro e o dióxido de cloro que são químicos tóxicos usados na indústria de papel, favorecendo, dessa forma, a obtenção de processos ambientalmente corretos (BEG et al., 2000; KHONZUE et al., 2011a; AHMED, IMDAD, JAMIL, 2012). As xilanases microbianas utilizadas para esse fim devem ser termoestáveis e ativas em pH alcalino. Muitos fungos obtidos de ambientes marinhos apresentam enzimas com essas características. Elas também possuem uma ampla faixa de atividade em diferentes valores de pH (RAGHUKUMAR et al., 2004; MONISHA, UMA, MURTHY, 2009).

Os xilo-oligossacarídeos produzidos pela hidrólise enzimática da xilana são reconhecidos como prebióticos. Eles melhoram o crescimento intestinal probiótico, evitam a infecção gastrointestinal e obstipação intestinal, diminuem o valor do pH fecal, aumentam a absorção de nutrientes e promovem a saúde intestinal (PAI et al., 2013).

A aplicação de enzimas na ração animal tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, devido ao custo cada vez maior das matérias-primas tradicionais e a busca por outros ingredientes alternativos (AHUJA, FERREIRA, MOREIRA, 2004). Enzimas xilanolíticas podem aumentar a energia metabolizável e diminuir a viscosidade das rações, acarretando em ganho de peso desses animais (TWOMEY et al., 2003; POLIZELI et al., 2005; LI et al., 2012). Adicionalmente, a utilização de enzimas na ração animal pode melhorar a eficiência da produção de carne e leite, bem como diminuir o impacto ambiental das explorações pecuária e agroindustrial, em virtude do aproveitamento de resíduos agroindustriais de baixo custo para produção de proteína animal (RAVINDRAN e SON, 2011).



Outras aplicações industriais incluem o uso na clarificação de sucos, melhoria na consistência de cerveja, aumento da digestibilidade de ração para animais, e no cozimento de centeio para tornar as massas mais macias, para liquefazer as frutas e legumes juntamente com pectinases e celulasas, e para melhorar a qualidade da farinha de trigo em conjunto com outras glicosilhidrolases (ROMANOWSKA, POLAK, BIELECKI, 2006; KHANDEPARKER e NUMAN, 2008; GUPTA e KAR, 2009; ALBERT et al., 2011; PAI et al., 2013; GOSWAMI e PATHAK, 2013).

### 3.10. O Gênero *Trichoderma* e a Espécie *Trichoderma viride*.

Os fungos pertencem ao domínio Eukarya e ao Reino Fungi. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, das quais foram descritas em torno de 100.000. Apenas 200 das 100 mil espécies conhecidas de fungos são patogênicas, sendo que as demais são benéficas por realizarem a decomposição da matéria orgânica, fazerem simbiose com plantas (micorrizas), serem utilizadas para a produção de alimentos e antibióticos, entre outros. A grande maioria dos fungos é terrestre, mas eles também podem ser encontrados na água. Alguns são parasitas de plantas, outros patógenos de animais. Eles também são muito importantes na produção de enzimas, por meio da fermentação e da síntese de antibióticos, além de fazerem a decomposição de madeira, realizando a ciclagem dos nutrientes no ambiente. Em sua maioria, os fungos são multicelulares e aeróbios, com exigências nutricionais simples. Eles estão relacionados de forma mais próxima com os animais, formando um grupo filogeneticamente distinto de outros organismos (MADIGAN et al., 2010; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

*Trichoderma* é um gênero pertencente ao reino Fungi que se encontra presente no solo como saprófita e também em plantas como endofítico (XIA et al., 2011). Esse fungo desempenha um papel importante no controle das doenças das plantas, já que tem a capacidade para antagonizar o crescimento de fungos fitopatogênicos. Desta forma, pode estimular o crescimento e as respostas de defesa das plantas. Suas espécies exibem uma notável variedade de estilos de vida, sendo ubíquos no ambiente, apresentando tolerância a estresses bióticos e abióticos (ALBERT et al., 2011; DRUZHININA et al., 2011; SHARMA et al., 2011; SILVA, 2011). Recentemente, foi descrita uma nova

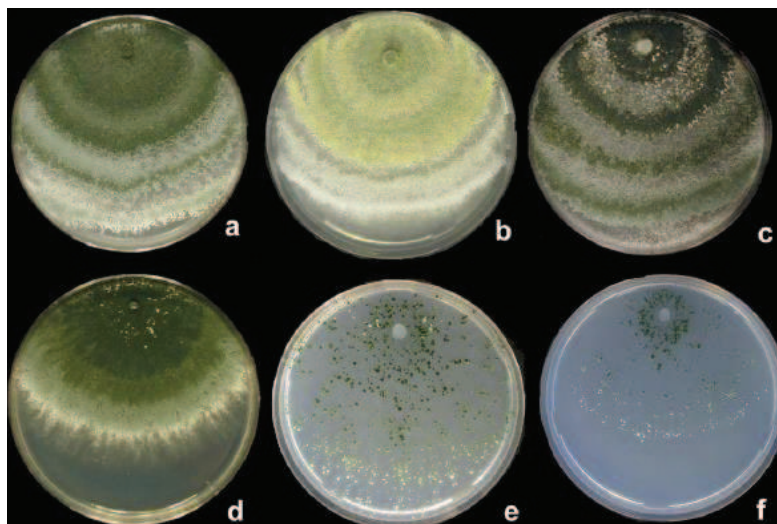
espécie de *Trichoderma* endofítico de raízes de plantas saudáveis de café (*Coffea arabica*). Ela tem capacidade de antagonizar contra espécies de *Fusarium*, *Alternaria alternata*, *Botryotinia fuckeliana* e *Sclerotinia sclerotiorum* (MULAW et al., 2013). Robl et al. (2013) também mencionam duas espécies de *Trichoderma* endofítico como excelentes produtores de enzimas hidrolíticas: *Trichoderma atroviride* DR17 e DR19. Os autores destacam que apesar das espécies pertencerem ao mesmo gênero, elas apresentam diferentes perfis enzimáticos.

As espécies de *Trichoderma* são comercialmente vendidas como biopesticidas, biofertilizantes e inoculantes de solo (HARMAN et al., 2004). Eles podem competir por exsudados de sementes que estimulam a germinação de propágulos de fungos patogênicos de plantas no solo (HOWELL, 2002). De acordo com Mishra e Singh (2005), elas também são causa de doenças em cogumelos botão na Índia.

Jaklitsch e colaboradores (2006) apontam *T. viride* como tendo uma ampla distribuição geográfica, sendo que a sua maior diversidade genética parece ser na Europa e América do Norte. Ela é uma das espécies mais comumente relatadas de fungos. Em apenas dois anos (2004 e 2005), *T. viride* foi mencionado em cerca de 200 artigos que foram abstraídos pelo periódico CAB Internacional.

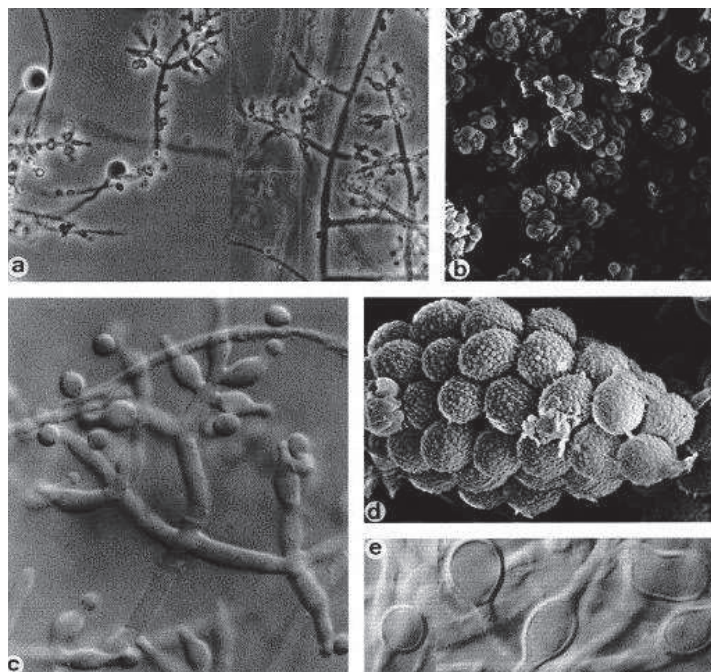
A espécie *T. viride* Pers., foi descrita pela primeira vez em 1794 por Persoon na revista “Neues Magazin für die Botanik, 1:92”, e também no “Dispositio Methodica Fungorum 1:81-128”. Ela é sinônima da espécie *Hypocrea rufa* (Pers.), que recebe esse nome na fase teleomórfica (sexuada), sendo que na fase anamórfica (assexuada) a espécie recebe a denominação *T. viride* (MYCOBANK, 2013).

A forma *Hypocrea* raramente é vista em meios de cultura. Por outro lado, sua forma anamórfica é encontrada em investigações ecológicas ou cultivada com finalidades comerciais. As formas de *Trichoderma* são habitualmente isoladas de solos, mas também esporulam em madeira úmida, cogumelos ou fungos de suporte em florestas, onde eles são facilmente reconhecidos por suas massas de conídios que são geralmente verdes, podendo ser brancos ou amarelos, conforme Figura 8 (EVANS, HOLMES, THOMAS, 2003).



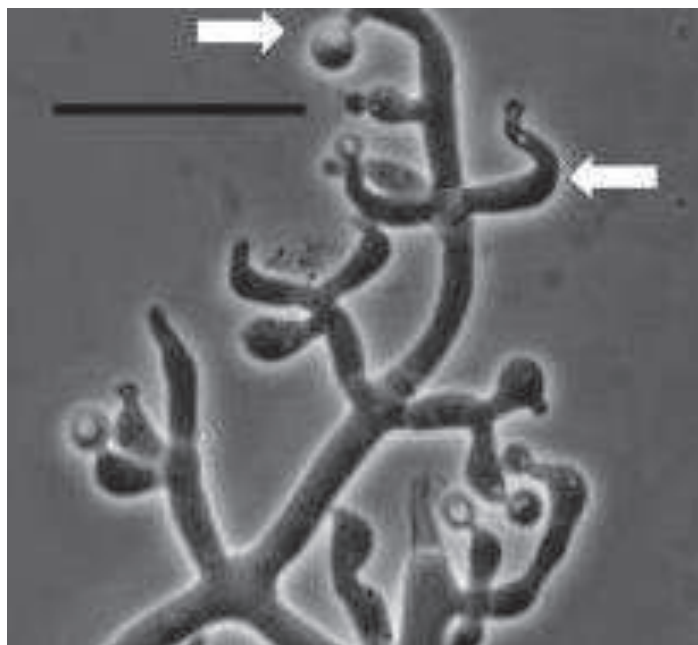
**FIGURA 8** - Culturas de *H. rufa* / *T. viride* depois de uma semana a 25 °C. (a) CBS 101526. (b) W.J.2450. (c) G.J.S.05-104. (d) Tr2. E-f. W.J.2450. Todos cultivados em ágar-batata-dextrose (BDA), exceto (e) milho-ágar-dextrose (MAD) e (f) ágar nutriente sintético (ANS). Fonte: Jaklitsch et al. (2006).

Morfologicamente, seus conídios são hialinos e ovoides, estando aderidos a um conidióforo longo, conforme mostrado na Figura 9. Seus clamidiósporos são estruturas vitais para a sobrevivência do gênero no solo sob condições adversas (ARENAS, 2013).



**FIGURA 9** – *T. viride*, IFO 30498. a-d. Conidióforos e conídio. e. clamidiósporos. a. 512x. b. 1000x. c. 1600x. d. 4400x. e. 1600x. Fonte: Hoog et al. (2000).

