UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE ENDO-XILANASES

DEBORAH MUROWANIECKI OTERO

PROFª. DRª. SUSANA JULIANO KALIL
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE ENDO-XILANASES

DEBORAH MUROWANIECKI OTERO

Tese apresentada como requisito necessário para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos.

PROFª. DRª. SUSANA JULIANO KALIL
Orientadora

RIO GRANDE-RS
2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese defendida por Deborah Murowaniecki Otero e aprovada em 14 de agosto de 2015, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

_____

Prof. ª Dr.ª Susana Juliano Kalil
Universidade Federal do Rio Grande

_____

Prof. Dr. Márcio Mazutti
Universidade Federal de Santa Maria

_____

Prof.ª Dr.ª Francine Antelo
Universidade Federal do Rio Grande

_____

Prof.ª Dr.ª Jaqueline Garda Buffon
Universidade Federal do Rio Grande

_____

Prof. Dr. Carlos André Viega Burkert
Universidade Federal do Rio Grande

_____

Prof.ª Dr.ª Lucielen Oliveira dos Santos
Universidade Federal do Rio Grande

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Desireé e Ramiro. Aprendi com vocês que os verdadeiros valores estão na responsabilidade, lealdade e principalmente, no amor. Sou eternamente grata pelos ensinamentos, constante apoio e confiança. Esta vitória é para vocês e por vocês!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me iluminado e me dado força para concluir mais essa etapa na minha vida.

Aos meus pais, amores da minha vida, por sempre me apoiarem, nas escolhas profissionais e pessoais. Por sempre apresentarem uma palavra de conforto, nas tantas vezes que ligava chorando desesperada pois as coisas não estavam dando certo como deveriam e do outro lado do telefone escutava: "Te acalma, vai dar tudo certo, se não deu dessa vez, tranca os dentes, baixa a cabeça, respira fundo e faz de novo...papai e mamãe estão aqui"..... Como não amar??? Obrigada, obrigada, obrigada....infinitamente obrigada....tudo que sou hoje devo à vocês!!!

Ao meu irmão Rafael e minha cunhada Larissa, por tornarem os meus retornos da FURG para casa mais agradáveis, por estarem sempre me esperando para colocar a conversa em dia, para uma jantinha boa, para escanear as correções desta tese para me mandar ou até mesmo para "afogar" as mágoas...vocês foram meus parceirões....Obrigada...amo vcs!!!

À Tasha, minha filha canina, amor sem igual, por recarregar minhas energias com seu abanar de rabo frenético ao me ver voltar para casa!!!!

À minha orientadora Drª Susana Juliano Kalil.... minha eterna prof.....MUITO OBRIGADA pela oportunidade, paciência, ensinamentos, orientações, puxões de orelha, pelo tempo que a mim dedicastes (que não foi pouco), sou muito grata a ti, quero um dia poder ter um pouquinho desse teu profissionalismo, sabedoria e dedicação!!!

Meu muito obrigada a minha querida AMIGA Ana Paula Larrosa, por esses tantos anos de amizade verdadeira e sincera, por ser parceira para todas as h, em especial aquele domingo que tu foi para o laboratório comigo só pra me dar carona, obrigada pelas viagens que fizemos juntas para os congressos, pelas visitinhas no lab, pelas conversas rápidas nos corredores para colocar os assuntos em dia, por vibrar tanto quanto eu com minhas conquistas, enfim por ser essa amiga que eu tanto amo e confio!!!

À Sabrine Aquino (Sasá) pela amizade, ajuda e principalmente por tornar o trajeto Pelotas-Rio Grande tão mais fácil e agradável. Vou sentir saudades de dividir o banco do bus contigo para colocar o papo e o sono em dia!!! Te adoro!!!

À Ana Sanzo, nossa técnica-mãe, obrigada pelos milhares de remedinhos, chás e cuidados que sempre tivesses comigo.....Cadê a Déh, ela não vem hoje??? Será que aconteceu algo???.... Sempre preocupada ... Obrigada por tudo!!

Aos colegas de laboratório: Thaís, Elida, Felipe, Samuel, Gabi e Jú (Biscoito)...obrigada por tornarem esses quatros anos de laboratório tão agradáveis, quantas risadas, cafés, almoços e conversas fiada trocamos, além dos pequenos conflitos de "bancada" .... Valeu galera!!!!

Aos meus queridos IC´s.... Bruno, Carol e Lili, vocês não tem idéia do quanto foram importantes e me ajudaram no desenvolvimento desta tese....Meu super obrigada a vocês, certamente não conseguiria fazer tantas atividades enzimáticas sem ajuda...

Meu agradecimento especial a Dai, não só pela amizade mas pelos milhões de galhos quebrados, minha parceira de café, de marmita, de idas ao CC, ao banco, de cuidar dos cachorrinhos da FURG, enfim...tu foi sem dúvida um presente que a FURG me deu. Sabes que tu é muito especial pra mim e que tu criou um monstrinho né?? Nos vemos na Europa amiga!!!!

Ao Ailton, meu primeiro contato quanto entrei na FURG, conversamos logo de cara no dia da matrícula e continuamos conversando até hoje né amigo? E como ele mesmo diz, sou uma pessoa muito repetitiva, então vou falar novamente: obrigada por tudo, adorei te conhecer e poder dividir contigo, nesses últimos quatro anos, tantas conversas, confissões, reclamações, indignações e também alegrias.

À Luisa, meu muito obrigada, tu me conquistou Lui, por ser sempre tão prestativa, por estar sempre disposta a explicar e me ajudar todas as vezes que precisei, por ser um exemplo super positivo de "CDF", nunca vi alguém que consiga consilhar tão bem tudo quanto tu.

E como prometido: meu agradecimento mega especial a Joana (eu sei que te falei que seria uma página inteira pra te agradecer, mas tive que resumir, desculpa...) pessoa ímpar que tive a

oportunidade de conhecer e de absorver um pouquinho do conhecimento....me ajudou incansavelmente ao longo deste trabalho, perguntei mil vezes a mesma coisa e ela com toda paciência do mundo me explicou mil e uma... Jojô... tu é o cara!!!Vou sentir saudades ☹

À Anna Rafaela por toda ajuda e tempo dedicado a mim, seja ele nas reuniões, nas discussões por email ou tratando resultados, depois disso usar planejamento experimental ficou mais fácil!!! Obrigada Rafa ☺

Aos laboratórios de Operações Unitárias (LOU), Ciência de Alimentos (LCA) e Tecnologia de Alimentos (LTA) pelo empréstimo de materiais, equipamentos e reagentes importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e valiosas contribuições neste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos, CNPQ e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Aos meus professores, amigos, a Islanda e à FURG, agradeço pelas oportunidades e pelas incansáveis ajudas.

"O saber se aprende com os mestres
A sabedoria, com o corriqueiro da vida."

Cora Coralina

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Esquema de pré-tratamento sobre o material lignocelulósico 33
Figura 2- Estrutura da molécula de xilana e ação das xilanases.....37

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Figura 1: Atividades de endo-xilanase (a), β-xilosidase (b), CMCase (c) e FPase (d), obtidas por leveduras isoladas e cultivadas em meio complexo, contendo xilana como fonte de carbono, onde: (■)13Y; (●)18Y; (▲)19Y; (□)34Y; (Δ) 40Y; (o) 53Y e (×)60Y. 59
Figura 2: pH (a) e biomassa (b) de leveduras isoladas e cultivadas em meio contendo xilana como fonte de carbono, onde: (■)13Y; (●)18Y; (▲)19Y;(□) 34Y; (Δ) 40Y; (o) 53Y e (×) 60Y. 61
Figura 3: Dendograma de identificação da levedura Cryptococcus laurentti (18Y) usando sequenciamento genético. 63

ARTIGO 2

Figura 1: Efeitos dos componentes do meio de cultivo sob a atividade de endo-xilanase.....78
no planejamento experimental fracionário. 78
Figura 2 - Acompanhamento do pH (-□-), atividade enzimática (-x-) e concentração de biomassa(-■-) da levedura *Cryptococcus laurentti* no ensaio 17, ao longo de 96 h de cultivo, bem como o desvio padrão. 82

ARTIGO 3

Figura 1 - Atividades de endo-xilanase obtidas de diferentes fontes de nitrogênio usando concentrações de 0,5% e 0,3%, sendo 1- $NH_4(SO_4)_2$, 2-gelatina, 3- KNO_3, 4-NH_4NO_3 e 5-uréia. 93
Figura 2- Curvas de contorno para a atividade de endo-xilanase em função da concentração de extrato de levedura e xilana. 96

ARTIGO 4

Figura 1- Acompanhamento da produção de endo-xilanase pela levedura *Pichia pastoris* em meios contendo: (■) - farelo de arroz desengordurado; (●) - casca de arroz; (×) – sabugo de milho; (▼) - casca de aveia e (○) - tegumento de soja sem tratamento (a) e com pré-tratamento alcalino (b) 109

Figura 2- Acompanhamento da produção de endo-xilanase pela levedura *Cryptococcus laurentti* em meios contendo: (■) - farelo de arroz desengordurado; (●) - casca de arroz; (×) – sabugo de milho; (▼) - casca de aveia e (○) - tegumento de soja sem tratamento (a) e com pré tratamento alcalino (b) 110

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1: Composição química de biomassas lignocelulósicas. 32

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Tabela 1- Relação halos de degradação enzimática obtidos através de leveduras isoladas 57
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos para leveduras isoladas ± desvio padrão. 62

ARTIGO 2

Tabela 1- Valores reais e codificados para os níveis usados nos planejamentos fracionário e DCCR 74
Tabela 2 - Valores reais e codificados bem como valores experimentais para as atividades enzimática obtida no planejamento fracionário. 76
Tabela 3 - Valores reais, codificados e experimentais do DCCR (2^4) para produção de endo-xilanase 80
Tabela 4 – Produtividade enzimática máxima encontrada nas diferentes velocidades de agitação estudadas. 83

ARTIGO 3

Tabela 1- Condições para avaliação da atividade de endo-xilanase considerando o uso de diferentes fontes de nitrogênio. 89
Tabela 2 - Valores dos níveis reais e codificados usados no DCCR para maximização da atividade de endo-xilanase.....90
Tabela 3 - Composição dos meios de cultivo para os testes finais de maximização enzimática. 90
Tabela 4 - Valores reais, codificados do planejamento experimental DCCR (2^2) tendo como resposta a atividade de endo-xilanase.....95
Tabela 5 - Atividade de endo-xilanase em diferentes formulações de meios de cultivo.....96
Tabela 6 - Atividade enzimática de CMCase, FPase, β-xilosidase e endo-xilanase em 36 h de cultivo em meio contendo 18,6 $g.L^{-1}$ de xilana, 10,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura e 3,0 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio em pH 6,5.....97

ARTIGO 4

Tabela 1 - Produtividade da levedura *Pichia pastoris* frente à produção enzimática em diferentes substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento, bem como as máximas atividades de endo-xilanase. 113
Tabela 2 - Produtividade da levedura *Cryptococcus laurentti* frente à produção enzimática em diferentes substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento, bem como as máximas atividades de endo-xilanase. 114

SUMÁRIO

CAPÍTULO I 23
RESUMO 25
ABSTRACT 26
1 INTRODUÇÃO 27
2 OBJETIVOS 29
2.1 OBJETIVO GERAL 29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

CAPÍTULO II 30
3 REVISÃO DA LITERATURA 31
3.1 MATERIAIS HEMICELULÓSICOS 31
3.2 XILANA 34
3.3 ENZIMAS 35
3.3.1 Xilanases 36
3.3.2 Aplicação das xilanases 39
3.4 PRODUÇÃO DE XILANASES 42
3.5 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS 46
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 47

CAPITULO III 48
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO 48
ARTIGO 1: SCREENING DE LEVEDURAS COM CAPACIDADE DE PRODUZIR XILANASES LIVRES DE CELULASES 49
RESUMO 51
1 INTRODUÇÃO 51
2 MATERIAL E MÉTODOS 53
2.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS 53
2.2 SELEÇÃO DAS LEVEDURAS 53
2.3 PRODUÇÃO DE XILANASE EM CULTIVO SUBMERSO 54
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS 54
2.4.1 Determinações enzimáticas 54
2.4.2 Determinação de biomassa 55

2.4.3 Determinação de pH..... 55
2.4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos..... 56
2.5 IDENTIFICAÇÃO DA LEVEDURA 56
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 57
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES 57
4 CONCLUSÃO 63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 64

ARTIGO 2: MAXIMIZAÇÃO DE ENDO-XILANASE PRODUZIDA POR *Cryptococcus laurentii* ISOLADO 69
RESUMO..... 71
1 INTRODUÇÃO 71
2 MATERIAL E MÉTODOS 73
2.1 MICRO-ORGANISMO..... 73
2.2 PRODUÇÃO DE XILANASE 73
2.3 ESTUDO DOS CULTIVOS 73
2.4 AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE ROTAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA..... 74
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS 75
2.5.1 Atividade enzimática..... 75
2.5.2 Determinação de biomassa..... 75
2.5.3 Determinação de pH..... 75
2.5.4 Determinação da produtividade máxima 75
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 76
4 CONCLUSÃO 83
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 84

ARTIGO 3: EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ENDO-XILANASE PRODUZIDA PELA LEVEDURA *Cryptococcus laurenti* 86
RESUMO..... 87
1 INTRODUÇÃO 87
2 MATERIAL E MÉTODOS 88

2.1 MICRO-ORGANISMO 88
2.2 PREPARO DO INÓCULO 88
2.3 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA 89
2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 90
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS 91
2.5.1 Determinações enzimáticas 91
2.5.2 Determinação de biomassa 92
2.5.3 Determinação de pH 92
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 92
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 92
4 CONCLUSÃO 98
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98

ARTIGO 4: SELEÇÃO DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTES DE XILANA EM CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE ENDO-XILANASE 101
RESUMO 103
1 INTRODUÇÃO 103
2 MATERIAL E MÉTODOS 105
2.1 MICRO-ORGANISMOS 105
2.2 SUBSTRATOS 106
2.3 PRÉ-TRATAMENTO DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS 106
2.4 PREPARO DO INÓCULO 106
2.5 PRODUÇÃO DE XILANASE EM CULTIVOS SUBMERSOS USANDO SUBSTRATOS INDUSTRIAIS 106
2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS 107
2.6.1 Atividade enzimática 107
2.6.2 Determinação de pH 107
2.6.3 Determinação da produtividade máxima 107
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 108
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 108
4 CONCLUSÃO 115
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 115

CAPITULO IV 119
4 CONCLUSÃO GERAL 121
5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 123

CAPITULO V 125
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 127

APÊNDICE 143
Apêndice 1 – Halos de degradação produzidos pela levedura *Cryptococcus laurentti* isolada de chicória. 145
Apêndice 2 – Halos de degradação para as 23 leveduras que apresentaram capacidade de hidrolisar a xilana presente nos meios. 146
Apêndice 3 – Análise de efeitos, Coeficiente de regressão e ANOVA do planejamento composto central rotacional 2^4 147
Apêndice 4 – Acompanhamento da biomassa e pH nos ensaios do delineamento central composto rotacional utilizando a levedura *Cryptococcus laurentti* para produção de endo-xilanase 149
Apêndice 5 – Influência da agitação dos meios de cultivo frente a atividade de endo-xilanase 151
Apêndice 6 – Cinética de acompanhamento da atividade de endo-xilanase produzida por *Cryptococcus laurentti* obtidas nos ensaios realizados no DCCR 2^2 152
Apêndice 7 – Coeficiente de regressão, análise de efeitos e ANOVA para o delineamento composto central rotacional (DCCR 2^2) 153
Apêndice 8 – Índices enzimáticos (IE) das leveduras de banco de culturas 155
Apêndice 9 – Artigo publicado 156