Ao analisar a estrutura do conidióforo de *T. viride*, verifica-se que seu eixo principal é curto e, por vezes, sinuoso. Em relação às fiálides, a ramificação é altamente irregular, com fiálides comumente em forma de gancho (Figura 10), de forma cilíndrica ou ligeiramente inchada (JAKLITSCH et al., 2006).



**FIGURA 10** - Conidióforo de *T. viride*, com ênfase nas fiálides, visto por meio de microscopia de contraste de fase. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . Fonte: Jaklitsch et al. (2006).

*Trichoderma* spp. são conhecidas por produzirem enzimas com alta atividade xilanolítica, sendo que algumas das xilanases têm sido extensivamente caracterizadas no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas, hidrolíticas, e moleculares (WONG e SADDLER, 1992). Elas são úteis industrialmente na produção de xilanases pelo fato de não serem patogênicas ao homem, capazes de produzir níveis elevados de enzimas extracelulares e serem cultivadas facilmente (KAR et al., 2006).

O gênero também produz enzimas micolíticas como  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,4-endo-glucanases, quitinases e proteases. Estas enzimas desempenham um papel importante na degradação de diversos polissacarídeos que constituem estruturalmente os agentes patogênicos alvos (HARMAN et al., 1991). As espécies de *Trichoderma* também são conhecidas por produzirem uma vasta gama de substâncias antibióticas e compostos que antagonizam outros fungos (TAYLOR e FRANCIS, 1998).

De acordo com Simões, Tauk-Tornisielo e Tapia (2009), *T. viride* é um excelente produtor de xilanases. Outros estudos relatam a produção de outras enzimas

hidrolíticas por *T. viride*, como amilases (MAHMOOD e RAHMAN, 2008) e celulasas (MAHESWARI E AISWARYA, 2012; ZHAO et al., 2013),

Linhagens mutantes de *T. viride* também foram estudadas quanto à produção enzimática, como no trabalho de Jiang et al. (2011), em que o mutante EU2-77 produziu endoglucanases, exoglucanases, carboximetilcelulasas,  $\beta$ -glicosidases, xilanases e  $\beta$ -xilosidases. Wang et al. (2009) relataram a produção de  $\beta$ -glicosidases pela linhagem mutante T 100-14, enquanto que Suryawanshi et al. (2013) relataram a produção de quitinases.

#### **4. Materiais e Métodos**

Os materiais e métodos específicos utilizados estão descritos no capítulo correspondente ao artigo científico a ser submetido no periódico *Folia Microbiologica*, Qualis B1 em Biodiversidade, descrito na seção a seguir.

## **5. Resultados e Discussão**

Os resultados e discussão estão descritos no capítulo correspondente ao artigo científico a ser submetido no periódico *Folia Microbiologica*, Qualis B1 em Biodiversidade, descrito na seção a seguir.

## Capítulo I

**HIGH XYLANASE PRODUCTION BY *Trichoderma viride* USING  
PINEAPPLE PEEL AS SUBSTRATE**

Manuscrito a ser submetido para a revista Folia Microbiologica, a qual apresenta Qualis CAPES B1 em Biodiversidade.



**HIGH XYLANASE PRODUCTION BY *Trichoderma viride* USING  
PINEAPPLE PEEL AS SUBSTRATE**

**Fortkamp, D.<sup>1</sup> and Knob, A.<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology Sciences, Midwest State University. Camargo Varela de Sá Street, 03, zip code 85040-080, Guarapuava, PR, Brazil.

\*Corresponding author: Adriana Knob

Department of Biological Sciences, Midwest State University. Camargo Varela de Sá Street, 03, Zip code 85.040 080. Guarapuava, PR, Brazil.

Phone: 55-42-36298133. Fax: 55-42-36211090

E-mail: knob@unicentro.br

**Abstract**

The xylanases are hydrolases which depolymerize xylan components present in the plant cell walls. Applications include use in the pulp and paper industries, food, animal feed, textiles, among others. This work aimed to optimize the extracellular xylanase production by a *Trichoderma viride* strain. Additionally, the produced xylanases were biochemically characterized. Pineapple peel was the agro-industrial waste that induced higher xylanase production at 2% concentration, for seven days, in stationary cultivation at 28 °C, in pH 7.5. Xylanases were more active at 50 °C, pH 6.0, remaining stable at pH 5.0-5.5 (93.8% and 85.25% of residual activity, respectively). *T. viride* xylanase was stable at 40 °C, showing the half-life ( $T_{1/2}$ ) value of 255 min. The enzyme was remarkably stimulated by  $Mg^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ , while  $Pb^{3+}$  and  $Hg^{2+}$  were strong inhibitors of the xylanase activity. This work shows the ability of the filamentous fungus *T. viride* to grow on the agro-industrial waste pineapple peel and produce high levels of xylanases. The produced enzymes were considered promising for industrial application, mainly in process that cellulases are undesirable, such as pulp, paper and textile industries.

Keywords: agro-industrial wastes, biotechnology, submerged fermentation, filamentous fungi, xylanolytic enzymes.

## Introduction

Xylan, after cellulose, is the most abundant polysaccharide present in wood, agricultural and several agro-industrial wastes. This complex heteropolysaccharide consists of a main chain of 1,4- $\beta$ -D-xylose monomers which is partially acetylated and substituted in different degrees by a variety of side chains, mainly single  $\alpha$ -D-glucuronosyl and  $\alpha$ -L-arabinosyl units (Collins et al. 2005; Wakiyama et al. 2008). Due to its structural complexity, several hydrolases are required for its complete degradation. The main enzymes involved in xylan degradation are the endo- $\beta$ -(1,4)-xylanases. These enzymes cleave the internal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) bonds in the xylan backbone at non-modified residues to produce xylooligosaccharides, which in turn can be converted to xylose by  $\beta$ -xylosidases (Zhang et al. 2007; Sharma and Kumar 2013).

Actually, xylanases have been extensively studied due to their industrial applications (Buthelezi et al. 2011). An example is the bioconversion of lignocellulosic residues in their constituent sugars. They are gaining importance due to its role in the production of xylose, which can be converted in bioethanol and xylitol (Laxmi et al. 2008; Michelin et al. 2009). Other industrial applications include the improvement of digestibility of animal feedstock, clarification of wines and juices and baking of rye to make the masses softer (Romanowska et al. 2006; Khandeparker and Numan 2008; Gupta and Kar 2009; Albert et al. 2011; Pai et al. 2013). In recent years, the use of xylanases as bleaching agents of wood kraft pulps has been considered the main industrial application of xylanolytic enzymes. Many studies have demonstrated that the pulp treatment with xylanases promotes the release of lignin from the pulp, thereby reducing the chlorine required in this process (Khandeparker and Numan 2008; Gupta and Kar 2009, Albert et al. 2011).

The agro-industrial residues are composed of lignocellulosic material and are generated in large quantities in agribusiness, food, wood, pulp and paper industries, among others. These wastes contain many substrates usable high value, such as carbohydrates and fibers. Also, have great value for the biotechnological production of microbial enzymes. However, if these residues do not have a correct destination, they become a source of environmental pollution, mainly due to its burning or decomposition in the open (Laufenberg et al. 2003; Ali and Zulkali 2011). It's estimated that the world biomass production per year is 1.5 trillion tons (Santos et al. 2012). In relation to the global enzymes market, it's expected to reach 8.0 billion in 2015 (Li et al. 2012). However, the major limiting factor for its using is the cost of production, requiring the development of systems of low-cost production to commercialize the

enzymes (Buthelezi et al. 2011). According to Widjaja et al. (2009) and Ali et al. (2012) the cost of using enzymes in biocatalytic processes can be decreased by the discovery of optimal conditions for its production, covering the use of agro-industrial wastes as substrates.

Pineapple residue is one of the agro-industrial wastes which represents a serious environmental pollution (Rani and Nand 2004). The peel is rich in cellulose, hemicellulose and other carbohydrates with a substrate potential generation of methane by anaerobic digestion. A high volume of this agro-industrial waste is produced in Brazil due to be the second largest pineapple producer, with a worldwide production of 2.318.120 tons (FAOSTAT 2013). Thus, a large amount of pineapple peel waste is generated over the years. However, the pineapple peel waste has received little attention and its use is limited mainly in animal feed (Tran 2006; Paengkoum et al. 2013).

*Trichoderma viride* is an excellent biocontrol agent (John et al. 2010; Reena et al. 2013), cellulolytic microorganism (Mojsov 2010; Iqbal et al. 2011) and xylanase producer (Gupta et al. 1994; Goal et al. 2008; Simões et al. 2009). The aims of this study were to produce xylanases from a *T. viride* strain on agro-industrial wastes, in the most suitable way, and biochemically characterize the produced enzymes with the best substrate.

## **Material and methods**

### Fungal strain and culture conditions

*T. viride* was isolated from the Atlantic forest soil on Ecologic Station Juréia-Itatins (24° 18' A 24° 37' LAT S), located in São Paulo State, Brazil. The strain belongs to the Culture Collection of the Environmental Studies Center - CES/UNESP, Brazil. The fungus was propagated on Vogel's solid medium (Vogel 1956) containing 1.5% (m/v) glucose and 1.5% (m/v) agar, at 28 °C, during 7 days for spore production. After, the strain was maintained at 4 °C. Submerged fermentation was prepared in 125 mL flasks containing 25 mL of the Vogel's medium, pH 6.5, supplemented with 1% carbon source and inoculated with 1.0 mL spore suspension ( $7 \times 10^7$  spores/mL) to each flask. The cultures were incubated at different conditions for the xylanase production optimization. After incubation, cultures were filtered by vacuum through Whatman filter paper number 1. The brute filtrate was assayed for extracellular activity and protein. The mycelium was frozen and macerated with sand in McIlvaine buffer pH 6.5. The

slurry was centrifuged at  $3.900 \times g$  and the supernatant was used as an intracellular protein source. All cultures were carried out in duplicate to verify the reproducibility and the results were presented through mean values.

#### Enzyme and protein assay

For xylanase assay, 20  $\mu\text{L}$  of the crude filtrate, 480  $\mu\text{L}$  of the McIlvaine buffer pH 6.5 and 750  $\mu\text{L}$  of 1% birchwood xylan solution prepared in the same buffer was incubated for 5 min at 50 °C. After pre-determined periods, the reaction was stopped by the addition of 250  $\mu\text{L}$  of 3, 5-dinitrosalicylic acid. The reducing sugars liberated were measured according to Miller (1959), using xylose as standard. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu\text{mol}$  of product equivalent per min in the assay conditions. Specific activities were expressed as enzyme units per milligram of extracellular protein.

Protein concentrations were determined by modified Bradford method (Sedmak and Grossberg 1977) with reference to a standard calibration curve for bovine serum albumin. All experiments were developed in triplicate and the results were presented as mean values.

#### Culture conditions for xylanase production

##### *Agro-industrial wastes*

The agricultural residues wheat bran, apple peel, brewer's spent grain, passion bagasse, orange peel, rice peel, soybean peel and pineapple peel were obtained locally. The residues were prepared by exhaustive washing with distilled water, dried at 80 °C for 24-48h and milled (35 mesh).

##### *Enzyme production on different carbon sources*

In order to verify xylanase induction, the Vogel's liquid medium was supplemented with various dried substrates as sole carbon source at a concentration of 1% (w/v). The inoculated flasks were

incubated at 28 °C under stationary condition, for five days. Xylanase activity was determined as described previously. After the selection of the best agro-waste for xylanase production, some concentrations of this carbon source were evaluated from 0.5% to 3.0% (w/v).

#### *Effect of incubation period, initial pH and temperature on xylanase production*

The incubation period influence on xylanase production was evaluated in stationary culture for 9 days. The effect of initial pH on the enzyme production was evaluated from 3.0 to 9.0 and the cultivation temperature influence was verified from 20 °C to 30 °C. The initial pH values were adjusted by the addition of 1.0 M sodium hydroxide or hydrochloric acid solutions.

#### Enzyme characterization

##### *Optimum pH and temperature xylanase activity*

The optimum temperature was determined by measuring the activity at temperatures of 25 °C to 75 °C in intervals of 5 °C, in McIlvaine buffer pH 6.5. In order to establish the optimum pH of the enzyme, the relative activity was determined at different pH values, using McIlvaine buffer pH 3.0-8.0, at intervals of 0.5 units, in the optimum temperature.

##### *Xylanase thermostability and pH stability*

The thermal stability was measured by incubating the crude filtrate for different periods, at temperatures of 40, 45 and 50 °C. Following incubation, the enzyme solution was frozen and the remaining activity was determined. For pH stability assays, the culture filtrate was diluted (1:2 v/v) in McIlvaine buffer pH 3.0-8.0 and incubated at 4 °C. After 24 hours, the residual xylanase activity was assayed.

##### *Effect of ions and other substances on xylanase activity*

The enzymatic activity was measured in the presence of different ions (BaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, sodium citrate, NaCl, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub> and

substances (glycerol, SDS, EDTA and  $\beta$ -mercaptoethanol) at 2 and 10 mM concentrations. The relative activities were measured in relation to the control by performing the enzyme assay at the optimal conditions.

## Results and discussion

### Influence of the carbon source and its concentration on the xylanase production

The use of agro-industrial wastes as carbon source in the growth medium is an alternative to reduce the costs and increase the enzyme production. Xylanase production by *T. viride* using different agro-industrial wastes is shown in Table 1.

The carbon source that induced the highest enzymatic activity and fungal growth was pineapple peel, corresponding to 35.12 U/mL and 20.38 mg protein, respectively. *T. viride* was also able to produce high levels of xylanase in the presence of wheat bran and brewer's spent grain, corresponding to 29.39 U/mL and 28.64 U/mL. At the present date, only cellulase production using pineapple peel as substrate was described in the literature (Folakemi et al. 2008; Saravanan et al. 2013). Meenakshi et al. (2008) found maize straw as the best inducer for xylanase production by other *T. viride* strain, reaching 6.24 U/mL, whereas sugarcane bagasse and wheat bran were established as the best substrates for xylanase production by distinct *Trichoderma reesei* strains (Irfan and Syed 2012; Kar et al. 2013). Recently, Knob et al. (2013) also reported high xylanase production by a *Penicillium glabrum* strain using brewer's spent grain as substrate, with values of 34.32 U/mL.

Rice peel provided minimal fungal growth, with intermediate levels of xylanase produced (9.95 U/mL). No significant levels of xylanase were observed with orange peel when compared to the other lignocellulosic materials, although *T. viride* has shown a good development in this substrate. The differences verified on xylanases levels produced with various agro industrial wastes are possibly related on distinct composition and the accessibility of the substrates. Considering the high xylanase production obtained with pineapple peel, a low-value raw material, this waste was selected for the subsequent optimization experiments.

The most efficient concentration of pineapple peel to induce *T. viride* xylanase production and fungal growth was 2%, with 48.05 U/mL and 35.35 mg protein, respectively (Table 2). Conversely, Singh

et al (1995) found 3% wheat bran as the best concentration for *Fusarium oxysporum* xylanase production, reaching a production of 38 U/mL.

#### Effects of culture conditions on xylanase production

Cultivation conditions are essential for the successful production of an enzyme. For this reason, optimization of these parameters is important for a process improvement. In stationary culture, with pineapple peel as carbon source, the highest extracellular xylanase production as units per volume and specific activity were obtained in 7-day-old cultures, corresponding to 54.15 U/mL and 37.33 U/mg protein, respectively (Fig. 1a).

The maximal fungal growth measured by the intracellular protein concentration was also observed in the 7<sup>th</sup> day, corresponding to 56.85 mg of protein (not shown). Likewise, Kar et al. (2006) verified that xylanase production by *T. reesei* SAF3 exhibited a similar increase following the biomass peak. In opposition, Quiroz-Castaneda et al. (2011) verified no correlation between *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* growth and xylanase production. Meenakshi et al. (2008) observed that the xylanase production by *T. viride* with 1% maize straw increases up to 17 days of cultivation, reaching a production of 2.45 U/mL.

Temperature and pH are directly related to growth behavior and development of the fungal mycelium, as well as in the xylanase production. The influence of pH on *T. viride* xylanase production is showed in Fig. 1b. Xylanase production was verified in all initial pH evaluated. The highest activity in units per volume was observed in pH from 7.0 to 7.5 (72.15 and 73.09 U/mL, respectively). Similarly, the maximal fungal development was verified in the same pH range, corresponding to 59.46 mg protein and 58.03 mg protein (not shown). These results are an exception to the xylanase production, since the production of these enzymes by filamentous fungi usually occurs in cultures with an initial pH under 7.0. The xylanase production at neutral and alkaline pH values has been reported previously in *Thermomyces lanuginosus* (7.5), *Aspergillus niveus* RS2 (pH 8.0) and *Aspergillus flavus* in pH 9.0 (Purkharthofer et al. 1993; Sudan and Bajaj, 2007; Ruckmanl and Rajendran 2001). On the other hand, the optimum pH for the growth of two *Trichoderma* strains and xylanase production was found to be 5.5 for T-1 and 5.7 for T-2 (Mohan et al. 2011).

The effect of temperature on xylanase production by *T. viride* is presented on Table 3. The maximum value of xylanase production and highest specific activity were verified at 28 °C,



corresponding to 73.09 U/mL and 50.78 U/mg protein. It is remarkable that the optimum temperature for the fungal growth and xylanase production correspond to the environmental temperature which the fungus was initially isolated. Meenakshi *et al.* (2008) achieved the maximum xylanase production by *T. viride* at 25 °C, whereas *Trichoderma* spp. showed enhanced xylanase production at 30 °C (Pang *et al.* 2006).

The crude filtrate obtained in optimized conditions was evaluated for the presence of cellulolytic enzymes. The crude filtrate from *T. viride* produced with pineapple peel was cellulase-free as it exhibited negligible cellulase activity. According to Goswami and Pathak (2013) fungal xylanases generally are associated with cellulases. The results obtained in this work indicate the possible application of *T. viride* crude filtrate in industrial process which cellulase activity is undesirable, such as pulp, paper and textile industries.

#### Biochemical properties of *T. viride* xylanase

Xylanase from *T. viride* showed maximal activity at 50 °C (Fig. 2a). According to Knob *et al.* (2013) the optimum temperature for xylanase hydrolysis varies due to the producing microorganism. The temperature of 50 °C has been reported as optimal for xylanases from other fungal species, including *Trichoderma* spp. (Teixeira *et al.* 2010; Irfan and Syed 2012; Lopes *et al.* 2013). Conversely, the optimal temperature for *Trichoderma harzianum* xylanases was 60 °C (Isil and Nilufer 2006; Ahmed *et al.* 2012).

*T. viride* xylanase exhibited optimal activity at pH 6.0-6.5 (Fig. 2b). Most xylanases present optimal activity in pH between 5.0 and 7.0 (Madlala *et al.* 2001) and among the acidophilic xylanases, the majority of them showed high activity only under slight acid conditions, as verified in this study. Irfan and Syed (2012) determined pH 5.0 as optimal for xylanases produced by *T. viride*. The same was observed for *T. harzianum* xylanases (Ahmed *et al.* 2012).

The enzyme stability remains a critical aspect for its biotechnological applications. For this reason, thermal and pH stability of xylanase produced by *T. viride* were investigated. The enzymatic preparation was incubated without substrate at 40 °C, 45 °C and 50 °C. *T. viride* xylanase was stable at 40 °C, showing the half-life ( $T_{1/2}$ ) value of 255 min (Fig. 3a). This enzyme is more thermostable than many fungal xylanases, such as those from *Chainia* sp. (Bandivadekar and Deshpande 1994) and the xylanases produced by *Penicillium sclerotiorum* (Knob and Carmona 2008), which exhibits a  $T_{1/2}$  of 72 min in the same temperature.

The xylanase produced by *T. viride* maintained its stability in acid conditions (Fig. 3b). High stability (93.88% and 85.25%) were observed at pH 5.0 and 5.5, while low residual activity (less than 50%) was observed at pH 3.0, 7.5 and 8.0. In the range of pH 6.5 - 7.0, around 50% of its initial activity was maintained. Usually, microbial xylanases are stable over a wide pH range (3-10) (Kulkarni et al. 1999). Irfan and Syed (2012) verified that xylanases produced by another *T. viride* strain showed pH stability in the range 4.0-7.0, whereas the *P. glabrum* xylanases showed stability in pH values of 2.5 to 5.0 (Knob et al. 2013).

In order to verify the effect of substances on xylanase activity, the crude filtrate was incubated in the presence of several metallic ions and chemical reagents, at 2 mM and 10 mM concentrations (Table 4). *T. viride* xylanase was remarkably stimulated when incubated with  $Mg^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ . The ion  $Mg^{2+}$  also activated the xylanase from other *T. viride* strain, (Irfan and Syed 2012), whereas *Sporisorium reilianum* xylanase was activated by  $Zn^{2+}$  (Álvares-Cervantes et al. 2013). Slight activation observed in the presence of  $Ba^{2+}$  and  $NH_4^+$  may be explained by the enzymatic structure stabilization by these ions. The requirement of monovalent cations for activities of a number of different enzymes has been reported in the literature. The malic enzyme from *Clostridium thermocellum* and the  $\beta$ -xylosidase from *P. sclerotiorum* were similarly activated by  $NH_4^+$  (Lamed and Zeikus 1981, Knob and Carmona 2009).

Additionally, *T. viride* xylanase showed enhanced activity in the presence of reducing agent  $\beta$ -mercaptoethanol. This fact can be explained by preventing the oxidation of sulfidryl groups by this thiol group-protecting agent. Cardoso and Ferreira-Filho (2003) and Knob et al. (2013) also verified the involvement of cysteine residues in the maintenance of enzyme active conformation in *Penicillium citrinum*, *Acrophialophora nainiana* and *P. glabrum* xylanases, respectively.  $Cu^{2+}$  and  $Hg^{2+}$  were strong inhibitors of xylanase activity, while  $Ca^{2+}$ , sodium citrate,  $Na^+$ , glycerol and  $Pb^{3+}$  had a moderate inhibitory effect. The inhibition by  $Hg^{2+}$  seems to be a general property of xylanases, indicating the presence of thiol groups of cysteine residues in enzyme active sites or around them. Additionally, the enzyme was inhibited by SDS, indicating that hydrophobic interactions are important for tertiary structure maintenance. Conversely, the xylanases from *Talaromyces thermophilus* retained almost all their activity in the presence of SDS at 10 mM concentration (Maalej et al. 2009).

The chelating agent EDTA also inhibited xylanase activity (remaining 66.10% of its initial activity at 10 mM concentration), suggesting that this enzyme requires metal ions for your action. Likewise, the xylanases from another *T. viride* strain also were inhibited by EDTA, exhibiting 26% of

initial xylanase activity at 10 mM concentration (Irfan and Syed 2012).

## Conclusions

This study is the first report about the xylanase production using pineapple peel as substrate by a *T. viride* strain. This new xylanase showed optimal activity at 50 °C and pH 6.0-6.5. Additionally, it was able to act and exhibited stability in moderate temperatures and acid pH values. The use of pineapple peel waste as carbon source can decrease the costs for the enzyme production and avoids environmental problems regarding the inappropriate disposition of this residue. Therefore, the crude filtrate rich in xylanases may be considered for applications in industrial process in which cellulolytic activity is undesirable, such as pulp, paper and textile industries.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES - Brazil) for the scholarship awarded to the first author.