CAPÍTULO I
RESUMO, ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO

Xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise das xilanas e têm sido em grande parte, obtidas a partir de bolores e bactérias. No entanto poucos estudos têm sido relatados sobre a produção destas enzimas por leveduras. O presente trabalho teve como objetivo isolar leveduras de diferentes fontes vegetais visando à produção de xilanases, além de maximizar sua produção, estudar o uso de diferentes fontes de nitrogênio e cultivar as leveduras em meios contendo coprodutos agroindustriais. As amostras de alimentos e resíduos foram enriquecidas em caldo extrato de malte e levedura e isoladas em Ágar Nutriente Wallerstein, as leveduras isoladas foram, a seguir, avaliadas quanto à capacidade de degradar xilana presente no meio e produzir halos de hidrólise, os quais foram visualizados através do uso do corante vermelho congo. Os micro-organismos selecionados como potenciais produtores de xilanase foram crescidos em meio complexo líquido e as atividades enzimáticas de endoxilanase, β-xilosidase, carboximetilcelulase, celulase total, pH e concentração de biomassa foram avaliadas ao longo de 96 h de cultivo. Dentre as leveduras isoladas, sete foram selecionadas, e a 18Y foi a que apresentou a maior atividade de endo- xilanase (2,7 $U.mL^{-1}$), sendo esta isolada de chicória e identificada como *Cryptococcus laurentii*. Esta estirpe apresentou capacidade de produzir xilanase com baixos níveis de celulase, sendo assim selecionada neste trabalho. A maximização de endo-xilanase foi avaliada fazendo uso de planejamento experimental onde primeiramente foi realizado um planejamento fracionário 2^{6-2} para verificar os efeitos do pH inicial e as concentrações de xilana, peptona, $(NH_4)_2SO_4$, extrato de levedura e KH_2PO_4 sobre a atividade enzimática. Após selecionar as variáveis xilana, peptona, pH e extrato de levedura foi realizado um delineamento composto central rotacional (2^4) onde todos os cultivos foram mantidos a 30°C, 150 rpm durante 96 h sendo retiradas alíquotas para determinação das atividades, pH e biomassa. A produção máxima foi de 6,9 $U.mL^{-1}$ usando 10,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 10,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 10,0 $g.L^{-1}$ de xilana, 1,0 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)_2SO_4$ em pH 6,5 o que permitiu um incremento de mais de 250% sobre a atividade. Posteriormente foram realizados ensaios avaliando diferentes fontes e concentrações de nitrogênio orgânico e inorgânico. A presença de NH_4NO_3 e $(NH_4)_2SO_4$ usados na concentração de 3% proporcionaram as maiores atividades de endo-xilanase (6,2 e 6,0 $U.mL^{-1}$ respectivamente). O sulfato de amônio foi selecionado e fixado em 1 $g.L^{-1}$ e logo após um planejamento completo 2^2 foi realizado onde as variáveis xilana e extrato de levedura foram estudadas e as demais fixadas. As condições ótimas estabelecidas para a produção da enzima foram: concentração de xilana de 18,6 $g.L^{-1}$, concentração de extrato de levedura de 10 $g.L^{-1}$ atingindo 14 $U.mL^{-1}$. Após a maximização enzimática estudou-se o crescimento de *Pichia pastoris* NRRL Y-1603 e *Cryptococcus laurentti* em cinco substratos agroindustriais visando a possibilidade estes substratos substituírem a xilana em cultivos para a produção de endo-xilanase. Os ensaios foram realizados utilizando os subtratos pré-tratados com NaOH 4% e não tratados. Para inserção dos mesmos aos meios de cultivo, estes foram moídos e adicionados na concentração de 2%. O pré-tratamento para todos as fontes de hemicelulose foi eficiente e promoveu aumento nas atividades produzidas. *Cryptococcus laurentti* apresentou maior atividade enzimática (8,7 $U.mL^{-1}$) em farelo de arroz desengordurado e pré-tratado enquanto que a levedura *Pichia pastoris* NRRL *Y-1603* apresentou sua melhor condição para produção de endo-xilanase quando cultivada em meio contendo casca de aveia e o farelo de arroz pré-tratados, alcançando atividades máximas de 7,6 e 7,5 $U.mL^{-1}$.

Palavras chave: Isolamento. Leveduras. Xilanase. Maximização. Substratos hemicelulósicos.

ABSTRACT

Xylanases are enzymes which catalyze the hydrolysis of xylan and have been mostly obtained from fungi and bacteria. However, few studies have been reported about production of these enzymes by yeasts. This study aimed to isolate yeasts from different plant sources for xylanase production, besides of maximizes its production, to evaluate use of different of nitrogen sources and rear yeast in agro-industrial byproducts. Samples of food and wastes were enriched in a sort of malt extract and yeast and isolated on Nutrient Agar Wallerstein. Afterwards the isolated yeast was evaluated for capacity of to degrade xylan and of producing halos of hydrolysis which were visualized using congo red dye. The microorganisms selected as potential xylanase producers were grown in complex liquid source and the enzymatic activity of endo-xylanase, β-xylosidase, carboxymethylcellulase, FPase, pH and concentration of biomass were evaluated after 96 hours. Among all isolated yeasts, seven were selected, and the 18Y showed the most endo- xylanase activity (2.7 U.mL-1), which was isolated from chicory and identified as *Cryptococcus laurentii*. This strain was able to produce xylanase with low levels of cellulase, and thus is selected in this work. The maximization of endo-xylanase was evaluated by experimental design which was first performed in a factorial desing of 2^{6-2} in order of to verify effects on initial pH and concentrations of xylan, peptone, ($NH4_2SO_4$,yeast extract and KH_2PO_4 on the enzymatic activity. After the xylan, peptone, pH and yeast extract variables were selected an central composite desing (2^4) was performed where all rearings were maintained at 30 °C, 150 rpm during 96 h and samples were taken for determination of activity, pH and biomass. The highest production was 6.9 $U.mL^{-1}$ using 10.0 g L^{-1} of yeast extract, 10.0 g L^{-1} of peptone, 10.0 gL^{-1} of xylan and 1.0 gL^{-1} of $(NH4)_2SO_4$ at pH 6.5 which increased the activity over 250%. Afterwards tests evaluating different sources of both organic and inorganic nitrogen concentrations were conducted. The presence of NH_4NO_3 and $(NH_4)_2SO_4$ used in a concentration of 3% showed the highest endo-xylanase activity (6.2 and 6.0 $U.mL^{-1}$ respectively). Ammonium sulfate was selected and established at 1 $g.L^{-1}$ and after a central composite desing 2^2 was run where xylan and yeast extract variables were studied and the other ones set. The optimum conditions for enzyme production were established as: xylan concentration of 18.6 g L^{-1}, yeast extract concentration of 10 g L^{-1} reaching 14 $U.mL^{-1}$. After enzyme maximization the growth of *Pichia pastoris* NRRL Y-1603 and *Cryptococcus laurentti* were evaluated in five agroindustrial sources aiming that these substrates might replace xylan for the production of endo-xylanase. Experiments were performed using substrates pre-treated with 4% NaOH and untreated. In order to insert the same conditions, these were ground and added at a concentration of 2%. The pre-treatment for all sources of hemicellulose was efficient and promoted an increase in the activities. *Cryptococcus laurentti* showed higher enzyme activity (8.7 U.mL-1) in pre-treated defatted rice bran while the yeast of *Pichia pastoris* NRRL Y-1603 showed its best condition for endo-xylanase production when grown in oat hulls and pre-treated rice bran source, reaching top activities of 7.6 and 7.5 $U.mL^{-1}$.

Keywords: Isolation. Yeast. Xylanase. Maximization. Hemicellulose substrates.

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial incluindo enzimas, hormônios, aromas, antibióticos, dentre outros. Alguns desses bioprodutos podem ser obtidos a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil (FLORÊNCIO; COURI; FARINAS 2012).

Dentre os principais produtos obtidos por processos biotecnológicos estão as enzimas, as quais são produzidas comercialmente e, na maioria dos processos, a partir de micro-organismos, devido em grande parte à sua diversidade, facilidade e controle operacional, e maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais (CHANDRA et al., 2010). Um grupo de enzimas presentes nas mais diversas aplicações são as xilanases, hidrolases que vêm sendo utilizadas em vários segmentos indústriais (DIHAM et al., 2008).

Xilanases são glicosidases responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações β-1,4 presentes na xilana vegetal (principal componente da hemicelulose). Sua degradação completa necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbianas específicas (COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993). A hidrólise realizada por estas enzimas dentro da cadeia da xilana produz xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela ação da β-xilosidase (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2000).

O uso dessas enzimas é bastante diversificado uma vez que elas podem ser aplicadas no branqueamento de papel (xilanases livres de celulases), alimentação animal, panificação e clarificação de bebidas, produção de xilo-oligossacarídeos, conversão de resíduos lignocelulósicos, entre outras (CARVALHO et al., 2013).

As enzimas xilanolíticas têm sido largamente obtidas a partir de bolores (ADESINA; ONILUDE, 2013; RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2002) e bactérias (CHAVEZ et al, 2006; RAJAGOPALAN et al., 2013), porém poucos são os trabalhos citados na literatura sobre a produção dessa enzima por leveduras (MORAIS; FARIA; AZEVEDO, 2013; BONMAK et al., 2011). Além disso, existem poucos estudos que investigam a produção em cultivos submersos simultaneamente de celulases (CMCase e FPase) e xilanases (endo-xilanase e β-xilosidase).

A produção industrial de enzimas é normalmente limitada pelo alto custo dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Para tornar a produção de enzimas mais competitiva, a utilização de substratos de menor custo e facilmente disponíveis deve ser explorada, além de avanços tecnológicos e da busca por novos micro-organismos. No Brasil, devido as suas condições climáticas, há disponibilidade de vários resíduos gerados na agricultura ou na agroindústria que podem ser utilizados nos processos para produção de enzimas (CARVALHO et al., 2013).

A escolha do substrato adequado e as condições de cultivo para a produção de xilanases são muito importantes, uma vez que são fatores determinantes para o crescimento da enzima. O substrato atua como fonte de carbono e energia, e também proporciona os compostos indutores necessários para os micro-organismos produzirem essas enzimas (HALTRICH et al., 1996). Substratos hemicelulósicos de menor custo, como sabugo de milho, farelo de trigo, farelo de arroz, palha de arroz e bagaço de milho tem sido bastante utilizados para a produção de xilanases (BEG et al., 2001; KULKARNI et al., 1999; GÍRIO et al., 2010).

Em geral, os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta sendo necessário submeter esta biomassa à pré tratamentos físicos e/ou químicos antes da sua hidrólise para aumentar a produção enzimática. Esta etapa é responsável pela remoção de lignina, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, de maneira a tornar a hemicelulose mais susceptível à hidrólise e com isso uma maior produção de xilanases (RABELO, 2010).

No contexto da biodiversidade, é válido ressaltar o potencial focado em isolar micro-organismos produtores de agentes importantes nas indústrias farmacêuticas, têxteis e de alimentos. Nesta última, é de grande importância a descoberta de novos micro-organismos produtores de insumos de interesse biotecnológico, como as enzimas, tendo em vista sua grande aplicação como coadjuvantes da tecnologia (PEIXOTO, 2006).

Com base no exposto acima, esta tese teve como objetivos produzir endo-xilanases através de leveduras isoladas de diferentes fontes, buscando maximizar a produção enzimática, além de verificar a capacidade da levedura isolada, e de uma cepa obtida de banco de culturas, crescerem em substratos agroindustrias usados como fontes de xilana em cultivos submersos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar leveduras produtoras de enzimas do complexo xilanolítico e maximizar sua atividade enzimática, bem como testar diferentes substratos agroindustriais como fontes de xilana para a produção de endo-xilanase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento e a seleção de leveduras, a partir de amostras de alimentos e substratos agroindustriais, com capacidade xilanolítica;
- Cultivar as leveduras selecionadas em meio complexo líquido a base de xilana realizando acompanhamento das atividades enzimáticas (endo-xilanases, β xilosidase, CMCase e FPase), concentração de biomassa e pH;
- Realizar a maximização da atividade de endoxilanase para a levedura selecionada;
- Investigar a produção de endo-xilanase em meios de cultivo com SUBSTRATOS agroindustriais ricos em hemicelulose submetidos e não submetidos a pré tratamento, utilizando a levedura selecionada;
- Comparar a produção enzimática da levedura isolada (*Cryptococcus laurentti*) e de *Pichia pastoris* (NRRL Y-1603) em cultivos contendo substratos agroindustriais tratados e não tratados com hidróxido de sódio 4%.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MATERIAIS HEMICELULÓSICOS

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre essas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado (AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Esta biomassa inclui materiais oriundos das atividades de exploração agroindustrial e florestal, tais como palhas de arroz e trigo, sabugo de milho, casca de aveia, bagaço de cana de açúcar, aparas de eucalipto, entre outros. Estes resíduos agrícolas, em geral, contêm cerca de 40 a 60 % de celulose, 20 a 40 % de hemicelulose e 15 a 25 % de lignina (SUN; CHENG, 2002).

A celulose é o constituinte normalmente encontrado em maior abundância nas biomassas. É a substância formadora da estrutura esquelética da planta, consistindo em um polímero formado por unidades de glicose conectadas através de ligações químicas envolvendo átomos de oxigênio. As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, resultando na cristalinidade da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). Muitas vezes a região cristalina da celulose impede a hidrólise significativa devido às fortes ligações existentes entre as unidades de glicose. O que ocorre na maioria das vezes é uma hidrólise parcial, uma vez que a região amorfa, como uma estrutura desorganizada, é facilmente hidrolisada.

As hemiceluloses, por outro lado, são heteropolímeros de menor massa molecular compostas pelos açúcares glicose, manose e galactose, e em maior quantidade, xilose e arabinose, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e grupos acetila. Age como substância de reserva e sustentação, servindo de conexão entre a lignina e a celulose (PEREZ et al., 2005). O grau de polimerização deste heteropolímero é geralmente inferior a 200 unidades e por possuir massa molecular menor, a hemicelulose é muito mais solúvel do que a celulose e é mais rapidamente hidrolisada (JEFFRIES, 1983) pois suas ligações glicosídicas rompem-se facilmente permitindo a utilização de seus açúcares, como a D-xilose, para a produção de produtos de interesse (CARVALHO et al., 2004).

A composição química da biomassa lignocelulósica varia em função do tipo de biomassa, conforme mostrado na Tabela 1. Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material (SANTOS et al.,2012).

Tabela 1: Composição química de biomassas lignocelulósicas.

Biomassa lignocelulósica	**% celulose**	**% hemicelulose**	**% Lignina**	**Referência**
Casca de arroz	34	29	19	CEN et al, 2010
Tegumento de soja	29-51	10-20	1-4	IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003
Casca de aveia	29	28	22	TAMANINI, 2004
Sabugo de milho	45	35	15	SAHA, 2003
Farelo de arroz desengordurado	25-40	20-35	15-35	SHIBUTA et al.1985
Madeira dura	43-47	25-35	16-24	SANTOS et al., 2012
Madeira mole	40-44	25-29	25-31	SANTOS et al., 2012

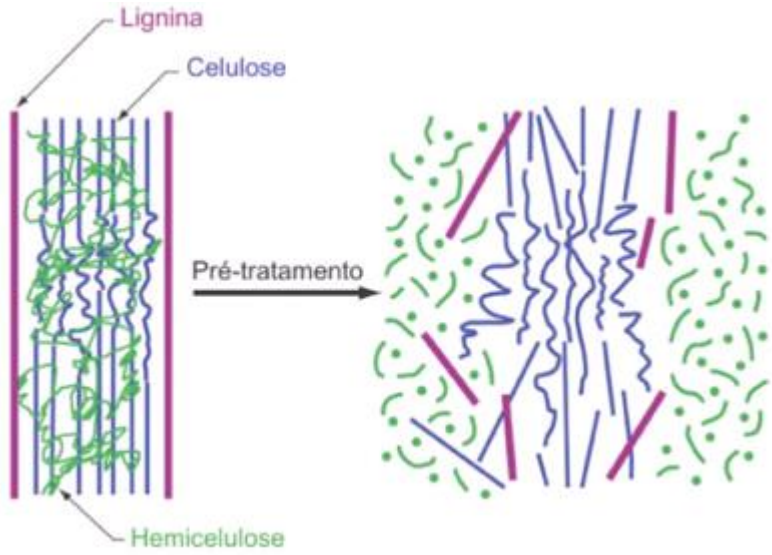
O principal componente encontrado nas hemiceluloses de resíduos agrícolas, como a palha e a casca de arroz são polímeros de xilose (xilana) (PEREZ et al., 2005). Durante o pré- tratamento a fração hemicelulósica é a que inicialmente reage, e sendo que destas, xilanas são os polimeros mais facilmente extraídos (SWEETT; WINANDY, 1999). Já a lignina é um polímero que atua como suporte nas paredes da célula, é insolúvel, apresentando peso molecular elevado e muitas ligações cruzadas, características de polímeros termorrígidos. Possui natureza química bem distinta dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura preponderantemente aromática. A solubilidade da lignina em meio ácido, neutro ou alcalino depende, no entanto, dos precursores da lignina (GRABBER, 2005). Atua como ligante das fibras de celulose, contribuindo para a resistência e rigidez do tecido da madeira.

Uma grande variedade de fungos e bactérias consegue degradar o material lignocelulósico usando enzimas hidrolíticas e oxidativas (AGUIAR E FERRAZ, 2011). A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas formando açúcares que serão metabolicamente utilizados por micro-organismos na produção de vários produtos como o etanol, butanol, acetona, ácidos orgânicos, glicerol, enzimas, entre outros (WYMAN, 2003).

A complexa estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica, no geral, é resistente à bioconversão. A utilização da biomassa como fonte de carboidratos para obtenção de combustíveis e produtos de alto valor agregado tem sido severamente dificultada pela sua recalcitrância (SANNIGRAHI et al., 2010).

Os constituintes da biomassa geralmente encontram-se associados dificultando assim o ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos, que não possuem a capacidade de assimilar agregados tão grandes. Diante da complexidade destes materiais se percebe a importância de se utilizar um pré tratamento eficaz que possa causar o rompimento dessas barreiras facilitando a hidrólise e consequentemente minimizando a degradação, evitando assim perda de açúcares. O esquema de um pré tratamento desorganizando a biomassa original está representado na Figura 1:

Figura 1 - Esquema de pré-tratamento sobre o material lignocelulósico



Fonte: Santos et al., 2012.

O pré tratamento é definido como um conjunto de procedimentos capaz de tornar os compostos acessíveis ao processo de transformação, através da quebra de lignina e do rompimento da estrutura cristalina da celulose (CAMPO et al., 2006). A etapa do pré tratamento é considerada uma das etapas do processo mais relevantes na conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis, pois influencia nos custos no processo de pesquisa e desenvolvimento (CAMPO et al., 2006).

A deslignificação é causada pelo íon hidroxila altamente reativo (OH^+) que é um produto de degradação do peróxido de hidrogênio. Este radical é responsável pela oxidação da estrutura da lignina, na qual ataca os grupos hidrofílicos, quebrando algumas ligações e, eventualmente, levando a dissolução da lignina (SUN et al., 2004). Portanto, de acordo com Gould (1984) a concentração de peróxido de hidrogênio deve ser, pelo menos, 1% para se ter uma boa deslignificação. No tratamento químico que utiliza solução alcalina as reações iniciais são as de solvatação e saponificação, ocorrendo degradação química e ionização dos grupos hidroxila, provocando um estado de inchaço da biomassa e tornando-a mais acessível para as enzimas e micro-organismos, facilitando a acessibilidade aos carboidratos.

3.2 XILANA

O principal polissacarídeo componente da hemicelulose é a xilana, o qual está presente em todas as camadas da parede celular vegetal na interface entre a celulose e a lignina. A xilana depois da celulose, é a mais abundante fonte renovável de carbono presente na madeira e resíduos agrícolas (ZANOELO et al., 2004).

É uma molécula heterogênea que consiste de cadeia principal com ligações β-1,4 de polixilose até uma cadeia com ramificações de arabinose, manose, galactose, glicose e ácidos. Na natureza, sua degradação e modificação podem ser feitas por diferentes micro-organismos (ABDEL-SATER; EL-SAID, 2001; FERREIRA et al., 1999; LENARTOVICZ et al., 2003; MAHESHWARI et al., 2000).

O interesse pela hidrólise da xilana se dá pela ação de várias enzimas do complexo xilanolítico. As xilanases fazem parte desse complexo, os quais são responsáveis pela hidrólise catalítica da xilana. Essas enzimas são principalmente produzidas por micro-organismos e responsáveis pela decomposição das paredes celulares das plantas. As xilanases são também encontradas em algas marinhas, protozoários, lesmas, crustáceos, insetos e sementes de plantas (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). Entre as fontes microbianas, bolores são importantes, pois eles secretam no meio níveis mais elevados de xilanase do que as bactérias e leveduras (HALTRICH et al., 1996; POLIZELI et al., 2005). Entre as espécies de fungos, *Humicola grisea* var. *thermoidea* tem conquistado considerável atenção como fonte rica de xilanases. Recentes estudos têm demonstrado que estes fungos produzem xilanases com diferentes propriedades (MEDEIROS et al., 2007). Por isso, as origens diversas da xilana ocorrem devido a sua heterogeneidade estrutural, refletindo na ocorrência de múltiplas formas de xilanases. Essas enzimas são variadas na estrutura tri-dimensional. Elas podem ser

exncontradas em seis famílias das glicosidase hidrolase (GH): GH5, GH7, GH8, GH10, GH11 e GH43. As famílias se diferem uma das outras quanto às propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade do substrato (COLLINS et al., 2005; PUCHART; BIELY, 2007).

Devido à estrutura heterogênea a xilana requer para sua degradação a ação de muitas enzimas xilanolíticas. Este sistema enzimático é composto particularmente pelas enzimas: β-1,4-Endoxilanases (1,4-β-D-xilana xilohidrolases; EC 3.2.1.8) que clivam as ligações internas glicosídicas da cadeia principal da heteroxilana, diminuindo o grau de polimerização do substrato. A clivagem do substrato não é ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato (comprimento e/ou grau de ramificação) e também da presença de substituintes (LI et al., 2000). Inicialmente, os principais produtos da reação são xilo-oligossacarídeos, mas posteriormente, outras pequenas moléculas de monossacarídeo, dissacarídeo e trissacarídeo de xilose, isto é, xilose, xilobiose e xilotriose podem ser liberados.

3.3 ENZIMAS

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente atrativas, pois aumentam a taxa de reação química sem sofrer transformação. Além de serem ativas e versáteis, elas catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores convencionais. Outra vantagem na utilização de enzimas é a facilidade em se regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar o pH ou adicionar suplementos. Geralmente, possuem alta especificidade como consequência de sua conformação tridimensional (HERNALSTEENS; MAUGERI, 2010; PATEL, 2002; PIZARRO; PARK, 2003).

Constituem um grupo de macromoléculas necessário para inúmeros eventos biológicos. Além disso, são úteis em muitos processos industriais, sobre tudo nas áreas de biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos (PASTORE, 2010.)

As enzimas de origem microbiana, em particular as oriundas de leveduras, possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas. Portanto, a identificação de novas fontes microbianas garante o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais e torna

possível o desenvolvimento de sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES et al., 2002).

Dentre as enzimas microbianas empregadas em processos na indústria alimentícia destacam-se as xilanases que são enzimas extracelulares produzidas principalmente por bolores e bactérias os quais são capazes de produzir xilo-oligossacarídeos (XOS).

3.3.1 Xilanases

As xilanases compreendem o grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana. As principais enzimas envolvidas nesta hidrólise são β-1,4-endoxilanase e a β-D-xilosidase (GIRIO et al, 2010, NAWEL et al.,2011).

Estas enzimas foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 e receberam o código enzimático de EC 3.2.1.8. O nome oficial é endo-β-1,4-xilanase e os seguintes sinônimos são comumente utilizados: xilanase, endoxilanase, β-1,4-D-xilana-xilanohidrolase, endo-β-1,4-D-xilanase, β-1,4-xilanase e β-xilanase (COLLINS et al., 2005).

As endoxilanases podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o produto final da reação: as que catalisam a hidrólise nos pontos de ramificação 1,3-α-1-arabinofuranosil de arabinoxilanas em adição à hidrolise das ligações da cadeia principal, e aquelas que não hidrolisam estes pontos de ramificação (; CZJZEK et al., 2005; MATSUO et al., 1998; RIZZATTI, 2004).

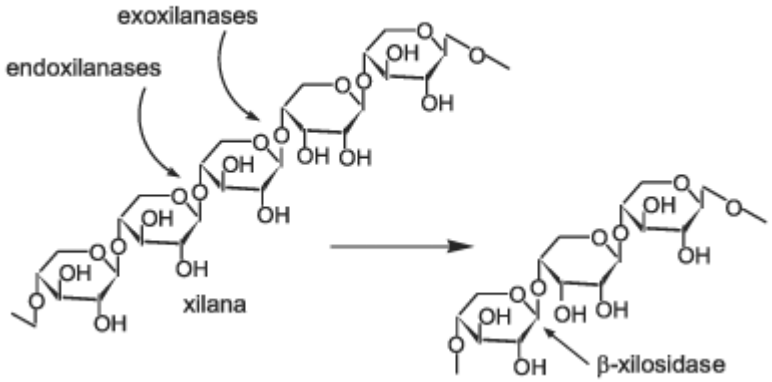
A enzima β-1,4-endoxilanase (1,4-β-D-xilana-xilohidrolase, E.C. 3.2.1.8) provoca a quebra das ligações glicosídicas do esqueleto heteroxilana resultando na diminuição do grau de polimerização do substrato. O ataque ao substrato não é feito ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato como, por exemplo, o comprimento e o grau de ramificação do composto e a presença de substituintes, sendo que os principais compostos formados no início da hidrólise da xilana são os xilo-oligossacarídeos (GIRIO et al., 2010;VICENTE, 2002; NAGAR et al., 2011).

As β-xilosidases (β-1,4-D-xilosídeo-xilo-hidrolase; EC 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam xilo-oligossacarídeos e xilobiose, a partir da extremidade não redutora, liberando resíduos xilopiranosil. Esta enzima sozinha não hidrolisa a xilana e tem maior afinidade pela xilobiose. Sua afinidade aos xilo-oligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização (GIRIO et al., 2010). Estas enzimas são capazes de

clivar substratos artificiais como *p*-nitrofenil β-D-xilopiranosídeo (ANDRADE et al., 2002; RIZZATTI, 2004).

As xilanases microbianas são proteínas com apenas uma cadeia polipeptídica, com massas molares variando entre 8 e 14 KDa (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). A temperatura ótima para as xilanases bacterianas e fúngicas varia entre 40 e 60 ºC. As enzimas fúngicas são geralmente menos termoestáveis que as bacterianas. As xilanases são usualmente estáveis em pH entre 3 e 10, possuindo pH ótimo entre 4 e 7 (ITO et al., 1992). O ponto isoelétrico das xilanases varia de 3 a 10. Normalmente as bactérias são conhecidas por produzirem xilanases que possuem alta massa molecular e baixo ponto isoelétrico ou baixa massa molecular e alto ponto isoelétrico, No entanto, esta relação não é observada em fungos, sendo as xilanases fúngicas, em sua maioria de baixo peso molecular (HALTRICH et al., 1996). As xilanases hidrolisam as moléculas de xilanas por mecanismos de ação endo e exo, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2- Estrutura da molécula de xilana e ação das xilanases.



Fonte: Gomes et al., 2007.

As xilanases são capazes de produzir oligossacarídeos, os quais recebem o nome de xilo-oligossacarideos (XOS). Entre os oligossacarídeos utilizados, os XOS possuem a vantagem de serem obtidos através de fontes altamente disponíveis e de baixo custo, como os resíduos florestais e agroindustriais, e de possuírem as propriedades prebióticas semelhantes ou superiores as dos demais compostos, como os fruto-oligossacarídeos (FOS) e isomalto-oligossacarídeos (IOS) (MENEZES; DURRANT, 2008).

Os xilo-oligossacarídeos são oligômeros de açúcar formados por unidades de xilose, que aparecem naturalmente em frutos, vegetais, leite e mel. Os XOS podem ser utilizados para várias finalidades, entre as quais destacam-se as aplicações nos alimentos e na indústria farmacêutica (VÁZQUEZ et al., 2005).

Para produção de XOS por enzimas, são necessários complexos enzimáticos contendo enzimas exo-xilanases e/ou β-xilosidases, para evitar a produção de xilose. Estas enzimas podem ser diretamente adicionadas para a reação, imobilizadas ou produzidas *in situ* por micro-organismos (BEG, 2001).

Um importante papel é atribuído a essas enzimas, pois as xilanases são inibidas por altas concentrações de seus produtos e uma das funções das β-xilosidases é diminuir esta inibição causada pela concentração de xilo-oligossacarídeos (ANDRADE et al., 2004; POLIZELI et al., 2005). As β-xilosidases têm sido caracterizadas em vários fungos e bactérias, mas pouco se conhece sobre a regulação de sua biossíntese (ANDRADE et al., 2004). Em fungos filamentosos, estas enzimas estão associadas ao micélio podendo ser detectadas também no extrato celular ou durante o crescimento. As β-xilosidases apresentam uma massa molecular de 60 a 360 kDa sendo geralmente glicoproteínas. Elas possuem pH ótimo entre 4,0 e 5,0, e as temperaturas ótimas podem variar entre 40ºC a 80ºC, dependendo do micro-organismo estudado (POLIZELI et al., 2005).

Outras atividades microbianas são capazes de afetar a conversão da xilana em seus constituintes. Estas enzimas agem cooperativamente, ocorrendo um sinergismo entre elas, os quais apresentam as seguintes atividades: α-L- arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) removem os resíduos de L-arabinose substituídos no carbono três (C3) das unidades de xilose (KANEKO et al., 1993; RIZZATTI, 2004); α-glucuronidases (EC 3.2.1.131) hidrolisam as ligações glicosídicas α-1,2 entre o ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico e resíduos de xilose em glucuronoxilano (ANDRADE, 2002; RIZZATTI, 2004); acetilxilana esterases (EC 3.1.1.6) removem grupos O-acetil a partir dos carbonos dois e/ou três (C2 e/ou C3) dos resíduos de xilose na acetilxilana (CAUFRIER et al., 2003; RIZZATTI, 2004; SHAO; WIEGEL, 1992); e os ácidos fenólicos esterases também podem estar presentes: ácido ferrúlico esterase (3.1.1.73) e o ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1) clivam na xilana as ligações éster entre resíduos de cadeia lateral de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido *p*-coumárico, respectivamente (POLIZELI et al., 2005; RIZZATTI, 2004).

3.3.2 Aplicação das xilanases

O interesse no estudo do complexo xilanolítico está relacionado ao seu emprego nos diversos processos biotecnológicos. Em alguns deles, há necessidade de enzimas purificadas, enquanto que, em outros, a conversão da xilana em xilose é feita por meio da utilização de extratos enzimáticos brutos.

Segundo Biely (1985), a aplicação da xilanase divide-se em duas categorias, uma associada à polissacaridases (por exemplo, celulases) e outra livre de celulase. Atualmente, uma das principais aplicações das xilanases e outras enzimas é no pré-branqueamento da polpa de celulose na indústria de papéis. Tradicionalmente são necessários dois processos para a obtenção de uma polpa de celulose pura: cozimento e branqueamento. O processo de cozimento mais importante é o kraft, que envolve o uso de sulfito, bissulfito e íons hidroxila para degradar a lignina da madeira, deixando-a solúvel no licor de cozimento (PATEL et al., 1993). Sob alta temperatura e pressão, 90 a 95 % da lignina é modificada ou solubilizada e o conteúdo das fibras se separa. A xilana é dissolvida no licor de cozimento devido à alta temperatura e pH. No entanto, à medida que o processo se desenvolve, a alcalinidade diminui e a xilana degradada precipita-se de forma mais ou menos cristalina sobre a celulose (BUCHERT et al., 1992). São realizadas algumas lavagens a fim de separar os rejeitos (nós de madeira e cavacos não cozidos), visando à limpeza da polpa e retirada do licor remanescente. Neste estágio as fibras são escuras, pois ainda contém lignina residual do cozimento.