## References

- Ahmed S, Imdad SS, Jamil A (2012) Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. *Electron J Biotechnol*. 15(3):1-8
- Albert S, Chauhan D, Pandya B, Padhiar A (2011) Screening of *Trichoderma* Spp. as potential fungal partner in co-culturing with white rot fungi for efficient bio-pulping. *Global J Biotechnol & Biochem* 6(3):95-101
- Ali HKHQ, Zulkali MMD (2011) Utilization of agro-residual ligno-cellulosic substances by using solid state fermentation: A Review. *Croatian J Food Technol Biotechnol Nutr* 6(1):5-12

Ali SBR, Muthuvelayudham R, Viruthagiri T (2012) Statistical optimization of nutrients for production cellulase & hemicellulase from rice straw. *Asian J Biochem Pharm Res* 2(2):154-174

Álvarez-Cervantes J, Hernández-Domínguez MH, Arana-Cuenca A, Díaz-Godínez G, Mercado-Flores Y (2013) Purification and characterization of xylanase SRXL1 from *Sporisorium reilianum* grown in submerged and solid-state fermentation. *Bioresour* 8(4):5309-5318

Bandivadekar RK, Deshpande VV (1994) Enhanced Stability of Cellulase-Free Xylanase from *Chainia* sp. (NCL 82.5.1). *Biotechnol Lett* 16(2):179-182

Buthelezi SP, Olaniran AO, Pillay B (2011) Sawdust and digestive bran as cheap alternate substrates for xylanase production. *Afr J Microbiol Res* 5(7):742-752

Cardoso OAVC, Ferreira-Filho EX (2003) Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *FEMS Microbiol Lett* 223(2):309-314

Collins T, Gerday C, Feller G (2005) Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 29(1):3-23

FAOSTAT (2013). Food and Agriculture Organization. Agriculture statistics. Pineapple production (2010) by country. <http://faostat.fao.org>. Accessed 15 jul 2013

Folakemi OP, Pricilla JO, Ibiyemi SA (2008) Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. *Nat Sci* 6(2):64-79

Goswami GK, Pathak RR (2013) Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. *Int J Basic & Clin Pharmacol* 2(3):237-246

Gupta MN, Gougiang D, Kaul R, Mattiasson B (1994) Purification of xylanase from *Trichoderma viride* by precipitation with an anionic polymer Eudragit S 100. *Biotechnol Techniq* 8(2):117-122

Gupta U, Kar R (2009) Xylanase production by a thermo-tolerant *Bacillus* species under solid-state and submerged fermentation. *Braz Arch Biol Technol* 52(6):1363-1371

Irfan M, Syed Q (2012) Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. *Int J Appl Res Nat Prod* 5(1):7-11

Isil S, Nilufer A (2005) Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. *Food Technol. Biotechnol* 43(1):37-40

John RP, Tyagi RD, Prévost D, Brar SK, Puleur S, Surampalli RY (2010) Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Furarium oxysporum* F. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Prot* 29(12):1452-1459

Kar S, Mandal A, Mohapatra KP, Mondal CK, Pati RB (2006) Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Braz J Microbiol* 37(4):462-464

Kar S, Sona GS, Das A, Jana A, Maity C, Mandal A, Das MPK, Pati BR, Mondal KC (2013) Process Optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma Reesei* SAF3 and Study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. *Bioproc Biosyst Engin* 36(1):57-68

Khandeparker R, Numan MT (2008) Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. *J Industrial Microbiol Biotechnol* 35(7):635-644

Knob A, Carmona EC (2008) Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. *World Appl Sci J* 4(2):277-283

Knob A, Beitel SM, Fortkamp D, Terrasan CR, Almeida AF (2013) Production, Purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. *BioMed Res Int*. doi: 10.1155Q2013Q728735

Kulkarni N, Shendye A, Rao M (1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 23(4):411-456

Lamed R, Zeikus JG (1981) Thermostable, ammonium-activated malic enzyme of *Clostridium thermocellum*. *Biochim Biophys Acta* 13(2):251-255

Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (a) the upgrading concept; (b) practical implementations, *Bioresour Technol* 87(2):167–198

Laxmi GS, Sathish T, Rao CHS, Brahmaiah P, Hymavathi M, Prakasham RS (2008) Palm fiber as novel substrate for enhanced xylanase production by isolated *Aspergillus sp.* RSP-6. *Curr Trends Biotechnol Pharm* 2(3):447-455

Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X (2012) Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computat Struct Biotechnol J* 2(3):1-11

Lopes AM, Valeri D, Pessoa-Júnior AP (2013) Comparison of kinetic characteristics of xylanases from *Aspergillus niger* and *Trichoderma sp.* with pH and temperature baking process parameters. *Afr J Biotechnol* 12(19):2640-2645

Madlala AM, Bissoon S, Singh S, Christov L (2001) Xylanase induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. *Biotechnol Lett* 23:345-351

Maalej I, Belhaj I, Masmoudi NF, Belghith H (2009) Highly Thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 158(1):200-212

Meenakshi G, Kalra KL, Sareen VK, Soni G (2008) Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. *Braz J Microbiol* 39(3):535-541

Michelin M, Polizeli MLTM, Silva DP, Ruzene DS, Vicente AA, Jorge JÁ (2009) Xylanase and  $\beta$ -xylosidase production: alternatives for the autohydrolysis liquor application. *Book of Abstracts of MicroBiotec09*. <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/10336/1/396.pdf>

Miller GL (1959) Use Dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426-429.

Mohan G, Guhankumarand P, Balakrishnan V (2011) Isolation of xylan degrading enzyme from *Trichoderma spp.* *Res Plant Biol* 1(3):15-20

- Mojsov K (2010) Application of solid-state fermentation for cellulose enzyme production using *Trichoderma viride*. *Perspect Innov, Econom & Business* 2(5):108-110
- Paengkoum S, Wanapat M, Paengkoum P (2013) Effects of pineapple peel and rice straw ratios as basal roughage in dairy cow. *World Acad Sci, Engin Technol* 73:95-96
- Pai CK, Chen JRW, Zeng YF, Tung LC, Liu JR (2013) Cloning of the bifunctional xylanolytic enzyme gene from the ruminal fungus *Neocallmastix patriciarum* S20. Department of Life Science, National Taiwan Normal University. <http://www.ntnu.edu.tw/acad/rep/r98/d980001-1.pdf>
- Pang PK, Darah I, Poppe L, Szakacs G, Ibrahim CO (2006) Xylanase production by a local isolate, *Trichoderma* spp. FETL c3-2 via solid state fermentation using agricultural wastes as substrates. *Malaysian J Microbiol* 2(1):7-14
- Purkarthofer H, Sinner M, Steiner W (1993) Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid state culture. *Enz Microbiol Technol* 15(8):677-682
- Quiroz-Castaneda RE, Pérez-Mejía N, Martínez-Anaya C, Acosta-Urdapilleta L, Folch-Mallol J (2011) Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the Basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegrad* 22(3):565–572
- Rani DS, Nand K (2004) Ensilage of pineapple processing waste for methane generation. *Waste Manag* 24(5):5523-5528
- Reena A, Anitha M, Aysha OS, Valli S, Nirmala P, Vinothkumar P (2013) Antagonistic activity of *Trichoderma viride* isolate on soil borne plant pathogenic fungi. *Int J Bioassays* 2(1):294-297
- Romanowska I, Polak J, Bielecki S (2006) Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(6):665-671
- Ruckmanl A, Rajendran A (2001) Production of cellulase poor xylanase by an alkali tolerant strain of *Aspergillus flavus*. *Indian J Microbiol* 41:115-118

Santos RE, Teles SNZ, Campos MN, Souza JAD, Bispo RSA, Nascimento PR (2012) Production of  $\alpha$ -amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 strain using agro-industrial by-products. *Braz Arch Biol and Technol* 55(5):793-800

Saravanan P, Muthuvelayudham R, Viruthagiri T (2013) Enhanced production of cellulase from pineapple waste by response surface methodology. *J Engineering*. doi: 10.1155/2013/979547

Sedmak JJ, Grossberg SE (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 79:544-552

Sharma M, Kumar A (2013) Xylanases: an overview. *Br Biotechnol J* 3(1):1-28

Simões MLG, Tauk-Tornisielo MS, Tapia TMD (2009) Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. *Afr J Biotechnol* 8(22):6317-6326

Singh A, Kuhad CR, Kumar M (1995) Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Enz Microbial Technol* 17(6):551-553

Sudan R, Bajaj BK (2007) Production and biochemical characterization of xylanase from an alkali-tolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. *World J Microbiol Biotechnol* 23(4):491-500

Teixeira RS, Siqueira FG, Souza MV, Filho EX, Bon EP (2010) Purification and characterization studies of a thermostable  $\beta$ -xylanase from *Aspergillus awamori*. *J Ind Microbiol & Biotechnol* 37(10):1041-1051.

Tran AV (2006) Chemical analysis and pulping study of pineapple crown leaves. *Ind Crops Prod* 24(1):66-74

Vogel HJA (1956) A Convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microb Genet Bull* 13:42-43



Wakiyama M, Tanaka H, Yoshihara K, Hayashi S, Ohta K (2008) Purification and properties of family-10 endo-1-4- $\beta$  xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene. J Biosci Bioengin 105(4):367-37

Widjaja A, Lestari E, Tanjung A, Alfian W, Ogino H (2009) Optimized production of xylanase from fungal strains and its purification strategies. J Appl Scie Environ Sanit 4:219-232

Zhang GM, Huang J, Huang GR, Lx MA, Zhang XE (2007) Molecular cloning and expression of a new xylanases gene from *Plectosphaerella cucmerina*. Appl Microbiol Biotechnol 74(2):339-346

**Table 1.** Influence of agro-industrial wastes on xylanase production by *T. viride*

Carbon source (1% w/v)	Intracellular protein (mg)	Enzymatic activity (U/mL)	Specific activity (U/mg protein)
Wheat bran	13.05 ± 0.89	29.39 ± 1.63	31.48 ± 2.78
Apple peel	22.56 ± 2.52	14.27 ± 1.14	13.51 ± 1.62
Brewer's spent grain	8.25 ± 2.15	28.64 ± 2.26	38.13 ± 6.65
Passion bagasse	20.04 ± 1.09	11.08 ± 1.14	14.32 ± 0.89
Orange peel	9.75 ± 0.61	1.53 ± 0.15	2.06 ± 0.21
Pineapple peel	20.38 ± 1.58	35.12 ± 1.27	24.79 ± 1.32
Rice peel	1.53 ± 0.02	9.95 ± 0.59	33.52 ± 5.85
Soybean peel	2.89 ± 0.12	15.21 ± 1.02	12.74 ± 0.85

Average and standard deviation of two cultures.

**Table 2.** Effect of pineapple peel concentration on xylanase production by *T. viride*

Carbon source (% w/v)	Intracellular protein (mg)	Enzymatic activity (U/mL)	Specific activity (U/mg protein)
0.5	7.75 ± 0.39	10.68 ± 0.11	21.83 ± 3.04
1.0	20.38 ± 1.58	35.12 ± 1.27	24.79 ± 1.32
1.5	19.57 ± 0.64	45.36 ± 1.57	27.88 ± 2.06
2.0	35.35 ± 1.73	48.05 ± 1.89	23.56 ± 1.2
2.5	14.27 ± 0.17	36.47 ± 2.71	14.5 ± 0.78
3.0	8.49 ± 0.89	31.77 ± 1.78	19.01 ± 1.27

Average and standard deviation of two cultures.