Regulamentos ambientais têm restringido o uso de compostos clorídricos em processos de branqueamento nas indústrias de papel e celulose, assim a xilanase vem sendo utilizada em pré-branqueamentos como uma alternativa em tais processos (VIIKARI et al., 1994). Estes processos de pré-branqueamento reduziram o uso de compostos clorídricos em até 30%. Como resultado houve a diminuição de 15 % a 20 % na liberação de organoclorados nos efluentes das indústrias de papel (KULKARNI et al., 1999). Muitas indústrias do Canadá, Estados Unidos, Suécia e Finlândia estão usando xilanases nas sequências de branqueamento (ARAÚJO et al., 1999).

Existem algumas teorias que o tratamento com xilanases tem função de remover a xilana precipitada da superfície da polpa (ocorrida durante o cozimento), mas não totalmente esclarecida, a maneira exata ainda de como as xilanases agem nos processos de branqueamento (BENEDETTI, 2009).

Outra aplicação do complexo xilanolítico é no processamento de fibras vegetais, como o cânhamo ou o linho na indústria têxtil. O processo consiste na incubação de caules de

rami secos com xilanases que liberam fibras de celulose intactas que não necessitam da etapa de branqueamento (PRADE, 1995).

O uso desse complexo xilanolítico na produção de rações animais é importante no setor de agronegócios. As xilanases são componentes de formulação de ração animal, juntamente com glucanase, pectinase, celulase, protease, amilase, fitase, galactosidase e lipase. Elas quebram arabinoxilanas presentes na ração, reduzindo a viscosidade do material bruto. A arabinose encontrada na parede das células dos grãos tem efeito antinutricional para aves domésticas. Quando esses componentes encontram-se na forma solúvel, eles se possível elevam a viscosidade da ração ingerida interferindo na instabilidade e absorção de outros componentes. Se a xilanase é acrescentada na ração contendo milho e sorgo, ambos são alimentos de baixa viscosidade, ela melhora a digestão dos nutrientes na parte inicial do trato digestivo, resultando em melhoria no uso de energia. A ação conjunta com as glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases melhoram a digestibilidade da mistura alimentar (POLIZELI et al., 2005).

Na indústria alimentícia, como por exemplo, na panificação, as xilanases podem ser usadas junto com alfa-amilase que leva à produção de maltose, aumentando a maciez e a textura da massa e do miolo e mantendo o pão fresco por mais tempo. Já amilase maltogênica e a xilanase dão estabilidade à massa, enquanto a protease altera a elasticidade e a textura do glúten e melhora a cor e o sabor do pão (MUSSATTO et al., 2007). As xilanases vem sendo usadas sobre as arabinoxilanas, que representam 2 a 3% (m/m) da farinha de trigo, e absorvem cerca de 1/3 da água adicionada à massa, impedindo o desenvolvimento do glúten, reduzindo, assim o volume do pão e prejudicando a textura do mesmo. Assim, a aplicação de xilanases (arabinosidases) a farinha leva a liberação da água retida nas arabinoxilanas, melhorando o manuseio da massa e permitindo a obtenção de um produto final com maior volume, melhorando a estrutura de miolo e textura (CAMACHO; AGUILAR, 2003; HARBAK; THYGESEN, 2002; KULKARNI et al., 1999). Além disso, uma grande quantidade de arabinoxilooligossacarídeos pode ser benéfica à saúde, pois influência o funcionamento do intestino delgado, melhorando a digestão e absorção dos açúcares; protege contra as doenças cardiovasculares; previne de câncer colo retal e auxilia no aumento do bolo fecal e esvaziamento intestinal periódico nas evacuações (MENEZES; DURRANT, 2008). Nas fábricas de biscoitos, a xilanase é recomendada na fabricação de cream-crackers e waffer pois melhora a textura, palatabilidade e uniformidade (POLIZELLI et al., 2005).

As xilanases também são utilizadas na clarificação de sucos e vinhos (BIELY, 1985), na liquefação de frutas e mucilagem de café (WONG et al., 1988). Em 1930, quando

iniciou-se a fabricação de sucos de frutas cítricas o rendimento era pequeno, pois ocorria problema na sua filtração devido à turvação causada pelo amido. O conhecimento elevado dos constituintes químicos das frutas e o uso das enzimas microbianas ajudaram a resolver esse problema. Atualmente, xilanases em combinação com celulases, amilases e pectinases, provocam melhorias na liquefação das frutas e vegetais; na estabilização da polpa de fruta; na recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, cor dos alimentos e pigmentos; redução da viscosidade; hidrólise das substâncias que impedem clarificação física e química do suco, ou que podem causar escurecimento no concentrado (BENEDETTI, 2009).

Os avanços das técnicas de biologia molecular permitiram outras aplicações das xilanaseS. De acordo, com Ganga et al., (1999), uma levedura recombinante do vinho foi construída com gene para xilanase de *Aspergillus nidulans xlnA*, resultando em um vinho com melhor aroma de frutas que o convencional. Durante a fabricação da cerveja, a parede celular da cevada é hidrolisada permitindo a quebra do amido. Porém, há a liberação de longas cadeias de arabinoxilanas, que aumentam a viscosidade podendo deixar a cerveja turva. Assim, as xilanases auxiliam na solubilização das arabinoxilanas a oligossacarídeos menores, diminuindo sua viscosidade e, consequentemente, eliminando a turbidez da cerveja (DEBYSER et al., 1997; DERVILLY et al., 2002).

A xilanase e a xilana não são comumente usadas na indústria farmacêutica. A xilanase é empregada em conjunto com outras enzimas na forma de complexo enzimático (hemicelulases, proteases e outras) em suplementos alimentares, mas poucos produtos medicinais possuem essa formulação (POLIZELLI et al., 2005). Já os produtos da hidrólise da xilana, como a xilose, podem ser transformados em combustíveis líquidos (etanol), solventes e adoçantes artificiais de baixa caloria. A primeira etapa é a deslignificação da hemicelulose que é material rico em xilana, seguido da hidrólise pela ação das xilanases e hemicelulases, produzindo açúcares como a xilose. Na etapa seguinte os produtos são fermentados, principalmente por levedura (*Pichia stipitis* e *Candida shehatae*) produzindo xilitol ou etanol (SREENATH; JEFFRIES, 2000).

Entre os açúcares usados na produção do álcool etílico, a xilose representa 5% a 20%. Xilitol é um poliálcool com poder de adoçante comparado com a sacarose (PARAJÓ et al., 1998). É um adoçante não cancerígeno indicado para indivíduos obesos e diabéticos, recomendado para prevenção de osteoporose e infecções respiratórias, desordem do metabolismo de lipídios e lesões parenterais e rins. Uma variedade de produtos comerciais contendo xilitol, por exemplo, goma de mascar pode ser encontrada no mercado (POLIZELLI et al 2005).

Embora a hidrolise enzimática da xilana é método de obtenção da xilose, o atual xilitol comercial é produzido em larga escala por catálise química. Esse processo é considerado de alto custo, pois a xilose foi inicialmente purificada em várias etapas. Além disso, reações químicas frequentemente produzem produtos tóxicos na fermentação que são da decomposição do material lignocelulósico; também na liberação de açúcares, produtos podem ser formados da degradação da glicose (hidroximetilfurfural), xilose (furfural), e da estrutura da lignina (compostos aromáticos e fenólicos e aldeídos). Substâncias liberadas da estrutura da lignocelulose, como material de extração e ácido acético (isto é, terpenos e seus derivados, tropolones e compostos fenólicos como os flavonóides, quinonas, ligninas e taninos, ou corrosão dos equipamentos (ferro, cromo, níquel e cobre) podem ter poder inibidor da atividade microbiana (BENEDETTI, 2009; POLIZELLI et al, 2005).

O desenvolvimento de tecnologia mais apropriadas na produção de xilitol tem causado grande expectativa para o uso de indústrias de alimentos, farmacêuticas e odontológicas (POLIZELLI et al., 2005). Esses são alguns exemplos que mostram a contribuição das enzimas do complexo xilanolítico para diversas aplicações nos processos industriais.

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, quando estocadas ou durante o uso em processos industriais. Para que a catálise enzimática seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las de possível inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, o processo de imobilização em suportes sólidos tem sido desenvolvido para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (VILLENEUVE et al., 2000).

A utilização destas técnicas tem sido crescente nos últimos vinte anos e, com isso, novas informações teóricas e aplicações práticas estão surgindo (VILLENEUVE et al., 2000). O uso de biocatalisadores imobilizados também é crescente em escala industrial, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, entre outras (DALLA-VECHIA; NASCIMENTO, 2004).

3.4 PRODUÇÃO DE XILANASES

Xilanases são produzidas por uma grande variedade de micro-organismos, como bactérias, fungos, algas e protozoários (HALTRICH et al., 1996), porém poucos são os micro-organismos que possuem o sistema xilanolítico completo, ou seja, todas as enzimas necessárias para a completa degradação das heteroxilanas. Os bolores *Penicilllium*

capsulatum e o *Talaromyces ermersonni* são dois exemplos destes micro-organismos (GERBER et al., 1997).

As xilanases microbianas são as preferidas para os processos de hidrólise em virtude da sua especificidade, das condições suaves de reação, das poucas perdas de substrato e da sua biodegrabilidade. São produzidas por diferentes bactérias e fungos, como exemplo, *Trichoderma sp, Bacillus sp, Aspergillus sp, Penicillium sp, Aureobasidium sp e Talaromyces sp* (GERBER et al., 1997).

A procura por cepas fúngicas é maior pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, pois os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular (HALTRICH et al., 1996), e também, pela estabilidade e atividade em pH e temperatura extremos (KULKARNI et al., 1999). Por isso, a grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente são produzidas principalmente pelos bolores *Trichoderma sp* e *Aspergillus sp.* (LI et al., 2000; PANDEY et al., 2000), por outro lado os micro-organismos produtores dessas enzimas, para que possam ser aplicadas em alimentos, precisam ser considerados GRAS, o que muitas vezes não acontece com os bolores.

O amplo potencial de aplicação biotecnológico das enzimas xilanolíticas estimula principalmente pesquisas envolvendo micro-organismos xilanolíticos termofílicos e extremofílicos, pois estes produzem enzimas com maior estabilidade. Notadamente os fungos termofílicos compreendem: *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens, Humicola lanuginosa, H. grisea, Melanocarpus albomyces, Paecylomyces variotii, Talaromyces byssochlamydoides, Talaromyces emersonni, T. lanuginosus* e *Thermoascus aurantiacus* (POLIZELI et al., 2005).

Substratos lignocelulósicos como sabugo de milho, farelo de aveia, farelo de arroz, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar têm se mostrado eficientes indutores para a produção de enzimas xilanolíticas por alguns fungos como *Aspergillus awamori, Penicillium purpurogenum, H. grisea*, entre outros (BEG et al., 2001; CARVALHO; FURTADO, 2003; DE PAULA et al., 1998; FARIA, 2000; HALTRICH et al., 1996; MORAES et al., 2002). O bagaço de cana-de-açúcar é o principal sub-produto da indústria açucareira e contém aproximadamente 40% de celulose, 24% de hemicelulose e 25% de lignina. Devido a sua abundante disponibilidade, ele pode servir como o substrato ideal para processos microbianos na obtenção de produtos de maior valor agregado (PANDEY et al., 2000).

Os meios de cultura utilizados para a produção de endoxilanases por fungos contém, além do substrato indutor, sais minerais (KH_2PO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$, NH_4^+ ou de NO_3^-),

íons metálicos (Fe_2^+, CO_2^+, Zn_2^+) e complexas fontes de nitrogênio orgânico, que são mais eficientes para a produção de endoxilanases do que fontes inorgânicas. De uma forma geral a produção de endoxilanases encontra-se relacionada ao controle nutricional dos micro-organismos. O crescimento de um micro-organismo em uma fonte de carbono favorável, como a glicose, reprime a síntese de enzimas requeridas para o metabolismo de fontes de carbono alternativas, como a xilana, reprimindo a produção das endoxilanases. Assim a presença de glicose no meio de cultura reprime a síntese das enzimas xilanolíticas pelo mecanismo de repressão catabólica, o que pode ocorrer por inibição da transcrição ou por exclusão dos indutores destas enzimas durante o transporte através da membrana da célula (KULKARNI et al., 1999).

A regulação da indução e secreção de endoxilanases pelos micro-organismos não é completamente entendida. Uma vez que a xilana é incapaz de entrar na célula microbiana, a produção de endoxilanases é induzida inicialmente por fragmentos de xilana de baixa massa molecular (FXBMM) como a xilose, xilobiose, xilotriose, resultante da ação de uma pequena quantidade de endoxilanase produzida constitutivamente e secretada para o meio. Para a indução da produção de endoxilanases pelos fragmentos de baixa massa molecular há duas possíveis explicações baseadas nos relatos de Gomes e colaboradores (1994), Wang e colaboradores (1992) e Zhao e colaboradores (1997). Uma das explicações é que os FXBMM formados pela hidrólise da xilana são diretamente transportados para dentro da matriz celular. Em seguida, esses oligômeros são degradados pela β-xilosidase intracelular que libera resíduos de xilose. Este conceito é apoiado pela ocorrência universal de β-xilosidases intracelulares em micro-organismos. A outra possibilidade é que os oligômeros são hidrolisados em monômeros durante seu transporte através da membrana celular para dentro da matriz celular (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

A regulação por nitrogênio (repressão catabólica por nitrogênio) é um mecanismo para prevenir ou reduzir a capacidade das células de formar enzimas ou permeases para a utilização de compostos que não são as fontes preferenciais de glutamato e glutamina quando uma fonte preferencial de nitrogênio está disponível. Em ensaios realizados por Kalogeris et al., (1998), foi observado que a utilização de fontes de nitrogênio inorgânico, principalmente o sulfato de amônia, aumentou significativamente a atividade xilanolítica. Lemos et al. (2001) analisaram a influência de diversas fontes de nitrogênio na produção de enzimas xilanolíticas por *A. awamori* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar, e obtiveram altas atividades para endoxilanases utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e, ainda maiores quando utilizando também extrato de levedura. Em estudo realizado por Monti

(1989), foi verificado que a adição de 0,8 % de extrato de levedura aumentou significativamente a produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo *H. grisea*. Carvalho (2003) observou aumento de aproximadamente quatro vezes na produção de endoxilanases quando o fungo *H. grisea* foi cultivado em meio contendo extrato de levedura e sulfato de amônia, comparado ao meio sem suplementação.

Outros importantes fatores que afetam a produção das endoxilanases são: pH, temperatura e aeração. Cada organismo se desenvolve e produz endoxilanases em uma faixa de pH ótimo, assim, cultivando o organismo em pH desfavorável, ocorrerá diminuição na taxa de crescimento, resultando em queda na produtividade de endoxilanases (HALTRICH et al., 1996). A temperatura do meio de crescimento é um fator muito importante a ser levado em consideração durante o cultivo de fungos, pois cada micro-organismo tem sua faixa de temperatura ótima, na qual irá se obter a maior taxa de crescimento e melhor produtividade de endo-xilanases (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

Para maximizar a produção das enzimas é necessário o estudo dos efeitos das condições operacionais tais como temperatura, velocidade de agitação, aeração, e outros parâmetros de processo, incluindo crescimento do micro-organismo, oxigênio dissolvido, pH e substratos (ALVES et al., 2010; NOR et al., 2001).

A atividade xilanolítica geralmente é maior em bolores do que em bactérias (GERBER et al., 1997) e o maior número de trabalhos sobre a produção de xilanases é com este tipo de micro-organismos. Haapala et al., (1994) relataram que quando o bolor *Trichoderma reesei* foi cultivado, máxima atividade encontrada para endo-xilanase foi de 3350 $U.mL^{-1}$. Pirota et al., (2015) isolaram bolores da região Amazônica e cultivaram os mesmos em farelo de trigo, no qual *Aspergillus orizae* apresentou a maior atividade de endo-xilanase (1076,94 $U.g^{-1}$ em 72h). Medeiros et al., (2003) produziram xilanases com fungos isoladas da floresta amazônica.

A produção de xilanases já foi extensivamente reportada em bactérias (BOCCHINI et al., 2002; ; HECK et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2002; TECHAPUN et al., 2002). Nascimento et al. (2002) isolaram diversas linhagens de *Streptomyces sp.* produtores de xilanases de solos do cerrado brasileiro. Sá-pereira et al. (2002) relataram a produção de xilanases em meio submerso por *Bacillus subtillis* isolados de águas termais em Portugal. Archana e Satynarayana (1997) relataram a produção de xilanases em cultivo semi sólido por *Bacillus licheniformis* A99 usando farelo de trigo como substrato.

De acordo com Techapun et al. (2003), a produção de xilanases em cultivos é regida por poucos parâmetros-chaves, além daqueles normalmente envolvidos no processo.

Quando o cultivo é conduzido empregando-se substratos heterogêneos, vários fatores apresentam efeito combinado no nível de expressão enzimática. Entre eles incluem-se a acessibilidade ao substrato, taxa e quantidade de liberação de xilo-oligossacarídeos e sua natureza química e a quantidade de xilose liberada, a qual atua como fonte de carbono para o micro-organismo e como inibidor da síntese de enzima na maioria dos casos (KULKARNI et al., 1999).

Gokhale et al, (1998) reportaram que as xilanases tendem a ligar-se fortemente aos substratos. Nesses casos, uma parte da enzima produzida durante o cultivo é perdida na forma de enzima ligada ao substrato insolúvel. Além disso, outras enzimas metabólicas, como proteases e transglicosidases, também agem sobre a enzima, diminuindo a produtividade. Estas enzimas são normalmente expressas ao final da fase exponencial de crescimento do micro-organismo.

Assim, são encontrados na literatura estudos sobre diferentes variáveis, como fonte de carbono, nitrogênio, pH, temperatura, aeração e agitação, consideradas importantes na produção das enzimas xilanolíticas. No entanto, observa-se através dos trabalhos realizados a carência do uso de leveduras para a produção das enzimas do complexo xilanolítico.

3.5 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

A seleção de micro-organismos produtores de enzimas do complexo xilanolítico constitui uma etapa importante em processos biotecnológicos, nos quais estas enzimas podem ser empregadas (POLIZELI et al., 2005).

O isolamento e seleção de micro-organismos é hoje uma das mais importantes atividades da microbiologia industrial, pois possibilita a descoberta de micro-organismos com alto potencial para a produção de bens de interesse da indústria química, alimentícia, farmacêutica e agrícola.

O crescente aumento das pesquisas na área da enzimologia tem estimulado a descoberta de novos micro-organismos a fim de aumentar a produtividade, a especificidade e a estabilidade das enzimas (GEOK et al., 2003). Além disso, há uma crescente necessidade de abordagens mais seletivas e menos imediatas do uso dos recursos naturais do planeta, o que vem impulsionando o avanço dos processos biotecnológicos (ZANOTTO et al., 2007).

Micro-organismos produtores de enzimas são encontrados em diversos habitats, como em rejeitos de indústrias de processo de óleos vegetais e de laticínios, solos, sementes, frutos e alimentos apodrecidos (SHARMA et al., 2001). Os alimentos possuem uma grande

população microbiana de onde se podem isolar estes micro-organismos e avaliar a sua capacidade para a produção enzimática (KO; WANG; ANN, 2005).

Existem alguns estudos realizados utilizando leveduras silvestres produtoras de enzimas como: Maugeri e Hernalsteens (2007) que selecionaram leveduras obtidas de frutas e flores (a partir de florestas tropicais do Brasil), capazes de secretar enzimas extra-celulares com atividade frutosiltransferase (FTA). Os procedimentos de triagem e isolamento resultaram em quatro cepas de leveduras potencialmente interessantes: *Candida sp*. (LEB-I3), *Rhodotorula sp.* (LEB-U5.), *Cryptococcus sp*. (LEB-V2) e *Rhodotorula sp*. LEB-V10.

Motta (2008) isolou leveduras silvestres de diversas regiões do Brasil visando a produção de xilanases. De 349 micro-organismos analisados foram obtidas 84 cepas produtoras, porém somente 37 possuíam índice de relação enzimática maior que 2,5. Destas 9 cepas obtiveram crescimento satisfatório em meio líquido a 30 ºC e 150 rpm. Dentre estes, os micro-organismos AAD5 e AY 10 se destacaram por apresentarem atividade enzimática de 2 µmol/mL.min.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por encontrar novos micro-organismos com potencial biotecnológico, representada pela etapa inicial de seleção, não se restringe apenas ao isolamento de linhagens que possam ser posteriormente melhoradas para otimização da produção, mas também a busca de micro-organismos responsáveis por características interessantes industrialmente.

Estudos da enzima xilanase têm merecido destaque devido ao potencial de aplicações nas indústrias em geral e principalmente nas alimentícias. Assim sendo, se torna cada vez mais necessária à execução de trabalhos de pesquisa relacionados à maximização da produção dessas enzimas por diferentes micro-organismos, principalmente leveduras, uma vez que a produção de xilanases por micro-organismos, estende-se à utilização, principalmente, de bactérias e bolores, havendo poucos relatos acerca da utilização de leveduras.

CAPITULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1: SCREENING DE LEVEDURAS COM CAPACIDADE DE PRODUZIR XILANASES LIVRES DE CELULASES

SCREENING DE LEVEDURAS COM CAPACIDADE DE PRODUZIR XILANASES LIVRES DE CELULASES

RESUMO

Xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise das xilanas, e têm sido em grande parte, obtidas a partir de bolores e bactérias, sendo que na literatura existem poucos estudos sobre a produção destas enzimas por leveduras. O presente estudo teve como objetivo isolar leveduras de diferentes fontes, tais como vegetais, grãos de cereais, frutas e resíduos agroindustriais com capacidade de produzir enzimas xilanolíticas. As amostras foram enriquecidas em Caldo Extrato de Malte e Levedura e isoladas em Agar Nutriente Wallerstein. As leveduras foram avaliadas em termos da sua capacidade para degradar xilana através da capacidade das mesmas degradarem o polissacarídeo do meio e produzir halos de hidrólise, os quais foram visualizados através do uso do corante vermelho congo e lavados com diferentes concentrações de soluções salinas. Os micro-organismos selecionados foram crescidos em meio complexo líquido e as atividades enzimáticas de endoxilanase, β-xilosidase, carboximetilcelulase, celulase total, pH e concentração de biomassa foram avaliados ao longo de 96 h de cultivo. Dentre as leveduras estudadas, sete foram selecionadas, e a levedura 18Y foi a que apresentou a maior atividade de endo-xilanase (2,7 $U.mL^{-1}$), sendo esta isolada a partir de chicória e identificada como *Cryptococcus laurentii*. Esta levedura apresentou capacidade de produzir xilanase com baixos níveis de celulase, um fator que lhe concede grande potencial uma vez que esta enzima pode ser usada, além das aplicações em alimentos, também para branqueamento industrial e polpa de papel .

Palavras-chave: *Cryptococcus laurentii*, endo-xilanase, xilana.

1 INTRODUÇÃO

Xilana, principal componente do complexo da hemicelulose, é um polissacarídeo encontrado na parede celular vegetal, formado por resíduos xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas do tipo β-1,4-(FIORI, 1997). Um complexo de enzimas é responsável pela hidrólise completa da xilana, onde as principais enzimas são endo-1,4-β-xilanase e β-xilosidase (POLIZELI et al., 2005). As endo-xilanases atacam a cadeia principal liberando

xilo-oligossacarídeos enquanto que as β-xilosidase atacam os xilo-oligossacarídeos formados originando resíduos de xilose (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

Endo-1,4-β-xilanase e β–xilosidases são divididas em duas categorias: uma que está associada com polissacaridases (por exemplo, celulases) e a outra que é livre de celulases (BIELY, 1985). A primeira é utilizada para a produção de hidrolisados de alimentos e no processamento de bebidas (SREENATH et al., 1996), além de serem aplicadas em rações animais, a fim de reduzir a viscosidade e melhorar a digestibilidade dos nutrientes (AHMAD et al., 2013; MATHLOUTHI; MOHAMED; LARBIER, 2003; VIANA et al., 2011) e em edulcorantes artificiais, tais como xilitol (PARAJÓ et al., 1998) . As xilanases livres de celulases são utilizadas para o branqueamento do papel e de fibras vegetais (DAMIANO; SILVA, 2003; SHANGI et al., 2009).

Estas enzimas podem ser produzidas por bolores, bactérias, leveduras, algas marinhas, entre outros, mas a sua principal fonte comercial são bolores (POLIZELI et al., 2005). As xilanases obtidas de fungos são geralmente associados com a produção de celulases (STEINER et al., 1987), o que pode não ser desejável, dependendo da aplicação da enzima. Os sistemas xilanolíticos na grande maioria, são obtidos a partir de bolores (ADESINA; ONILUDE, 2013; CASCAIS; SILVEIRA; FERREIRA-FILHO, 2001 RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2002) e bactérias (CHAVEZ et al, 2006; RAJAGOPALAN et al., 2013) , na literatura existem poucos estudos sobre a produção desta enzima por levedura (KUMAR, 2007; LOPES et al., 2011; MALABADI; RAGHAVENDRA; PETRESCU et al., 2000). Até o presente momento, não se tem nenhum conhecimento de estudos sobre a produção de celulases hidrolíticas (CMCase e FPase) e β-xilosidase associados à produção de xilanases por leveduras apenas para fungos filamentosos (BENASSI et al., 2012; GOTTSCHALK et al., 2013; LEMOS; PEREIRA, 2013).

Com base na importância de isolar cepas de leveduras capazes de produzir xilanase a fim de contribuir para o conhecimento da biodiversidade e seus possíveis usos para sintetizar produtos de interesse, este estudo teve como objetivo isolar leveduras de alimentos e resíduos capazes de produzir xilanase livre de celulases.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

Para o isolamento das leveduras foram usadas amostras de vegetais, frutas e resíduos agroindustriais, onde 2,5 g de cada amostra foi inoculada em 25 mL de Caldo Extrato de Malte e Levedura (YM) composto por: 3 $g.L^{-1}$ extrato de malte, 3 $g.L^{-1}$ extrato de levedura, 5 $g.L^{-1}$ peptona e 10 $g.L^{-1}$ glicose; incubadas a 25 ºC por 72 h a 150 rpm (MAUGERI, 2007) para realizar o enriquecimento.

As culturas foram estriadas em placas de Petri contendo Ágar Nutriente Wallerstein (WLN) composto por: 4 $g.L^{-1}$ extrato de levedura; 5 $g.L^{-1}$ caseína; 50 $g.L^{-1}$ glicose; 550 $mg.L^{-1}$ KH_2PO_4; 125 $mg.L^{-1}$ KCl; 250 $mg.L^{-1}$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 2.5 $mg.L^{-1}$ $FeCl_3$; 2.5 $mg.L^{-1}$ $MnSO_4$; 22 $mg.L^{-1}$ verde de Bromocresol e; 20 $g.L^{-1}$ ágar. As culturas foram incubadas a 25ºC por 72 h.

As colônias isoladas foram transferidas individualmente e mantidas em Ágar GYMP (20 $g.L^{-1}$ glicose; 5 $g.L^{-1}$ extrato de levedura; 10 $g.L^{-1}$ extrato de malte; 2 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4 e 20 $g.L^{-1}$ ágar) a 4 °C em tubos inclinados (MAUGERI; HERNALSTEENS, 2007).

2.2 SELEÇÃO DAS LEVEDURAS

Para selecionar as leveduras com capacidade de degradar xilana, dois métodos foram testados: método 1 (WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2002) o qual usa apenas xilana no meio como fonte de carbono (2 $g.L^{-1}$) e ágar (17 $g.L^{-1}$); e o método 2 (LOPES et al., 2011) que usa um meio contendo 10 $g.L^{-1}$ xilana, 0,6 $g.L^{-1}$extrato de levedura, 7,0 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 2,0 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4, 0,1 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$, 1,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$ e 15 $g.L^{-1}$ ágar.

Cada levedura foi transferida do ágar GYMP para os respectivos meios estudados através de repique puntual sendo as placas incubadas a 30 °C durante 72 h. Os halos de degradação produzidos ao redor das colônias das leveduras foram visualizados através do corante Vermelho de Congo, o qual foi lavado com soluções de diferentes concentrações de cloreto de sódio. O diâmetro dos halos de degradação e das colônias foram determinados em mm e o índice enzimático (IE) foi calculado através da equação 1:

$$IE = \frac{diâmetro\ da\ zona\ de\ hidrólise}{diâmetro\ da\ colônia} \quad (1)$$

As cepas que apresentaram IE maior que 1,0 foram consideradas como potenciais produtoras de xilanases pelo método 1 (WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2002), enquanto que pelo método 2 as cepas deveriam apresentar IE maior que 2,5 (LOPES et al., 2011).

2.3 PRODUÇÃO DE XILANASE EM CULTIVO SUBMERSO

As culturas foram inoculadas para crescimento em meio contendo 10,0 $g.L^{-1}$ de xilana de Beechwood, 3,0 $g.L^{-1}$ extrato de levedura, 7,0 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 2,0 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4, 0,1 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$, 1,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)SO_4$ e 5,0 $g.L^{-1}$ peptona em pH 6.0. A esterilização do meio foi realizada a 121 °C durante 15 min. O inóculo foi cultivado em frascos erlenmeyer (500 mL de capacidade) contendo 150 mL de meio de cultivo durante 24 h a 150 rpm e 30 °C em agitador orbital (LOPES et al., 2011).

Os cultivos foram iniciados através de uma suspensão celular (10^8 células. mL^{-1}) obtida do inóculo com 24 h, e a esterilização dos meios foi conduzida conforme descrito anteriormente. O cultivo foi realizado nas mesmas condições de temperatura e agitação descritas para o inóculo porém durante 96 h. Em intervalos de tempo apropriados, amostras dos cultivos foram retiradas para determinação das atividades enzimáticas (endo-xilanase, CMCase, FPase e β-xilosidase), concentração celular e pH.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Determinações enzimáticas

A atividade de endo-xilanase foi determinada usando 1% (m/v) de xilana de *Beechwood* como substrato. A reação ocorreu usando 0,9 mL do substrato e 0,1 mL de extrato enzimático durante 5 min a 50º C conforme descrito por Bailey et al. (1992). A quantificação dos açúcares redutores liberados a partir da xilana foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959) correlacionada com curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de xilose por minuto nas condições descritas do ensaio.

A atividade de β-xilosidase foi determinada através do substrato *p*-nitrofenil-*b*-D-xilopiranosídeo (*p*NPX) liberando *p*-nitrofenol. O meio reacional continha 0,8 mL de *p*NPX (0,1% m/v) e 0,2 mL de extrato enzimático, a reação foi conduzida por 30 min a 50ºC (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987). A reação foi interrompida adicionando 2 mL de carbonato de

sódio (10% m/v). O *p*-nitrofenol liberado pela ação da β-xilosidase foi determinado espectrofotometricamente em 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a liberação de 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto.

A atividade de celulases foi determinada para Carboximetilcelulase (CMCase) e atividade total (FPase). CMCase foi determinada de acordo com metodologia descrita por Ghose (1989) onde o meio reacional é composto por 0,5 mL de substrato (solução de 2% de carboximetilcelulase) e 0,5 mL de extrato enzimático, sendo mantidos por 30 min a 50ºC. A quantificação dos açúcares redutores liberados, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959) e correlacionada com curva de glicose. A atividade de celulases sob o substrato papel filtro foi conduzida conforme descrito por Ghose (1989) onde o meio reacional continha 0,5 mL de extrato enzimático, 1,0 mL de tampão citrato de sódio (pH 5,3) e 50 mg de papel filtro Whatman nº1 sendo a reação mantida por 60 min a 50ºC. Uma unidade enzimática foi definida como 1 µmol de glicose liberado por minuto nas condições dos ensaios.