**Table 3.** Effect of different temperatures on xylanase production by *T. viride*

Temperature (°C)	Intracellular protein (mg)	Enzymatic activity (U/mL)	Specific activity (U/mg protein)
20	21.57 ± 0.61	36.62 ± 2.05	14.10 ± 1.09
25	28.43 ± 0.51	37.25 ± 2.83	16.85 ± 2.20
28	58.02 ± 2.35	73.09 ± 2.87	50.78 ± 4.19
30	50.64 ± 3.76	49.46 ± 0.98	31.08 ± 1.24

Average and standard deviation of two cultures.

**Table 4.** Effect of different substances on xylanase from *T. viride*

Substance	xylanase activity (%)	
	Concentration	
	2 mM	10 mM
Control	100	100
CuSO <sub>4</sub>	90.53 ± 3.31	19.96 ± 1.57
ZnSO <sub>4</sub>	104.86 ± 4.39	140.25 ± 1.69
MnSO <sub>4</sub>	111.53 ± 3.61	80.03 ± 2.25
BaCl <sub>2</sub>	100.44 ± 4.13	108.48 ± 1.89
CaCl <sub>2</sub>	77.11 ± 4.17	65.4 ± 2.15
NH <sub>4</sub> Cl	103.56 ± 2.25	106.81 ± 4.49
NaCl	74.52 ± 2.84	70.74 ± 3.61
SDS	86.07 ± 0.82	65.3 ± 1.25
MgSO <sub>4</sub>	133.02 ± 1.38	114.11 ± 2.75
Sodium citrate	74.35 ± 4.23	69.02 ± 4.88
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	106.54 ± 0.78	92.94 ± 2.25
HgCl <sub>2</sub>	11.75 ± 0.44	0
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	78.34 ± 4.52	58.34 ± 3.21
EDTA	68.04 ± 2.63	66.16 ± 0
β-mercaptoethanol	131.74 ± 1.84	148.61 ± 2.78

Figure 1

b

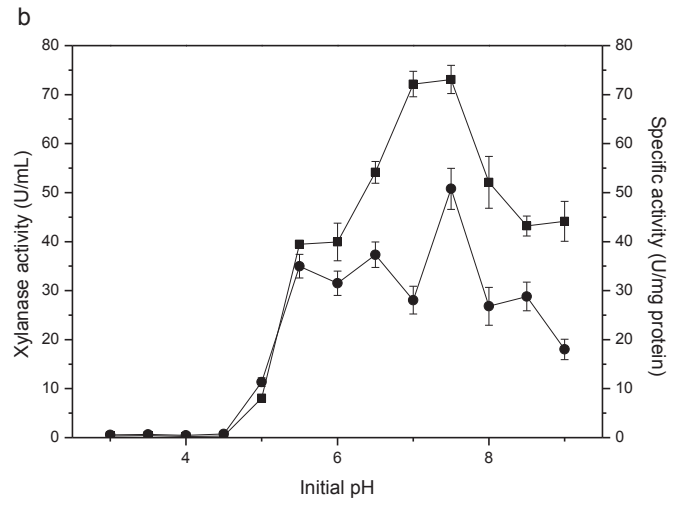
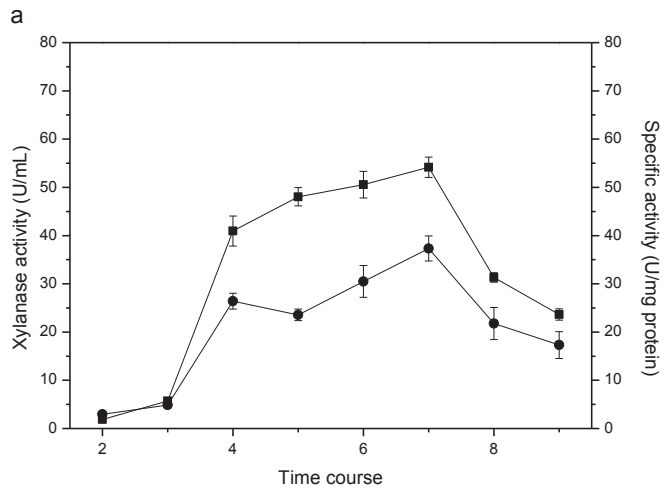


Figure 2

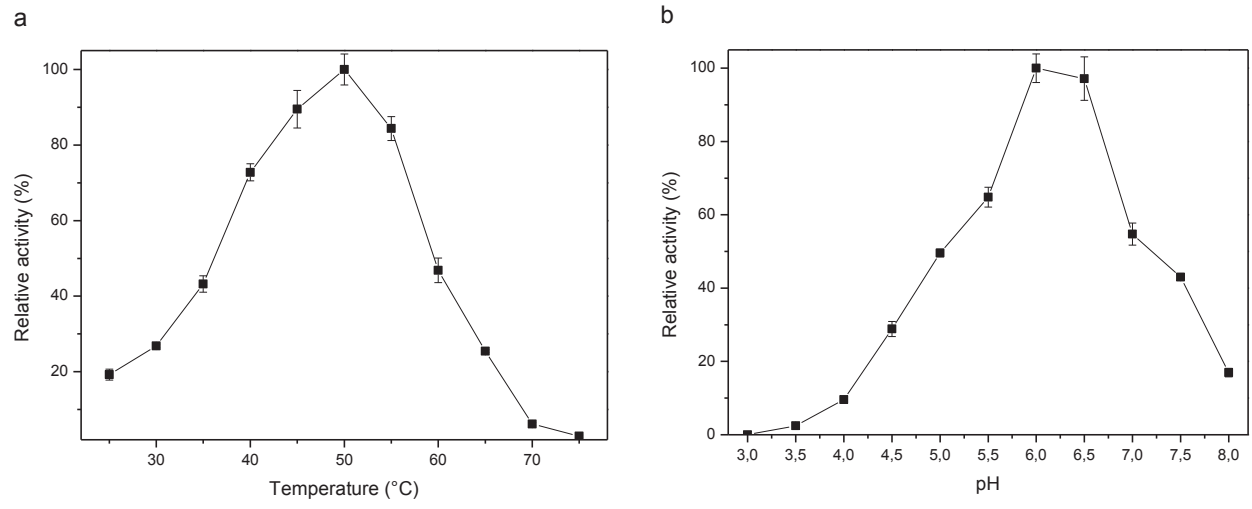
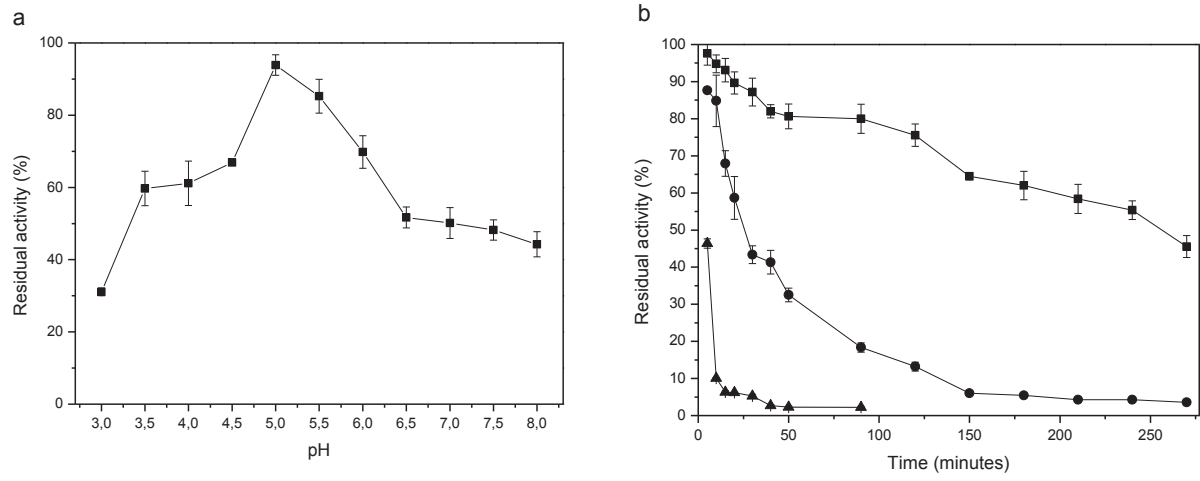


Figure 3





**FIGURE CAPTIONS**

**Fig 1.** Time-course (a) and initial pH (b) effect on xylanase production by *T. viride*. (■) xylanase activity (U/mL), (●) specific xylanase activity (U/mg of protein). Culture conditions: Vogel medium with pineapple peel 2% (w/v), at 28 °C. (a) pH 6.5; (b) stationary condition for 7 days.

**Fig 2.** Influence of temperature (a) and pH (b) on xylanase activity from *T. viride*. Culture condition: Vogel medium with 2% pineapple peel (w/v) under stationary condition for 7 days, pH 7.5 at 28 °C. Xylanase activity was assayed with McIlvaine buffer pH 6.0 (a) and with McIlvaine buffer from pH 3.0 to 8.0, at 50 °C (b).

**Fig 3.** pH (a) and thermal (b) stability of xylanase activity from *T. viride*. (a) The enzymatic preparation was incubated without substrate with McIlvaine buffer from pH 3.0 to 8.0 at 4 °C for 24 h. (b) The enzymatic preparation was incubated at (■) 40, (●) 45 and (▲) 50 without substrate. In both assays, the residual xylanase activity was assayed with McIlvaine buffer, pH 6.0 at 50 °C.

## 6. Considerações finais

Este trabalho foi o primeiro, até a presente data, a reportar a produção de xilanases por *T. viride* utilizando casca de abacaxi. As condições estabelecidas como ótimas para a sua produção foram 2% de casca de abacaxi como substrato, sete dias de cultivo, em pH 7.5, a 28 °C. A casca de abacaxi é gerada em grandes quantidades na América Latina e seu destino mais frequente são os aterros sanitários. Desta forma, o emprego deste resíduo para a produção de xilanases por *T. viride* além de possibilitar a obtenção de níveis elevados destas enzimas, pode contribuir para a diminuição de seus custos de produção, bem como evitar problemas ambientais gerados por seu descarte inadequado.

As xilanases produzidas apresentaram-se mais ativas a 50 °C, em pH 6.0, mantendo-se estáveis em pH 5.0-5.5 (93,8% e 85,25% de atividade residual, respectivamente) e a 40 °C, exibindo meia-vida ( $T_{1/2}$ ) de 255 min. Adicionalmente, as enzimas foram notavelmente ativadas por  $Mg^{+2}$  e  $Zn^{+2}$ , enquanto que  $Pb^{+3}$  e  $Hg^{+2}$  inibiram fortemente a atividade xilanásica.

A caracterização das enzimas produzidas permitiu estabelecer os parâmetros ótimos de reação das mesmas, a fim de se inferirem possíveis aplicações industriais, além de fornecer subsídios para trabalhos posteriores de purificação e caracterização dessas enzimas. Pelo fato de o filtrado bruto produzido por *T. viride* apresentar baixíssimos níveis de atividade celulásica, este se mostra promissor para ser aplicado nas indústrias de polpa, papel e têxtil.

## 7. Referências Bibliográficas

- AHMED, S.; IMDAD, S. S.; JAMIL, A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.15, n.3, 2012.
- AHMED, A.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p.19-35, 2009.
- AHUJA, S.; FERREIRA, G.; MOREIRA, A. Utilization of enzymes for environmental applications. **Critical Review in Biotechnology**, v.24, p.125-154, 2004.
- ALBERT, S.; CHAUHAN, D.; PANDYA, B.; PADHIAR, A. Screening of *Trichoderma* spp. as potential fungal partner in co-culturing with white rot fungi for efficient bio-pulping. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.6, n.3, p.95-101, 2011.
- ALI, H. K. H. Q.; ZULKALI, M. M. D. Utilization of agro-residual ligno-cellulosic substances by using solid state fermentation: A review. **Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition** v.6, n.1-2, p.5-12, 2011.
- ALI, S. B. R.; MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Statistical optimization of nutrients for production cellulase & hemicellulase from rice straw. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v.2, p.154-174, 2012.
- ALONSO, D. M.; WETTSTEIN, S. J.; DUMESIC, J. A. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. **Chemical Society Reviews**, v.41, p.8075-8098, 2012.
- ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 2001.
- ALTAF, A. S.; UMAR, M. D.; MUHAMMAD, S. M. Production of xylanase enzyme by *Pleurotus eryngii* and *Flamulina velutipes* grown on different carbon sources under submerged fermentation. **World Applied Sciences Journal** 8 (Special Issue of Biotechnology & Genetic Engineering), p.47-49, 2010.
- ARABI, M. I. E.; JAWHAR, M.; BAKRI, Y. Effect of additional carbon source and moisture level on xylanase production by *Cochliobolus sativus* in solid fermentation. **Microbiology**, v.80, n.2, p.150–153, 2011.
- ARENAS, V. A. M. ***Trichoderma* Pers. características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible**. Escrito Técnico. Disponível em:< <http://www.oriusbiotecnologia.com>> Acesso 26 ago 2013.
- ARGYRO, B., COSTAS, P., ATHANASIOS, A.K. Production of food grade yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, p.407–415, 2006.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, N. Transcriptional regulation of plant cell wall

degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.719-739, 2005.

AVCIOGLU, B.; EYUPOGLU, B.; BAKIR, U. Production and characterization of xylanases of a *Bacillus* strain isolated from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p. 65–68, 2005.

AYYACHAMY, M.; VATSALA, T.M. Production and partial characterization of cellulase free xylanase by *Bacillus subtilis* C 01 using agro-residues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps. **Letters Applied in Microbiology**, v.45, p.467-472, 2007.

AZIN, M.; MORAVEJ, R.; ZAREH, D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: optimization of culture condition by Taguchi method. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.801–805, 2007.

BAJAJ, K. B.; RAZDAN, K.; SHARMA, A. Thermoactive alkali-stable xylanase production from a newly isolated *Streptomyces* sp. SU 9. **Indian Journal of Chemical Technology**, v.17, p.375-380, 2010.

BALLESTEROS, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: biocombustibles para el sector del transporte. **Energía**, v.161, n.1, p.29-34, 2001.

BARTOLOMÉ, A. P.; RUPÉREZ, P.; FÚSTER, C. Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of red spanish and smooth cayenne cultivars. **Food Chemistry**, v.53, n.1, p.75-79, 1995.

BBC RESEARCH. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com>>. Acesso 23 abr 2013.

BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.459-466, 2000.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, n.3-4, p.326-338, 2001.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.66, p.101-107, 1998.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. **Biotechnology Advances**, v. 18, p.355-383, 2000.

BHOSALE, H. J.; SUKALKAR, S. R.; UZMA, S. M. Z.; KADAM, T. A. Production of xylanase by *Streptomyces rameus* grown on agricultural wastes. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v.1, n.4, p.505-512, 2011.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.288–290, 1985.

BIELY, P. Xylanolytic enzymes. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. (Eds). **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003, p. 879-916.

BILLARD, H.; FARAJ, A.; FERREIRA, L. N.; MENIR, S.; HEISS-BLANQUET, S. Optimization of a synthetic mixture composed of major *Trichoderma Reesei* enzymes for the hydrolysis of steam-exploded wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, n.9, 2012.

BIRCH, G. G.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K. J. Enzymes and Food Processing, **Applied Science**, London, UK, 1981.

BOENISCH, T. Basic Enzymology. In: KUMAR, L. G.; RUDBECK, L. (eds) **Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods**. 5<sup>o</sup> ed. Dako North America, Carpinteria, California, 2009, p.15.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA J. N. Enzimas na produção de etanol. **In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. S.; Corvo, M. L., Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A.; Ferrara, M. A.; Coelho, R. R. R. (eds.). Interciência Brasil, 2008, p.241-271.

BRENNAN, Y.; CALLEN, W. N.; CHRISTOFFERSEN, L.; DUPREE, P.; GOUBET, F.; HEALEY, S.; HERNÁNDEZ, M.; KELLER, M.; LI, K.; PALACKAL, N.; SITTENFELD, A.; TAMAYO, G.; WELLS, S.; HAZLEWOOD, G. P.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; ROBERTSON, D. E.; STEER, B. A. Unusual microbial xylanases from insect guts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.6, p.3609-3617, 2004.

BUANAFINA, M. M. O. Feruloylation in grasses: current and future perspectives. **Molecular Plant**, v.2, n.5, p.861-872, 2009.

BUTHELEZI, S. P.; OLANIRAN, A. O.; PILLAY, B. Sawdust and digestive bran as cheap alternate substrates for xylanase production. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, n.7, p.742-752, 2011.

CABRERA H. A.; MENEZES, H. C.; OLIVEIRA, J. V.; BATISTA, R. F. Evaluation of residual levels of benomyl, methyl parathion, diuron, and vamidothion in pineapple pulp and bagasse (smooth cayenne). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.5750-5753, 2000.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-active enzymes database (cazy): an expert resource for glycomics. **Nucleic Acids Research**, v.37, p.233–238, 2009.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2010.

CATHERINE, G.; VANITHA, N. M. Isolation of cellulose degrading bacteria and yeasts from pineapple waste. **International Journal of Current Research and Review**, n.4, v.20, p.07-14, 2012.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.85, p.5-37, 2000.

CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.39-49, 2006.

CHIDI, B. S.; GODANA, B.; NCUBE, I.; VAN RENSBURG, J. E.; CRONSHAW, A.; ABOTSI, K. E. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.21, p.3939-3948, 2008.

CIB - CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. Presença no nosso dia-a-dia. Disponível em: <http://cib.org.br/biotec-de-a-a-z/publicacoes/guia-o-que-voce-precisa-saber-sobre-transgenicos/presenca-no-nosso-dia-a-dia/>. Acesso 23 jan 2013.

COLLINS, J. L. History, taxonomy and culture of the pineapple. **Economic Botany**, v.3, n.4, p. 335-359, 1949.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n.1, p.3-23, 2005.

COSTA-FERREIRA, M.; DIAS, A.; MÁXIMO, C.; MORGADO, M. J.; SENA-MARTINS, G.; DUARTE, J. C. Xylanolytic enzyme production by an *Aspergillus niger* isolate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.44, n.3, p.231-242, 1994.

COUGHLAN, M. P.; FILHO, E. X. F.; PULS, J.; TUOHY, M. G. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems, p.53-84. In Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. P. (eds), **Hemicelluloses and Hemicellulases**. Portland Press, London, 1993.

COUTO, R. S. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. **Biotechnology Journal**. v.3, n.7, p.859-870, 2008.

COVECA. Comisión veracruzana de comercialización agropecuaria. **Gobierno del Estado de Veracruz**, México, 2002.

DACERA, D. D. M.; BABEL, S.; PARKPIAN, P. Potential for land application of contaminated sewage sludge treated with fermented liquid from pineapple wastes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.167, n.1-3, p.866-872, 2009.

DAVIDSON, M. W. **Cell Wall Structure**. Disponível em: <http://micro.magnet.fsu.edu> Acesso 04 abr 2013.

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

DEL BIANCHI, V. L.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O. **Fermentação em Estado Sólido**. In: Biotecnologia Industrial. Coord. Schmidell, W. et al., v.2, p.247-276, 2001.

DEV, D. K.; INGLE, U. M. Utilization of pineapple by-products and wastes: review. **Indian Food Packer**, v.36, p.15-22, 1982.

DHANASEKARAN, D.; LAWANYA, S.; SAHA, S.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Production of single cell protein from pineapple waste using yeast. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.8, p.26-32, 2011.

DRUZHININA, S. I.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, A. B.; KENERLEY, M. C.; PRAS, M. E.; MUKHERJEE, K. P.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, V. I.; KUBICEK, P. C. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. **Microbiology**, v.9, p.749-759, 2011.

DWIVEDI, P.; VIVEKANAND, V.; GANGULY, R.; SINGH, P. R. *Parthenium* sp. as a plant biomass for the production of alkalitolerant xylanase from mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 in submerged fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.581-588, 2009.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Program**, v.2, p.149-160, 2003.

FAO. **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>> Acesso 20 mai 2013.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; LAN, C. H.; FANG, T. J. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, v.43, p.49-55, 2008.

FARINAS, C. S. **A Parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Dissertação (Doutorado em Química) - Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

FERREIRA-FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.1093-1109, 1994.



FILHO, E. X. F.; PULS, J. O.; COUGHLAN, M. P. biochemical characteristics of two endo-fl-1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.11, p.171-180, 1993.

FIRÁKOVÁ, S; STURDÍKOVÁ, M; MÚCKOVÁ, M. Bioactive Secondary Metabolites Produced by Microorganisms Associated with Plants. **Biologia**, v.62, n.3, p.251–257, 2007.

GAFFNEY, M.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, n.12, p.2640-2644, 2009.

GALLARDO, O.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J. Cloning and characterization of xylanase a from the strain *Bacillus* sp. BP-7: comparison with alkaline pi-low molecular weight xylanases of family 11. **Current Microbiology**, v.48, p. 276–279, 2004.

GOMES, E.; GUEZ, U. A. M.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Thermostable enzymes: source, production and industrial applications. **Química Nova**, v.30, n.1, p.136-145, 2007.

GONZALES, G. V.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, N. C.; RÓMERO-GOMEZ, J. S.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.157–167, 2003.

GOSWAMI K. G.; PATHAK, R. R. Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v.2, n.3, p.237-246, 2013.

GRAMINHA E. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid- state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p.1–22, 2008.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by frap assay. **Nutrition Research**, v.23, n.12, p. 1719–1726, 2003.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, K. V.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, p.1599-1616, 2003.

GUPTA, U.; KAR, R. Xylanase production by a thermo-tolerant *Bacillus* species under solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.6, p.1363-1371, 2009.

HARMAN, G. E.; JIN, X.; STASZ, T. E.; PERUZZOTTI, G.; LEOPOLD, A. C.; TAYLOR, A. G. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological control**, v.1, p.23-38, 1991.



HARMAN, G. E.; HOWELL, R. C.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. families, modules, and implications for genomics. **Plant Physiology**, v.124, p.1515-1519, 2000.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion Microbiology**, v.8, p.301-306, 2005.

HOOG, G. S.; CUARRO, J. G.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2 ed. Noordwijk: Jupiter Informatie en Management, 2000, 1126p.

HOWELL, C. R. cotton seedling pre emergence damping off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.92, p.177-180, 2002.

IBGE. **Instituto brasileiro de geografia e estatística**, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso 14 mai 2013.

IRFAN, M.; SYED, Q. Article partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.5, n.1, p. 7-11, 2012.

ISIL, S.; NILUFER, A. Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. **Food Technology and Biotechnology**, v.43, n.1, p.37-40, 2005.

JAKLITSCH, M. W.; SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; DRUZHININA, I. S. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: A reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. **Studies in Mycology**, v.55, p.135-177, 2006.

JAMAL, P.; SAHEED, O. K.; ALAM, Z. Bio-valorization potential of banana peels (*Musa sapientum*): an overview. **Asian Journal of Biotechnology**, v.4, n.1, p.1-14, 2012.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v.11, p.1-5, 2000.

JEOH, T.; ISHIZAWA, C. I.; DAVIS, M. F.; HIMMEL, M. E, ADNEY, W. S.; JOHNSON, D. K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v.98, p.112-122, 2007.

JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.111, n.2, p.121-127, 2011.

JIANG, Z.; CONG, Q.; YAN, Q.; KUMAR, N.; DU, X. Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v.120, n.2, p.457–462, 2010.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v.40, n.3-4, p.1263-1270, 2005.