Para a determinação de todas as atividades enzimáticas foram conduzidos ensaios com brancos para as enzimas (enzima + tampão) e brancos para os substratos (tampão+ substrato) sendo estes valores subtraídos das atividades encontradas. Todas as determinações de atividades foram realizadas em triplicata.

2.4.2 Determinação de biomassa

A concentração de biomassa foi estimada através da medida de absorvância em espectrofotômetro a 620 nm e relacionando as leituras da biomassa, com as respectivas curvas de calibração de biomassa seca (RECH et al., 1999).

2.4.3 Determinação de pH

Para determinação do pH foram utilizados os meios de cultivo centrifugados e livres de células, os quais foram determinados em pHmetro digital.

2.4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos determinados para cada curva de cresciemento foram: concentração máxima de biomassa (X_{max}, $g.L^{-1}$), velocidade específica de crescimento (μ_{max}, $1.h^{-1}$) e produtividade enzimática (P, $U.mL^{-1}.h^{-1}$) para cada levedura selecionada, crescida em meio líquido.

A taxa de crescimento máxima específica (μ_{max}) foi calculada segundo Equação 2 através da regressão exponencial da porção logarítimica da curva de crescimento (BAILEY; OLLIS, 1986) enquanto que a produtividade enzimática foi calculada através da Equação 3 para o máximo de atividade encontrada, de acordo com Schmidell et al. (2001):

$$\mu = \frac{1}{X}\frac{dx}{dt} \quad (2)$$

$$P = \frac{A - A_0}{t - t_0} \quad (3)$$

Onde μ é a taxa de crescimento específico (h^{-1}) e X é a concentração de biomassa ($g.L^{-1}$), A_o é a produção enzimática inicial, A é a atividade de endo-xilanase no tempo de retirada da amostra, t é o tempo de cultivo em que a atividade máxima da enzima ocorre e t_0 é o tempo inicial do cultivo .

2.5 IDENTIFICAÇÃO DA LEVEDURA

Apenas a levedura que produziu maior atividade de endo-xilanase foi identificada. A identificação foi baseada no sequenciamento dos domínios D1/D2 da grande subunidade do gene de rRNA. Os domínios D1/D2 foram amplificados por PCR, diretamente a partir de células inteiras, como descrito por Lachance et al., (1999). A sequenciação do DNA foi efetuada em analisador ABI 3130 automatizado de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram montadas, editadas e alinhadas usando o programa MEGA6 (Tamura et al. , 2013). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas incluídas na base de dados GenBank utilizando "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST at http:// www.ncbi.nlm.nih.gov). A identificação foi realizada no Laboratório de Taxonomia da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram avaliados estatisticamente através de análise de Variância e teste de Tukey a um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$), usando o programa *Statistica* 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Cento e dezenove cepas de leveduras foram isoladas a partir de diferentes tipos de amostras, a fim de obter micro-organismos capazes de produzir enzimas xilanolíticas. Essas cepas, que foram capazes de degradar xilana presente no meio e preencheram os critérios de ambos os métodos, foram selecionadas. Os resultados foram expressos por halos de hidrólise e reveladas pela adição de corante vermelho do Congo (Apêndice 1).

Entre as cepas testadas, vinte e três foram capazes de hidrolisar xilana (Apêndice 2), mas uma vez que tinha sido estabelecido que os micro-organismos deviam respeitar os resultados indicados por ambos os métodos, apenas sete foram selecionadas. Os resultados obtidos nos testes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Relação halos de degradação enzimática obtidos através de leveduras isoladas

Cepa	**Amostra**	**Relação halos (>1,0) Método 1**	**Relação halos (>2,5) Método 2**
13Y	Tomate	6,0	4,0
18Y	Chicória	3,0	3,0
19Y	Chicória	2,3	2,5
34Y	Tomate	3,0	3,5
40Y	Sabugo de milho	2,0	2,7
53Y	Tomate	2,5	3,0
60Y	Chicória	4,0	2,5

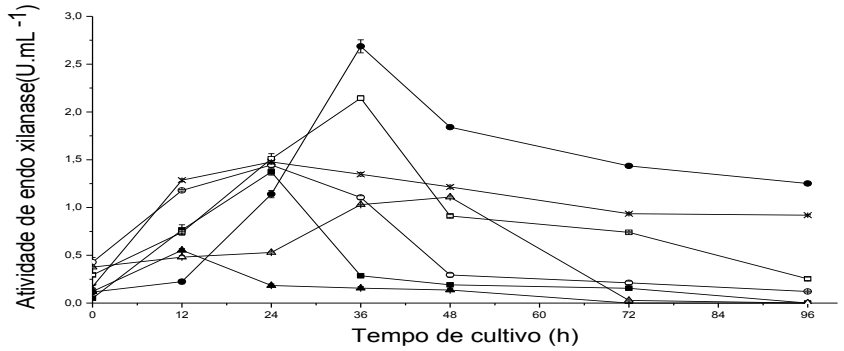
Neste estudo, 6 % dos micro-organismos mostraram resultados positivos frente à produção de xilanase em ambos os métodos avaliados. Os resultados foram considerados promissores, uma vez que eles são semelhantes aos descritos por Rao et al. (2008) e Lopes et al. (2011).

O índice enzimático é um parâmetro semi quantitativo utilizado para avaliar a capacidade de micro-organismos produzirem enzimas em meio sólido, tem sido utilizado por muitos autores (ADESINA; ONILUDE, 2013; FLORENCIO; COURI; FARINAS, 2012; NAGAR, 2012; RIBEIRO et al., 2014; SAMANTA et al., 2011; TALLAPRAGADA;VENKATESH, 2011), que consideraram um método eficiente de triagem.

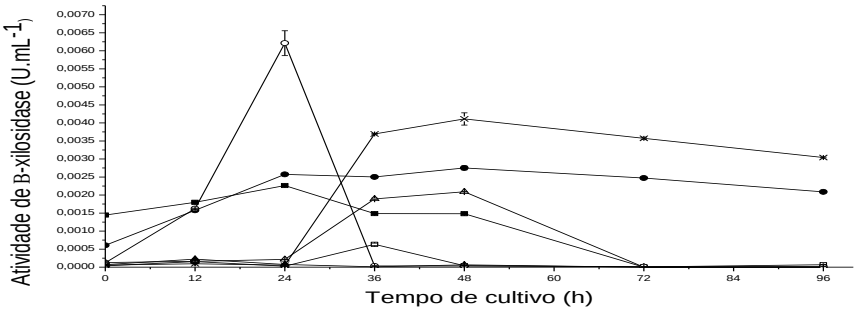
A próxima etapa de seleção foi realizada para verificar a capacidade das leveduras de produzirem a enzima xilanolitica em cultivos submeros. Foi realizado o acompanhamento da atividade da enzima endo-xilanase para as sete leveduras em estudo (Figura 1a) na qual destacou-se a 18Y que apresentou a maior atividade xilanolítica (2,7 $U.mL^{-1}$), seguida pela 34Y (2,1 $U.mL^{-1}$), após 36 h de cultivo. A levedura 19Y apresentou a menor capacidade (0,5 $U.mL^{-1}$) de produzir endo- xilanase quando cultivada no meio à base de xilana. Esta levedura, porém foi a que apresentou o pico de atividade no menor tempo (12 h), seguido da levedura 13Y, que necessitou de 24 h para atingir o seu máximo de atividade enzimática. A levedura 40Y precisou de mais tempo (48 h) para atingir o seu máximo em comparação com as outras leveduras em estudo, as quais tinham seu máximo de produção em até 36 h de cultivo, mas em seguida houve uma diminuição significativa em sua atividade após 48 h de cultivo. A única exceção foi à levedura 60Y, uma vez que não apresentou diminuição significativa na sua atividade.

β-xilosidases catalisam a liberação de unidades de xilose a partir de xilo-oligossacarídeos derivados da degradação da xilana; assim, a sua presença pode ser insatisfatória quando o objetivo é a obtenção de xilo-oligossacarideos (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2000). Portanto, os baixos níveis de β-xilosidases produzidos pela levedura 18Y (0,003 $U.mL^{-1}$) e levedura 34Y (0,0006 $U.mL^{-1}$) podem ser considerado um fator positivo . Baixas atividades, semelhantes às encontradas neste estudo (Figura 1b), também foram relatadas na literatura por Biely (1980) e Bastawde, Puntambekar, Gohkale (1994), que obtiveram valores inferiores a 0,1 $U.mL^{-1}$ para β-xilosidase quando foram realizados cultivos com leveduras , como por exemplo , *Cryptococcus* e NCIM 3574 (isolados a partir de madeira em decomposição). No entanto, quando os cultivos foram conduzidos com bolores, os níveis de β-xilosidase tendem a ser mais elevados, conforme relatado por Lemos (2000). Este autor descreveu a produção de β-xilosidase, cuja atividade foi de 1,3 $U.mL^{-1}$, quando o *Aspergillus awamori* foi cultivado em meio contendo bagaço de cana-de- açúcar.

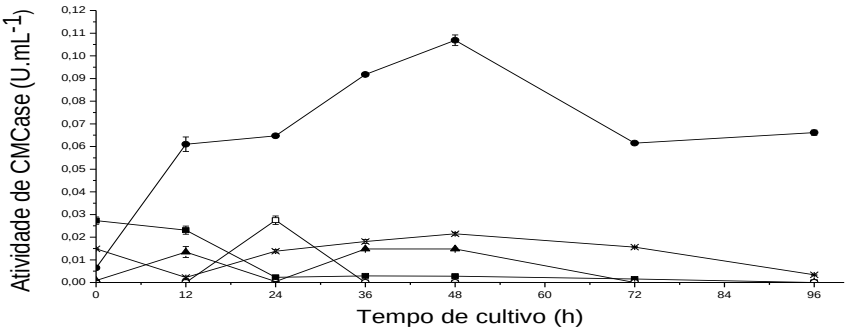
Figura 1: Atividades de endo-xilanase (a), β-xilosidase (b), CMCase (c) e FPase (d), obtidas por leveduras isoladas e cultivadas em meio complexo, contendo xilana como fonte de carbono, onde: (■)13Y; (●)18Y; (▲)19Y; (□)34Y; (Δ) 40Y; (o) 53Y e (×)60Y.



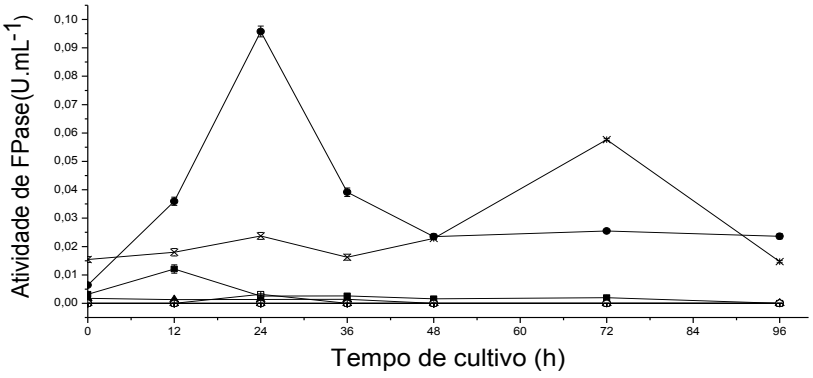
(a)



(b)



(c)



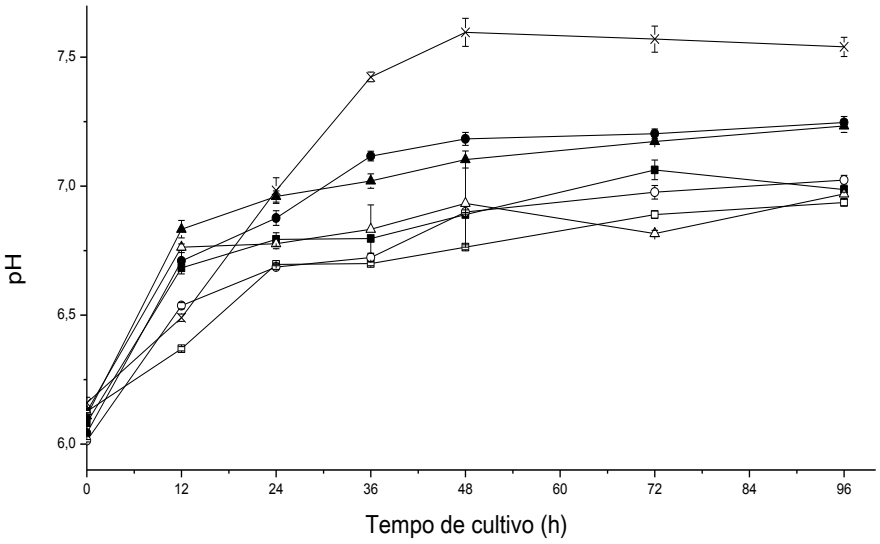
(d)

Benassi et al. (2012) isolaram a partir de cana de açúcar em decomposição o fungo *Aspergillus phoenicis* o qual foi cultivado usando flocos de milho como substrato indutor obtendo uma atividade de β-xilosidase de 0,36 $U.mL^{-1}$ e quando utilizada farinha de mandioca a atividade foi de 0,66.mL^{-1}.

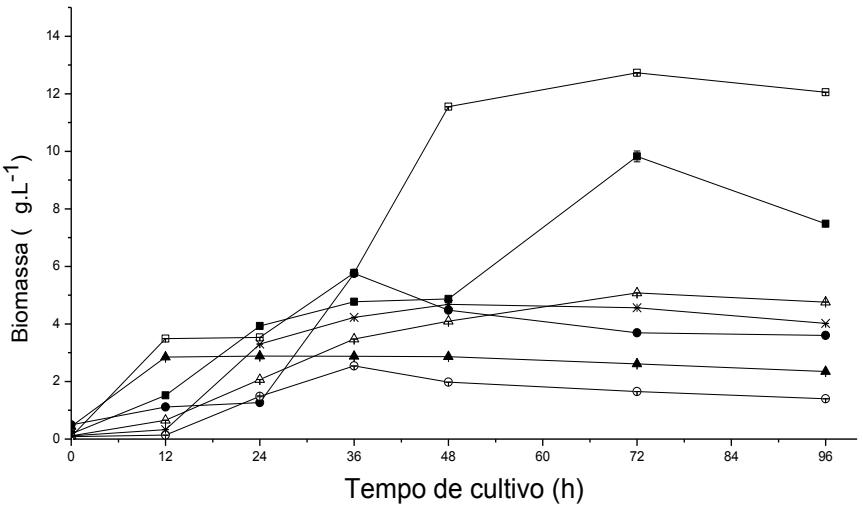
A produção de celulases (CMCase e FPase) foi extremamente baixa, já que todas as atividades das leveduras foi menor do que 0,11 $U.mL^{-1}$. Portanto, as xilanases produzidas pelas leveduras em estudo podem ser aplicadas nas indústrias têxteis (degomagem de fibras naturais), celulose e indústrias de papel. Os valores de celulase encontrados neste estudo (Figuras 1c e 1d) estão de acordo com os resultados de xilanase livre de celulase (0,02 $U.mL^{-1}$ para CMCase e FPase) de *Thermomyces lanuginosus* relatado na literatura por Mendoza (2006). Boddireddy e Charya (2011) obteve xilanase livre de celulase a partir de diferentes espécies de fungos isolados cujas medidas de atividade de CMCase apresentaram valores de 0,1 a 0,6 $U.mL^{-1}$ quando foram produzidas em cultivos submersos. Alves-Prado (2010) cultivou uma cepa de *Lysinibacillus sp.* P5B1 em cultivos submersos contendo xilana para produzir endo-xilanase e relatou atividade para CMCase de 0,58 $U.mL^{-1}$.