JORGE, I.; DE LA ROSA, O.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; TENA, M. Extracellular xylanases from two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* F. sp. Ciceris: enzyme production in culture and purification and characterization of a major isoform as an alkaline endo- $\beta$ -(1,4)-xylanase of low molecular weight. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.88, p.49–59, 2005.

JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, K. J.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, S. W.; HIMMEL, E. M.; BAKER, E. S. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v.16, p.687–697, 2009.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. **International Journal of Microbiology**, 2011.

KAR, S.; MANDAL, A.; DAS MOHAPATRA, K. P.; MONDAL, C. K.; PATI, R. B. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p. 462-464, 2006.

KAVITHA, R.; UMESH-KUMAR, S. Genetic improvement of *Aspergillus carbonarius* for pectinase overproduction during solid state growth. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, p.121–125, 2000.

KAVYA, V.; PADMAVATHI, T. Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Polish Journal of Microbiology**, v.58, n.2, p.125-130, 2009.

KHANDEPARKAR, R. D. S.; BHOSLE, N. B. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.4, p.732–742, 2006.

KHANDEPARKER, R.; NUMAN, M. T. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnololy**, v.35, n.7, p.635-644, 2008.

KHENG, P. P.; IBRAHIM, C. O. Xylanase production via solid-state fermentation. **Songklanakar Journal of Science and Technology**, v.27, n.2, p.332, 2005.

KHONZUE, P.; LAOTHANACHAREON, T.; RATTANAPHAN, N.; TINNASULANON, P.; APAWASIN, S.; PAEMANEE, A.; RUANGLEK. V.; TANAPONGPIPAT, S.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L. Optimization of

xylanase production from *Aspergillus niger* for biobleaching of eucalyptus pulp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.75 p.1129-1134, 2011a.

KHONZUE, P.; KHUCHAROENPHAISAN, K.; SRISUK, N.; KITPREECHAVANICH, V. Selection and production of insoluble xylan hydrolyzing enzyme by newly isolated *Thermomyces lanuginosus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.10, p.1880-1887, 2011b.

KING, B. C.; DONNELLY, M. K.; BERGSTROM, G. C.; WALKER, L. P.; GIBSON, D. M. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, v.102, n.4, p.1033-1044, 2009.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v.13, n.4, p.345-351, 2002.

KNOB, A. **Complexo xilanolítico de *Penicillium sclerotiorum*: produção, purificação e caracterização de xilanases e de beta-xilosidades**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2009.

KNOB, A.; BEITEL, M. S.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, F. R. C.; DE ALMEIDA, F. A. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **BioMed Research International**, v.2013, n.2013, p.1-8, 2013.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.389-407, 2010.

KRISANA, A.; RUTCHADAPORN, S.; JARUPAN, G.; LILY, E.; SUTIPA, T.; KANYAWIM, K. Endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p.17-23, 2005.

KRONBAUER, W. A. E.; PERALTA M. R.; OSAKU O. C.; KADOWAKI, K. M. Produção de xilanase por *Aspergillus casei* com diferentes fontes de carbono. **B.CEPPA**, v.25, n.2, 2007.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, p.151-73, 1993.

LADISCH, M. R.; LIN, K. W.; VOLOCH, M.; TSAO, G. T. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme Microbial Technology**, v.5, p.82-100, 1983.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations, **Bioresource Technology**, n.87, p.167-198, 2003.

LAURENTIZ, C. A.; JUNQUEIRA, M. O.; FILARDI, S. R.; ASSUENA, V.; CASARTELLI, M. E.; DA COSTA, R. Efeito da adição da enzima fitase em rações para frangos de corte com redução dos níveis de fósforo nas diferentes fases de criação. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.2, p.207-216, 2007.

LAXMI, S. G.; SATISH, T.; CHAGANTI, R. S.; BRAHMAIAH, P.; HYMAVATHI, M.; PRAKASHAM, R. S. Palm fiber as novel substrate for enhanced xylanase production by isolated *Aspergillus* sp. RSP-6. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.2, n.3, p.447-455, 2008.

LEE, J. W.; PARK, J. Y.; KWON, M.; CHOI, I. G. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, n.1, p.33-37, 2009.

LEISOLA, M.; JOKELA, J.; PASTINEN, O.; TURUNEN, O. Industrial use of enzymes. In Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), UNESCO, **Eolss Publishers**, Oxford, UK. In press, 2004.

LEMOES, J. L. S.; BOM, S. P. E.; SANTANA, E. F. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus Awamori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.206-211, 2000.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, n.3, e201209017, 2012.

LIEPMAN, H. A.; WIGHTMAN, R.; GESHI, N.; TURNER, S. R.; SCHELLER, H. V. *Arabidopsis* – A powerful model system for plant cell wall research. **The Plant Journal**, v.61, p.1107-1121, 2010.

LIMA, R. M.; DA SILVA, V. H. J.; DE ARAUJO, A. J.; LIMA, B. C.; DE OLIVEIRA, A. R. E. Enzimas exógenas na alimentação de aves. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.1, n.4, p.99-110, 2007.

LO, Y. C.; BAI, M. D.; CHEN, W. M.; CHANG, J. S. Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy. **Bioresources Technology**, v.99, p.8299-8303, 2008.

LU, F.; LU, M.; LU, Z.; BIE, X.; ZHAO, H.; WANG, Y. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**, v.99, p.5938-5941, 2008.

LUO, H.; YANG, J.; LI, J.; SHI, P.; HUANG, H.; BAI, Y.; FAN, Y.; YAO, B. Molecular cloning and characterization of the novel acidic xylanase xyld from *Bispora* sp. MEY-1 that is homologous to family 30 glycosyl hydrolases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, n.6, p.1829-1839, 2010.

MAALEJ, I.; BELHAJ, I.; MASMOUDI, N. F.; BELGHITH, H. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and

characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.158, n.1, p.200-212, 2009.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; DUNLAP, V. P.; CLARK, P. D. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed. 1160p. 12.Ed, 2010.

MAHMOOD, S.; RAHMAN, S. R. Production and partial characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase by *Trichoderma viride*. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v.25, n.2, p.99-103, 2008.

MAHESWARI, N. U.; AISWARYA, K. Conversion of natural wastes into sugar by *Trichoderme viride*. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**. v.3, n.2, p.8-12, 2012.

MAINOO, N. O. K.; BARRINGTON, S.; WHALEN, J. K.; SAMPEDRO, L. Pilot-scale vermicomposting of pineapple wastes with earthworms native to Accra, Ghana. **Bioresource Technology**, v.100, n.23 p.5872-5875, 2009.

MARAIS, S. **Enzymatic Hydrolysis with Commercial Enzymes of a Xylan Extracted from Hardwood Pulp**, Tese de Mestrado. University of Pretoria, Pretoria, 2008, 111p.

MARTIN, N.; DE SOUZA, R. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agroindustrial bioproduct, **Brazilian Archives in Biology and Technology**, v.47, p.813–819, 2004.

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MEDEIROS, R. G.; HANADA, R.; FERREIRA-FILHO, E. X. Production of xylan-degrading enzymes from amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, n.2, p.97–100, 2003.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.108, p.95-120, 2007.

MICHELIN, M.; POLIZELI, M. T. L. M.; SILVA, P. D.; RUZENE, S. D.; VICENTE, A. A.; JORGE, A. J.; TERENCEZI, F. H.; TEIXEIRA, A. J. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase production: alternatives for the autohydrolysis liquor application. **Book of Abstracts of MicroBiotec09**, Vilamoura, 2009.

MILANEZI, N. V. G. **Purificação e caracterização de uma endo-1,4-beta-xilanase produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial**. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, 2010.

MINAFRA, C. B. **Produção e suplementação com  $\alpha$ -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM203 na dieta de frangos de corte de 21 anos de idade**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007, 124p.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br>> Acesso 26 ago 2013.

MISHRA, S. K.; SINGH, R. P. Prospects for the bio-management of *Trichoderma viride* – an organism harmful to button mushroom. **Journal of Applied Horticulture Lucknow**, v.7, p.38–42, 2005.

MONISHA, R.; UMA, V. M.; MURTHY, K. V. Partial purification and characterization of *Bacillus pumilus* xylanase from soil source. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v.5, n.2, p.137-148, 2009.

MONTE, J. R.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Use of a mixture of thermophilic enzymes produced by the fungus *Thermoascus aurantiacus* to enhance the enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse cellulose. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 468-476, 2010.

MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Microbiology production of extra cellular exoglucanase by *Rhizopus oryzae* from submerged fermentation of agro wastes. **Recent Research in Science and Technology**, v.3, n.3, p.69-75, 2011.

MULAW, B. T.; DRUZHININA, S. I.; KUBICEK, P. C.; ATANASOVA, L. Novel Endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from Healthy *Coffea arabica* Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomyces. **Diversity**, v.5, p.750-766, 2013.

MURASHIMA, K.; KOSUGI, A.; DOI, H. R. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.5, p.1518–1524, 2003.

MYCOBANK. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/>> Acesso 05 mai 2013.

NAKAMURA, S. Structure and function of a multidomain alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. **Catalysis Surveys from Asia**, v.7, n.2-3, p.157-164, 2003.

NAMSREE, P.; SUVAJITTANONT, W.; PUTTANLEK, C.; UTTAPAP, D.; RUNGSARDTHONG, V. Anaerobic digestion of pineapple pulp and peel in a plug-flow reactor. **Journal of Environmental Management**, v.110, p.40-47, 2012.

NATIONAL PLANT DATA CENTER, 2000. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/>>, acesso ago 2013.

NUNES, H. C. A.; LOZANO, L. M. S.; BACHMANN, V.; HELM, C. V.; LIMA, E. A.; TAVARES, L. B. B. Atividade de holocelulases de *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana* cultivadas em meio sólido sob diferentes condições de umidade. Anais de Evento: ENZITEC Xth Brazilian Seminar on Enzyme Technology – Blumenau, SC, Brazil, 2012.

OKAFOR, O. Y.; ERUKAINURE, O. L.; AJIBOYE, J. A.; ADEJOBI, R. O.; OWOLABI, F. O.; KOSOKO, S. B. Modulatory effect of pineapple peel extract on lipid



peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of alcoholinduced oxidative stressed rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.1, n.1, p.12-14, 2011.

OKAFOR, U. A.; OKOCHI, V. I.; ONYEGEME-OKERENTA, B. M.; NWODO-CHINEDU, S. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.14, p. 1710-1714, 2007a.

OKAFOR, U. A.; EMEZUE, T. N.; OKOCHI, V. I.; ONYEGEME-OKERENTA, B. M.; NWODO-CHINEDU, S. Xylanase production by *Penicillium chrysogenum* (PCL501) fermented on cellulosic wastes. **African Journal of Biochemistry Research**, v.1, n.4, p.48-53, 2007b.

OMOJASOLA, P. F.; JILANI, O. P.; IBIYEMI, S.A. Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. **Nature and Science**, v.6, n.2, p.64-79, 2008.

PADMAVATHI, K.; THIYAGARAJAN, M.; NAVEED, A. N.; PALVANNAN, T. Production, optimization and partial purification of xylanase from *Streptomyces coelicolor* using agriculture waste. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Science**, v.2, n.1, 2011.

PADMAVATHI, T.; KAVYA, V. Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.1, n.4, p.137-147, 2011.