O pH dos meios variaram de 6,0 a 7,2 (Figura 2a) durante o cultivo das leveduras visando a produção de xilanase . A única exceção foi a levedura 60Y a qual seu pH inicial era de 6,2 , mas atingiu 7,6 após 96 h . As leveduras 18Y e 34Y atingiram produção máxima da enzima dentro das primeiras 36 h de cultivo em pH 7,1 e 6,7 respectivamente. Lopes et al. (2011) produziram xilanase em meio com xilana a partir de leveduras ambientais isoladas. Os autores observaram que as leveduras LEB-AY 10 e LEB-AAD5 alcançaram suas atividades enzimáticas máximas quando o pH foi cerca de 6,5 .

Figura 2: pH (a) e biomassa (b) de leveduras isoladas e cultivadas em meio contendo xilana como fonte de carbono, onde: (■)13Y; (●)18Y; (▲)19Y;(□) 34Y; (Δ) 40Y; (o) 53Y e (×) 60Y.



(a)



(b)

Em relação à produção de biomassa (Figura 2b), a levedura 34Y foi a que mais se destacou em termos de crescimento celular, uma vez que atingiu 12,27 $g.L^{-1}$. A levedura 18Y apresentou o seu pico máximo de atividade de endo-xilanase (2,7 $U.mL^{-1}$), coincidindo com o máximo da produção de biomassa (5,75 $g.L^{-1}$), que ocorreu após 36 h de cultivo.

O X_{max} encontrado para as leveduras em estudo (Tabela 2) variaram entre 2,54 $g.L^{-1}$ (levedura 53Y) e 12,27 $g.L^{-1}$ (levedura 34Y), enquanto que aprodutuvidade variou em uma faixa de 0,015 $U.mL^{-1}.h^{-1}$ (levedura 53Y) a 0,07 $U.mL^{-1}.h^{-1}$ (levedura 18Y). A

velocidade específica de crescimento máxima foi de 0,23 h^{-1} obtida pela levedura 53Y enquanto que a levedura 34Y foi a mais baixa, com valores de 0,05 h^{-1}.

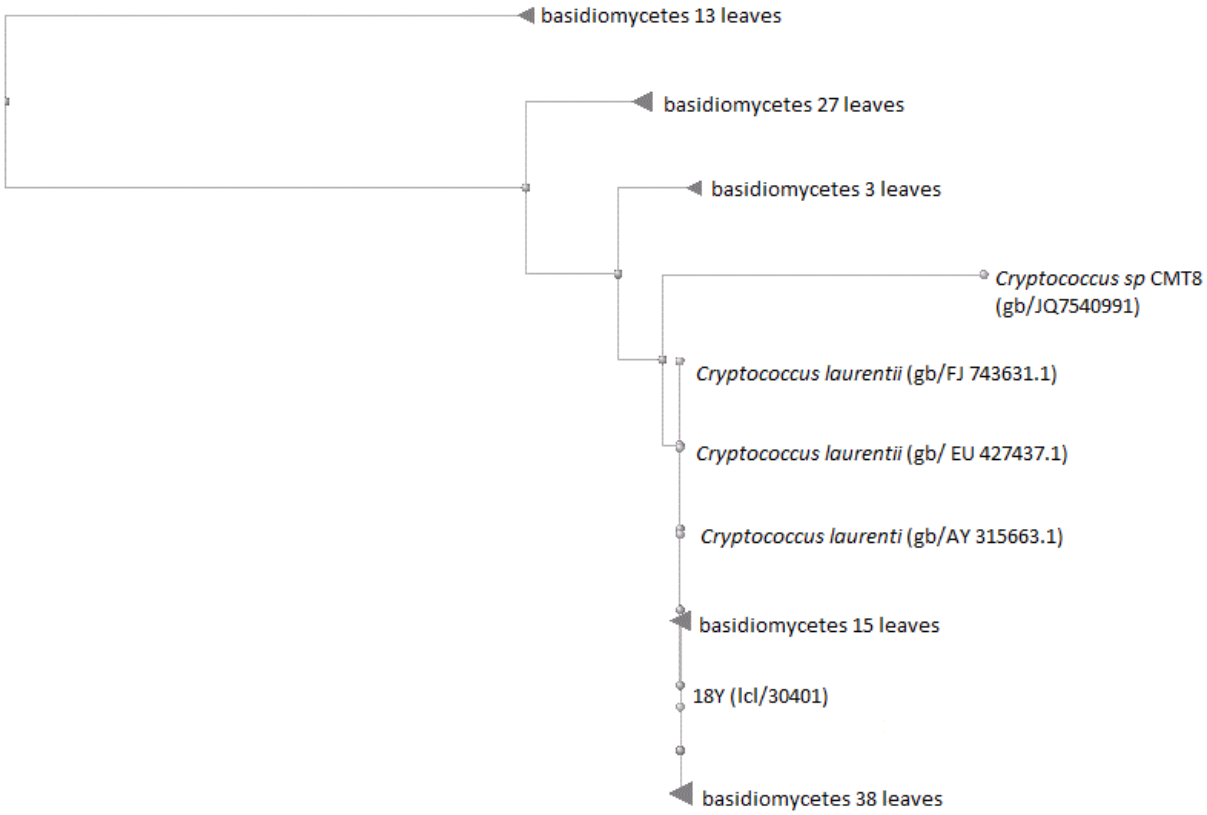
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos para leveduras isoladas ± desvio padrão.

Levedura	**X_{max} ($g.L^{-1}$)**	**μ_{max} (h^{-1})**	**Produtividade ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)**
13Y	9,82 ± 0,180	0,13 ± 0,002	0,05 ± 0,002
18Y	5,75 ± 0,001	0,13 ± 0,001	0,07 ± 0,002
34Y	12,27 ± 0,001	0,05 ± 0,001	0,05 ± 0,001
40Y	5,08 ± 0,001	0,11 ± 0,001	0,01 ± 0,001
53Y	2,54 ± 0,001	0,23 ± 0,007	0,05 ± 0,001
60Y	4,68 ± 0,005	0,13 ± 0,001	0,05 ± 0,001
19Y	2,88 ± 0,001	0,16 ± 0,001	0,03 ± 0,001

A levedura 18Y, que apresentou a maior atividade de endo-xilanase, foi submetida a sequenciamento do genoma pela região D1/D2 do gene RNA ribossomal. A sequência parcial 16S rDNA de ISO II foi comparada com as sequências de 16S rDNA de organismos disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). A análise filogenética da seqüência parcial 16S rDNA da presente levedura mostrou que a maior similaridade foi com *Cryptococcus laurentti* (Figura 3).

Lopes et al. (2011) isolou duas cepas produtoras de endo-xilanase, as quais foram identificadas como *Cryptococcus*, sendo encontradas atividades de 0,67 $U.mL^{-1}$ e 0,73 $U.mL^{-1}$. Morais et al. (2013) isolou leveduras a partir de madeiras em decomposição e testou as mesmas frente a capacidade de fermentar xilose e produzir endo-xilanase; as principais leveduras encontradas foram *Cryptococcus laurentti*, *Cr. humicola*, *Cr. flavences*, and *Cr. podzolicus*. Lara et al. (2014) isolou *C. laurentti* UFMG-HB-48 e alcançou uma atividade de endo-xilanase de cerca de 1.3 $U.mL^{-1}$.

Figura 3: Dendograma de identificação da levedura Cryptococcus laurentti (18Y) usando sequenciamento genético.



Além disso, a atividade enzimática obtida neste estudo é relevante em comparação com outros estudos encontrados na literatura, não só por causa da xilanase produzida a partir de levedura, mas também porque a atividade desta enzima pode ainda ser aumentada, uma vez que os meios de cultivo não estão otimizados.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que as amostras foram fontes adequadas para o isolamento de leveduras capazes de produzir enzimas com capacidade de degradação de xilana. Dentre as 119 cepas de leveduras isoladas, a levedura 18Y (isolada a partir de chicória) apresentou a maior produção de endo-xilanase (2,7 $U.mL^{-1}$) a qual foi identificada como *Cryptococcus laurentii*. Esta levedura apresentou a capacidade de produzir endo-xilanase livre de celulases (CMCase e FPase) e baixos níveis de β-xilosidade, fato este que torna atraente esta enzima para as indústrias de alimentos , têxteis, de papel e fabricantes de rações animais. Além disso, podem ser utilizadas na agricultura e na saúde humana, tais como a produção de xilo-oligossacarídeos para fins farmacêuticos e padrões cromatográficos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESINA, F.C.; ONILUDE, A.A. Isolation, identification and screening of xylanase and glucanase-producing microfungi from degrading wood in Nigeria. **African Journal Agricultural Research**, v. 8, p. 4414 – 4421, 2013.

AHMAD. Z.; BUTT, M.S.; HUSSAIN, R.; AHMED, A.; RIAZ, M. Effect of oral application of xylanase on some hematological and serum biochemical parameters in broilers. **Pakistain Veterinary Journal**, v. 3, p. 388-390, 2013.

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

ANAGNOSTAKIS. S.L.; HANKIN, L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. **Journal Milk Food Technolology**, v. 38. p. 570 – 572, 1975.

BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTNEN, K. Interlaboratory testing of methodos for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270. 1992.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D,F. **Biochemical Engineering Fundamentals,** Singapore: McGraw-Hill. 1986.

BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.S.; GOKHALE, D.V. Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 220-224, 1994.

DE BARROS, LOPES, M.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. PCR differentiation of commercial yeasts strains using intron splice site primers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4514-4520, 1996.

BENASSI. M. V.; DE LUCAS, R. C.; MICHELIN, M.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, L, M, T. Production and action of an *Aspergillus phoenicis*enzymatic pool using different carbon sources. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 253-260, 2012.

BIELY, P.; VRSANKA, M.; KRATKY, Z. Xylan degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. Identification and cellular localization. **European Journal Biochemestry**, v. 108, p. 313-321, 1980.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.

BODDIREDDY, S.; CHARYA, S. Isolation, identification and screening of potencial cellulose-free xylanase producting fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 4624-4630, 2011.

CACAIS, A.O.G.; SILVEIRA, F.Q.P.; FERREIRA FILHO, E.X. Production of xylan-degrading enzymes by a *Trichoderma harzianum* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 3, p. 141-143, 2001.

CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1338-1342, 2009.

CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolitic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 413-433, 2006.

DAMIANO, V.B.; SILVA, R. Aplicação de xilanase termoestável do *Bacillus licheniformis* - 2 a pasta Kraft de eucalipto. **Revista UNORP**, v. 2, p. 41-47, 2003.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C.S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. **Enzyme Research,** doi:10.1155/2012/793708. 2012

FLORES, M.E.; PÉREZ, R.; HUITRÓN, C. β-xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces sp*. CH-M-1035. **Letters Applied Microbiology**, v. 24, 410-416, 1997.

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

GOTTSCHALK, L.M.F.; PAREDES, R.S.; TEIXEIRA, R.S.S.; SILVA, A.S.; BON, E.P.S. Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, B-xylosidase, ferulic acid esterase ando B-glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 569-576, 2013.

GUIMARÃES, L.H.S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; RIZZATI, A.C.S.; SANDRIM, V.C.; ZANOELO, F.F.; AQUINO, A.C.M.M.; JUNIOR, A.B.; POLIZELI, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37. p. 474-480, 2006.

LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T.; BARKER, J.S.F. *Kadomaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 172-177, 1999.

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

LEMOS, J.L.S.; PEREIRA, J. N. Produção de xilanases por aspergillus awamori e a determinação do seu peso molecular por eletroforese em condições desnaturantes. **Acta Scientiae & Technicae**, v. 1, p. 45-52, 2013.

LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C.C.P.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI-FILHO, F. Thermo-stable xylanases from non-conventional yeasts. **Journal of Microbiology and Biochemical Technology**, v.3, p. 36-42, 2011.

MALADADI, R.B.; RAGHAVENDRA, S.; KUMAR, S.V. Production of cellulose-free xylanase from a novel yeast strain used from biobleaching in paper industry. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, p. 24-33, 2007.

MATHLOUTHI, N.; MOHAMED, M.A.; LARBIER, M. Effect of enzyme preparation containing xylanase and ß-glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean meal based diets. **British Poultry Science**, v. 44, p. 60-66, 2003.

MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal Molecular Catalisis B Enzymes**, v. 49, p. 43-49, 2007.

MENDOZA, N.S.; CALIWARA, T.E.M.; UNCIANO, N.M. A Local Isolate of Non-cellulolytic, xylanolytic, and pectinolytic thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* C_{1a}. **Philippine Journal of Science**, v.135, p. 113-119, 2006.

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

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V.K. A cost effective method for screening and isolation of xylan degrading of bacteria using agro waste material. **Asian Journal Biologycal Science**, v. 5, p. 384-394, 2012.

PETRESCU, I.; LAMOTE-BRASSEUR, J.; CHESSA, J.P.; NTARIMA, P.; CLAEYSSENS, M.; DEUREESE, B.; MARINO, G.; GERDAY, C. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. **Extremophiles**, v. 4, p. 137-144, 2000.

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

RAJAGOPALAN, G.; YEW, K.W.; HE, J.; YONG, K.L. Production, purification and characterization of a xylooligosaccharides forming xylanase from high butanol producing strain *Clostridium sp* BOH3. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 448-457, 2013.

RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of etanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Letters Applied and Microbiology**, v. 47, p. 9-24, 2008.

RECH, R.; CASSINI, C.F.; SECCHI, A.; AYUB, M. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of b-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

RIBEIRO, L.F.C.; RIBEIRO, L.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, L.T.M. Screening of filamentous fungi for xylanases and cellulases not inhibited by xylose and glucose. **British Biotechnology Journal**, v. 4, p. 30-39, 2014.

ROSA, C.A.; LACHANCE, M.A.; TEIXEIRA, L.C.R.S.; PIMENTA, R.S.; MORAIS, P.B. *Metschnikowia cerradonensis sp. Nov.*, a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitibulid beetles in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p.161-165, 2007.

SAMANTA, A.K.; KOLTE, A.P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; JAYAPAL, N. A simple and efficient diffusion technique for assay of endo β-1,4-xylanase activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1349-1353, 2011.

SANGHI, A.; GARG, N.; KUHAR, K.; KUHAD, C.R.; GUPTA, K.V. Enhanced production of celulase – free xylanase by alkalophilic Bacillus subtilis ash and its application in biobleaching of kraft pulp. **Bioresource Technology**, v. 3, p. 1109-1129, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blücher LTDA, São Paulo, SP, 2001.

SREENATH, H.K.; SHAH, A.B.; YANG, V.W.; GHARIA, M.M.; JEFFRIES, T.W. Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, p. 18-20, 1996.

STEINER, W.; LAFFERTY, R.M.; GOMES, I.; ESTERBAUER, H. Studies on a wild type strain of *Schizophyllum commune*: Cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide schizophyllan. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 169–178, 1987.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 1-20, 2000.

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

TALLAPRAGADA, P.; VENKATESH, K. Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Journal Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, p. 137-14, 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. Purification and characterization of thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689-692, 1987.

VIANA, M.T.S.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; SILVA, E.A.; VIEIRA, R.A.; RIBEIRO, J.V. Use of xylanase in diets composed of corn and soybean meal for comercial laying hens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 385-390, 2011.

VIEIRA, W.B.; MOREIRA, L.R.S.; NETO, A.M.; FERREIRA FILHO, E.X. Production and characterization of an enzyme complex from a new strain of *Clostridium thermocellum* with emphasis on its xylanase activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 237-242, 2007.

WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. **Handbook of Food Enzymology**, Routledge, USA, 2002.