PAI, K. C.; CHEN, W. J.; ZENG, Y. F.; TUNG, C. L.; LIU, R. J. **Cloning of the bifunctional xylanolytic enzyme gene from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum* S20**. Department of Life Science, National Taiwan Normal University. Disponível em: <<http://www.ntnu.edu.tw/acad/rep/r98/d980001-1.pdf>> Acesso 23 jan 2013.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Tese de Doutorado em Engenharia Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDEY, A. Solid-state fermentation: an overview. **In: Solid- State Fermentation**, A. Pandey (Ed.), Wiley Eastern Ltd. New Delhi, India, p.3–10, 1994.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: i-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, p.1153-1169, 2000.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v.22, n.3, p.189–259, 2003.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; BETINI, J. H.; JORGE, J. A.; TERENCEZ, H. F.; POLIZELI, M. D. E. L. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2008.

PINTO, G. A.; DE BRITO, S. E.; ANDRADE, R. M. A.; FRAGA, P. L. S.; TEIXEIRA, B. R. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico 102, EMBRAPA**, ISSN 1679-6535, Fortaleza CE, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.5, p.577-591, 2005.

PRADE, A. R. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetics Engineering Reviews**, v.13, p.101-131, 1995.

PRIOR, B. A.; PREEZ, J. C. D.; REIN, P. W. Environmental parameters. In: ed: DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p.65-85.

QING, Q.; WYMAN, C. Supplementation with xylanase and  $\beta$ -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, n.18, 2011.

QUIROZ-CASTANEDA, E. R.; PÉREZ-MEJÍA, N.; MARTÍNEZ-ANAYA, C.; ACOSTA-URDAPILLETA, L.; FOLCH-MALLOL, J. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. **Biodegradation**, v.22, p.565-572, 2011.

RAGHAVARAO, K. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.127-135, 2003.

RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD, V. R.; MISHRA, R. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, n.9, p.433-41, 2004.

RAHMAN, R. N. Z. A.; GEOK, L. P.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. **Bioresource Technology**, v.96, p.429-436, 2005.

RANI, D. S.; NAND, K. Ensilage of pineapple processing waste for methane generation. **Waste Management**, v. 24, n.5, p.523-528, 2004.

RATANACHOMSRI, U.; SRIPRANG, R.; SORNLEK, W.; BUABAN, B.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L. Thermostable xylanase from *Marasmius* sp.: purification and characterization. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.39, n.1, p.105-110, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 7<sup>a</sup> ed., 2007, 856p.



RAVINDRAN, V.; SON, J. H. Feed enzyme technology: present status and future developments. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v.3, n.2, p.102-109, 2011.

RIBEIRO, D. S.; HENRIQUE, B. M. S.; OLIVEIRA, S. L.; MACEDO, A. G.; FLEURI, F. L. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v.45, p. 635-641, 2010.

ROBL, D.; DELABONA, S. P.; MERGEL, M. C.; ROJAS, D. J.; COSTA, S. P.; PIMENTEL, C.I.; VICENTE, A. V.; PRADELLA, C. G. J.; PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v.13, n.94, p.1-12, 2013.

ROCHA, P. C. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química. Uberlândia, 2010.

ROMANOWSKA, I.; POLAK, J.; BIELECKI, S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* ibt-90 xylanase for bakery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.69, p.665-671, 2006.

ROSA, M. F.; SANTOS, S. J. F.; MONTENEGRO, T. A. A.; ABREU, P. A. F.; CORREIA, D.; ARAÚJO, S. B. F.; NORÕES, V. R. E. **Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 6 p. Comunicado Técnico, 54, 2001.

ROSGAARD, L.; PEDERSEN, S.; CHERRY, J. R.; HARRIS, P.; MEYER, A. S. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. **Biotechnology Progress**, v.22, p.493-498, 2006.

ROWELL, R. M. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**, 1 ed., CRC Press: Madison, 2005.

SAKTHISELVAN, P.; NAVEENA, B.; PARTHA, N. Effect of medium composition and ultrasonication on xylanase production by *Trichoderma harzianum* MTCC 4358 on novel substrate. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.57, p.12067-12077, 2012.

SANTOS, F. L.; ISHII, L. P. Xilanases: principais metodologias e parâmetros cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.2, p.7-15, 2011.

SAPARRAT, M. C. N.; MARTÍNEZ, J. M.; TOURNIER, A. H.; CABELLO, N. M.; ARAMBARRI, M. A. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, n.8-9, p.799-803, 2000.

SÁ-PEREIRA, P.; DUARTE, C. J.; FERRARA, A. M.; LACERDA B. S. P.; ALVES, C. F. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Interciência Ltda: Rio de Janeiro, 2008.

SARAVANAN, P.; MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Enhanced production of cellulase from pineapple waste by response surface methodology. Hindawi Publishing Corporation. **Journal of Engineering**, v.2013, p.1-8, 2013.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Reviews in Plant Biology**, v.61, p.263-289, 2010.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, K. A.; KROHN, K. Endophytic Fungi: A Source of Novel Biologically Active Secondary Metabolites. **Mycological Research**, v.106, n.9, p.996-1004, 2002.

SHAO, W.; XUE, Y.; WU, A.; KATAEVA, I.; PEI, J.; WU, H.; WIEGEL, J. Characterization of a novel  $\beta$ -Xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.3, p.719–726, 2011.

SHARMA, P.; VIGNESH, K. P, RAMESH, R.; SARAVANAN, K.; DEEP, S.; SHARMA, M.; MAHESH, S.; DINESH, S. Biocontrol genes from *Trichoderma* species: a review. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.86, p.19898-19907, 2011.

SHIN, K.; JEYA, M.; LEE, J. K.; KIM, Y. S. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Fomitopsis pinicola*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.10, p.1415–1423, 2010.

SILVA, N. A. **Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do Maracujazeiro.** Tese de Mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia – Brasil, 2011.

SILVEIRA, F. Q. P.; XIMENES, F. A.; CACAIS, A. O. G.; MILAGRES, A. M. F.; MEDEIROS, C. L.; PULS, J.; FILHO, E. X. F. Hydrolysis of xylans by enzyme system from solid cultures of *Trichoderma Harzianum* strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.947-952, 1999.

SIMÕES, G. L. M. **Produção de xilanases por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga.** Tese de Mestrado, Unesp, Rio Claro, São Paulo – Brasil, 2006.

SIMÕES, M. L. G.; TAUK-TORNISIELO, M. S.; TAPIA, T. M. D. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.22, p. 6317-6326, 2009.

SINGH, S; PILLAY, B; PRIOR, B. A. thermal stability of  $\beta$ -xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.502-508, 2003.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry, Fundamentals and Applications.** Academic Press, 1981.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of Applied Solid-State Fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.

SOLOV'EVA, I. V.; OKUNEV, O. N.; VEL'KOV, V. V.; KOSHELEV, A. V.; BUBNOVA, T. V.; KONDRAT'EVA, E. G.; SKOMAROVSKII, A. A.; SINITSYN, A. P. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. **Mikrobiologiya**, v.74, n.2, p.172–178, 2005.

SOUZA, O.; SOUZA, M. T. C.; SANTOS, I. E. Tratamento químico de resíduos agrícolas com solução de uréia na alimentação de ruminantes. **Revista Capril Virtual**, 2007.

SRUAMISRI, S. Agricultural wastes as dairy feed in Chiang Mai. **Animal Science Journal**, Oxford, v.78, n.4, p.335-341, 2007.

STROPARO, C. E.; BEITEL M. S.; RESENDE V. T. J.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.33, n.6, p.2267-2278, 2012.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.1, p.33-64, 2002.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v.3, n.3, p.480-486, 2012.

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled foodwaste. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.430-435, 2007.

SURYAWANSHI, K. K.; INGLE, S. T.; SHINGOTE, P. R.; CHAUDHARI, S. R. Chitinase production ability of *Trichoderma viride* mutants. **Bioinfolet**, v.10, n.3, p.1048-1050, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4º ed. Porto Alegre: Artmed: 2009, 819p.

TAUSSIG, S. T.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application: an update. **Journal of Ethnopharmacology**. v.22, n.2, p.191–203, 1988.

TAYLOR, E.; FRANCIS, L. *Trichoderma* and *Gliocladium*. **Phytopathology**, n.1, p.139-191, 1998.

TEIXEIRA, R. S. S.; SIQUEIRA, F. G.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X.; BOM, E. P. Purification and characterization studies of a thermostable  $\beta$ -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.37, n.10, p.1041-1051, 2010.

TERRASAN, F. R. C. **Xilanases,  $\beta$ -xilosidases de *Penicillium janczewskii*: purificação, caracterização e aplicação no branqueamento da polpa celulósica e**

**para ração animal.** Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Rio Claro, 2011, 117f.

TIBREWAL, N.; KUMARI, R.; CHOUHAN, S. The use of agricultural waste as substrate for cell growth. **Journal for Young Scientists**, p.53-57, 2011.

TOPAKAS, E.; KATAPODIS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, J. B.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production and partial characterization of xylanase by *Sporotrichum thermophile* under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** v.19, p.195–198, 2003.

TORTORA, J. G.; FUNKE, R. B.; CASE, L. C. **Microbiologia**. 10<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed: 2012, 964p.

TWOMEY, L. N.; PLUSKE, J. R.; ROWE, J. B.; CHOCT, M.; BROWN, W.; MCCONNELL, M. F.; PETHICK, D. W. The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v.108, p.71-82, 2003.

VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS, P.; TOPAKAS, E. Purification, characterization and mass spectrometric identification of two thermophilic xylanases from *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, v.45, n.3, p.419–424, 2010.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.91, n.6, p.1477-1492, 2011.

VINIEGRA-GONZALES, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, N. C.; RÓMERO-GOMEZ, J. S.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical and Engineering Journal**, v.13, p.157-167, 2003.

WANG, Y. H.; ZHOU, J.; CHU, J.; QIAN, J. C.; ZHANG, S. L.; ZHUANG, Y. P. Production and distribution of  $\beta$ -glucosidase in a mutant strain *Trichoderma viride* T 100-14. **New Biotechnology**, v.26, n.3, p.150-156, 2009.

WENG, X.; SUN, J. Construction, expression, and characterization of a thermostable xylanase. **Current Microbiology**, v.51, p.188–192, 2005.

WIDJAJA, A.; LESTARI, E.; TANJUNG, A.; WIDIWAN; ALFIAN; OGINO, H. Optimized production of xylanase from fungal strains and its purification strategies. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v.4, n.3, p.219-232, 2009.

WONG, K. Y.; SADDLER, J. N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. **critical reviews in biotechnology** v.12, n. 5-6, p. 413-435, 1992.

WOOD, T. M.; McCRAE, S. I. The cellulase of *Penicillium pinophilum*. Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases. **Biochemical Journal**, v.234, p.93-99, 1986.

WORTHINGTON BIOCHEM, 2013. Disponível em: <<http://www.worthingtonbiochem.com/PASE/images/reactionXylanase.jpg>> Acesso 19 abr 2013.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. Ed. DUMITRIU, S. Dekker: New York, cap.43, 2005.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.86, p.88–95, 2004.

XIA, X.; LIE, T. K.; QIAN, X.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. **Microbial Ecology**, v.61, p.619–625, 2011.

XU, J.; TAKAKUWA, N.; NOGAWA, M.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.49, p.718–724, 1998.

ZEILINGER, S.; MACH, L. R.; SCHINDLER, M.; HERZOG, P.; KUBICEK, P. C. Different inducibility of expression of the two xylanase genes xyn1 and xyn2 in *Trichoderma reesei*. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.25624–25629, 1996.

ZHAO, L.; CAO, L. G.; WANG, J. A.; REN, Y. A.; XU, J. C.; REN, Q. N. Enzymatic saccharification of cornstalk by onsite cellulases produced by *Trichoderma viride* for enhanced biohydrogen production. **Global Change Biology Bioenergy**, v.5, n.5, p.591–598, 2013.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, L. G.; TRENTIN, S. D.; JÚNIOR, W. C.; FRASSON, P. A.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, J. A. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p.123-137, 2009.