ARTIGO 2: MAXIMIZAÇÃO DE ENDO-XILANASE PRODUZIDA POR *Cryptococcus laurentii* ISOLADO

MAXIMIZAÇÃO DE ENDO-XILANASE PRODUZIDA POR *Cryptococcus laurentii* ISOLADO

RESUMO

A produção de endo-xilanase de *Cryptococcus laurentti* em cultivos sumersos foi avaliada fazendo uso da ferramenta planejamento experimental. Primeiramente foi realizado um planejamento fracionário 2^{6-2} para verificar os efeitos do pH inicial e as concentrações de xilana, peptona, $(NH_4)_2SO_4$, extrato de levedura e KH_2PO_4 sobre a atividade enzimática. Após selecionar as variáveis xilana, peptona, pH e extrato de levedura foi realizado um delineamento composto central rotacional (2^4 com pontos centrais e axiais) totalizando 28 ensaios e tendo como resposta a atividade de endo-xilanase. Todos os cultivos foram mantidos a 30 °C, 150 rpm durante 96 h onde alíquotas para determinação de atividade, pH e biomassa foram retiradas. Foi verificada também a influência da agitação dos cultivos avaliando três agitações diferentes: 150, 175 e 200 rpm. A produção inicial máxima de endo-xilanase da levedura *Cryptococcus laurentii* foi de 2,7 $U.mL^{-1}$, a qual, após o estudo dos componentes e pH do meio de cultivo, teve um incremento de 170%, onde a atividade máxima foi de 6,9 $U.mL^{-1}$ usando 10,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 10,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 10,0 $g.L^{-1}$ de xilana, 1,0 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)_2SO_4$ em pH 6,5 e agitação de 150 rpm. Assim, aumentando a velocidade de agitação para 175 rpm, a atividade enzimática produzida foi de 7,3 $U.mL^{-1}$. Dessa forma foi possível aumentar significativamente a atividade de endo-xilanase produzida pele levedura isolada.

Palavras-chave: planejamento experimental, levedura, atividade enzimática

1 INTRODUÇÃO

Endo-xilanases (EC 3.2.1.8) são importantes enzimas extracelulares que catalisam a hidrólise das ligações β-1,4 na cadeia de xilana resultando em produtos constituídos de monômeros de D-xilose e xilo-oligossacarídeos de diferentes tamanhos (HECK, 2006; JÃNIS, 2007).

As xilanases têm atraído muita atenção por causa de seu potencial biotecnológico nos diversos processos industriais, tais como, na indústria de alimentos, em rações animais, na indústria têxtil e na indústria de papel e celulose para o branqueamento, além disso as

xilanases em sinergismo com outras enzimas podem ser utilizadas para a geração de combustíveis biológicos, tais como etanol e de xilitol a partir de biomassa lignocelulósica (BEG et al., 2001; CORMANA ET AL, 2005).

As xilanases desempenham um papel fundamental na hidrólise da xilana porém a hidrólise completa necessita de um consórcio de enzimas (COLLINS et al., 2005). As enzimas que degradam a xilana são endo-xilanases que atacam a cadeia principal da xilana e β-xilosidases que hidrolisam xilo-oligossacarídeos em D-xilose (KIM et al., 2000).

A produção de xilanases têm sido amplamente relatada na literatura utilizando bactérias, fungos e ascomicetos (QIE et al, 2010;. SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). Porém a maior parte dos estudos tem sido focados na produção através de bolores (ADESINA, 2013; CASCAIS et al., 2001; RAO et al., 2002) e bactérias (CHAVEZ et al, 2006; RAJAGOPALAN et al., 2013), sendo relativamente escassa a informação que se tem sobre o uso de leveduras para a produção de xilanase (LAITILA, 2006; LARA, 2014; LOPES et al., 2011).

As leveduras, apesar de produzirem xilanase em níveis menores do que bactérias e bolores apresentam vantagens que as tornam atrativas para tal função como: produção extracelular da enzima, apresentam capacidade de assimilar grande variedade de substratos, alta velocidade de crescimento, facilidade de separar suas células da biomassa, além de poucas serem as espécies que apresentam atividade xilanolítica acoplada a celulolítica quando comparadas a bolores podendo assim ser aplicadas no branqueamento de papel (AMORIM, 2005).

Os principais gêneros relatados na literatura para a produção de xilanase são: *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* e *Trichosporon* (BHADRA et al., 2008; CARVALHO et al., 2013; PARACHIN et al., 2009)

A influência de vários fatores na produção de xilanases vem sendo investigada com o intuito de determinar estratégias para maximizar a produção enzimática. A escolha do substrato indutor da enzima, o micro-organismo utilizado, o efeito da composição do meio, da temperatura e do pH, bem como a influência dos sistemas de aeração são as principais variáveis que influenciam a produção de xilanase (CAI, 2004; HALTRICH et al., 1996; LEMOS, 2001; SENTHILKUMAR, 2005; SUBRAMANIAN; PREMA, 1998;). Assim sendo, o objetivo deste estudo foi maximizar a atividade em função da agitação e da composição do meio de cultivo para produção de xilanase em cultivo submerso usando a levedura *Cryptococcus laurentii.*

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

Cryptococcus laurentii usado no presente trabalho foi isolado de chicória e selecionado como produtor potencial de xilanase (OTERO et al., 2015). A levedura foi mantida a 4 °C em ágar GYMP (2,0% glicose, 0,5 extrato de levedura, 1,0% extrato de malte e 0,2% Na_2PO_4).

2.2 PRODUÇÃO DE XILANASE

Para a obtenção do inoculo a levedura foi crescida em meio contendo 10,0 $g.L^{-1}$ de xilana de *Beechwood*; 3,0 $g.L^{-1}$ extrato de levedura; 7,0 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4; 2,0 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4; 0,1 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$; 1,0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)SO_4$ e 5,0 $g.L^{-1}$ peptona em pH 6.0 e o meio esterilizado a 121 °C durante 15 min. O inóculo foi cultivado em erlenmeyers aletados (500 mL de capacidade) contendo 150 mL de meio de cultivo durante 24 h a 150 rpm e 30 °C em agitador orbital (LOPES et al., 2011).

Os cultivos para obtenção da endo-xilanase, foram iniciados através de uma suspensão celular (10^8 celulas. mL^{-1}) obtidas do inóculo com 24 h, e a esterilização dos meios foi conduzida conforme descrito anteriormente. O cultivo foi realizado nas mesmas condições de temperatura e agitação descritas para o inóculo porém durante 96 h. Em intervalos de tempo apropriados, amostras do cultivo foram retiradas para determinação das atividades enzimáticas (endo-xilanase, CMCase, FPase e β-xilosidase), concentração celular e pH.

2.3 ESTUDO DOS CULTIVOS

Buscando a maximização da atividade de endo-xilanase, dois planejamentos experimentais foram realizados, sendo primeiramente avaliados os efeitos iniciais do pH e das concentrações de xilana, peptona, sulfato de amônio, extrato de levedura e fosfato de potássio monobásico estudados em um planejamento fracionário 2^{6-2} com 4 pontos centrais, totalizando 20 ensaios (Tabela 1).

Para cada ensaio, a resposta do planejamento experimental (variável dependente) foi a atividade de endo xilanse máxima. Uma estimativa do efeito principal

obtido pelas diferenças avaliadas no planejamento realizado foi obtida pela mudança do nível mais baixo (-1) para o nível mais alto (+1) da variável correspondente.

Os valores reais e codificados usados nos planejamentos fracionário (2^{6-2}) e completo (DCCR 2^4) são apresentados na tabela 1.

Posteriormente um delineamento composto central rotacional (DCCR 2^4) foi conduzido usando pontos centrais e axiais e quatro variáveis selecionadas a partir do planejamento fracionário considerando a atividade de endo-xilanase máxima como resposta. A concentração de $MgSO_4.7H_2O$ foi fixada em 0,1 g/L para todos os ensaios, bem como a temperatura de 30ºC e agitação de 150 rpm. Os limites das faixas estudadas foram baseados nos resultados apresentados na literatura.

Tabela 1 - Valores reais e codificados para os níveis usados nos planejamentos fracionário e DCCR

Planejamento	**Nível**	**Xilana**	**Extrato de Levedura**	**Peptona**	**$(NH_4)_2SO_4$**	**KH_2PO_4**	**pH inicial**
		$g.L^{-1}$	**$g.L^{-1}$**	**$g.L^{-1}$**	**$g.L^{-1}$**	**$g.L^{-1}$**	
Fracionário	*-1*	5,0	1,0	1,0	1,0	0	5,0
	0	12,5	3,0	3,5	3,0	3,5	6,0
	+1	20,0	5,0	6,0	5,0	7,0	7,0
DCCR (2^4)	*-2*	10,0	5,0	5,0	-	-	5,5
	-1	17,5	7,5	7,5	-	-	6,0
	0	25,0	10,0	10,0	-	-	6,5
	+1	32,5	12,5	12,5	-	-	7,0
	+2	40,0	15, 0	15,0	-	-	7,5

2.4 AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE ROTAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Com o objetivo de avaliar o efeito da velocidade de agitação (150, 175 e 200 rpm) do meio de cultivo frente a atividade de endo-xilanases produzidas por *Cryptococcus laurentii* foram realizados cultivos submersos, os quais foram mantidos a 30ºC durante 48 h e alíquotas foram coletadas em 0, 24, 36 e 48 h de cultivo para realizar as determinações das atividades enzimáticas, sendo os cultivos realizados em triplicata.

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Atividade enzimática

Atividade de endo-xilanase foi determinada conforme descrito por Bailey et al., (1992) usando como substrato a xilana de *Beechwood* 1%. Açúcares redutores foram determinados usando método DNS (MILLER, 1959) correlacionados com curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de xilose por mL por minuto sob as condições descritas.

2.5.2 Determinação de biomassa

A concentração de biomassa foi estimada através da medida de absorvância em espectrofotômetro a 620 nm e relacionando as leituras da biomassa, com as respectivas curvas de calibração de biomassa seca (RECH et al., 1999).

2.5.3 Determinação de pH

Para determinação do pH foram utilizados os meios de cultivo centrifugados e livres de células, os quais foram determinados em pHmetro digital.

2.5.4 Determinação da produtividade máxima

A produtividade enzimática máxima (P, $U.mL^{-1}.h^{-1}$) foi calculada em termos de atividade de endo-xilanase nas condições do melhor ensaio, através da equação 1:

$$P = \frac{A - A_0}{t - t_0} \quad (1)$$

Onde A_o é a atividade enzimática inicial, A é a atividade máxima de endo-xilanase no tempo de retirada da amostra, t é o tempo de cultivo em que a atividade máxima da enzima ocorre e t_0 é o tempo inicial do cultivo.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar os resultados das atividades enzimáticas nos ensaios realizados (nível de 90% confiança $p<0,1$ para o

planejamento fracionário e nível de 95% de confiança $p<0,05$ para DCCR). Os resultados foram tratados por análise de variância seguida pelo teste de Tukey, considerando um nível de confiança de 95 % ($p<0,05$), utilizando o software *Statistica 5.0* onde os ensaios e medidas analíticas foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando maximizar a atividade de endo-xilanase produzida pela levedura *Cryptococcus laurentti* um planejamento fatorial fracionário (2^{6-2}) foi realizado onde foi possível observar que as atividades enzimáticas máximas alcançadas variaram entre 0,8 e 5,40 $U.mL^{-1}$, de acordo com as diferentes condições e composições dos meios cultivo (Tabela 2).

A máxima atividade enzimática (5,40 $U.mL^{-1}$) foi observada no ensaio 8 o qual era composto por: 6 $g.L^{-1}$ de peptona; 20 $g.L^{-1}$ de xilana; 0 $g.L^{-1}$ fosfato monobásico de potássio e 5 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)_2SO_4$ em pH 7,0. Essa máxima atividade foi atingida em pH de 8,2 em 48 h de cultivo e apresentando um crescimento celular de 5,0 $g.L^{-1}$.

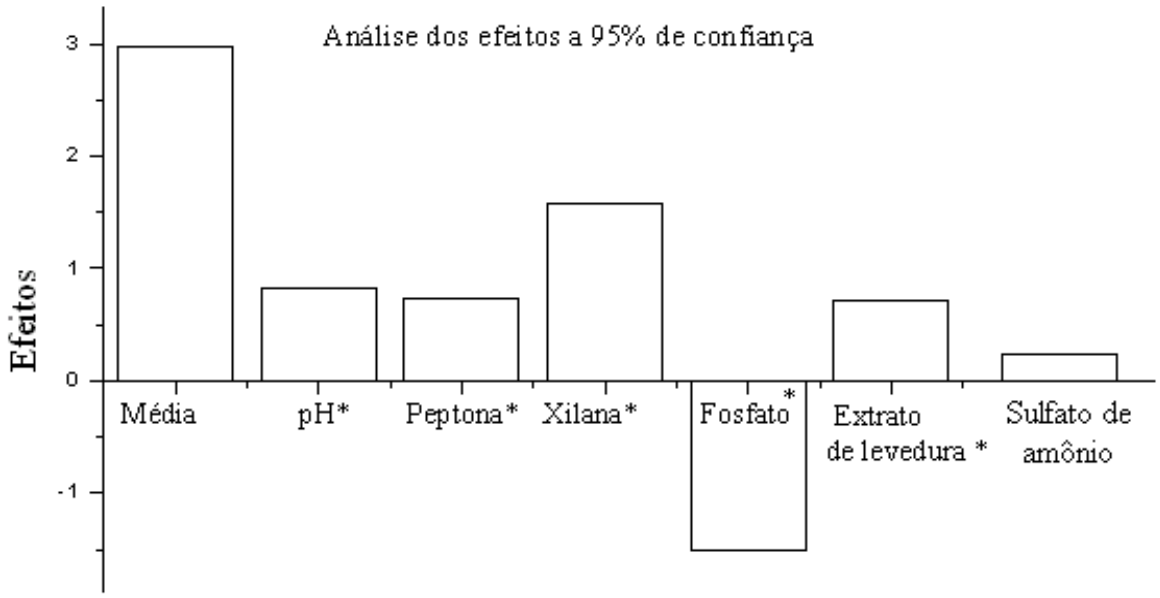
Segundo Li et al. (2007) otimizações/maximizações na produção enzimática podem ser conseguidas através de planejamentos fatoriais de certas variáveis importantes como fonte de nitrogênio, carbono, temperatura de cultivo, pH, dentre outros fatores os quais podem induzir ou reprimir a atividade catabólica, sendo assim de extrema importância a avaliação de cada componente utilizados nos cultivos (LENARTOVICZ et al. ; 2003).

Tabela 2 - Valores reais e codificados bem como valores experimentais para as atividades enzimática obtida no planejamento fracionário 2^{6-2}.

Ensaio	pH	Peptona ($g.L^{-1}$)	Xilana ($g.L^{-1}$)	KH_2PO_4 ($g.L^{-1}$)	$(NH_4)_2SO_4$ ($g.L^{-1}$)	Extrato de levedura ($g.L^{-1}$)	Máxima atividade ($U.mL^{-1}$)
1	-1 (5,0)	-1 (1,0)	-1 (5,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	-1 (1,0)	1,3
2	1 (7,0)	-1 (1,0)	-1 (5,0)	-1 (0)	1 (5,0)	-1 (1,0)	1,5
3	-1 (5,0)	1 (6,0)	-1 (5,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	1 (5,0)	2,8
4	1 (7,0)	1 (6,0)	-1 (5,0)	-1 (0)	1 (5,0)	1 (5,0)	4,0
5	-1 (5,0)	-1 (1,0)	1 (20,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	1 (5,0)	2,9
6	1 (7,0)	-1 (1,0)	1 (20,0)	-1 (0)	1 (5,0)	1 (5,0)	3,9
7	-1 (5,0)	1 (6,0)	1 (20,0)	-1 (0)	-1 (1,0)	-1 (1,0)	4,7
8	1 (7,0)	1 (6,0)	1 (20,0)	-1 (0)	1 (5,0)	-1 (1,0)	5,4
9	-1 (5,0)	-1 (1,0)	-1 (5,0)	1 (7)	-1 (1,0)	1 (5,0)	1,7
10	1 (7,0)	-1 (1,0)	-1 (5,0)	1 (7)	1 (5,0)	1 (5,0)	2,0
11	-1 (5,0)	1 (6,0)	-1 (5,0)	1 (7)	-1 (1,0)	-1 (1,0)	0,8
12	1 (7,0)	1 (6,0)	-1 (5,0)	1 (7)	1 (5,0)	-1 (1,0)	1,0
13	-1 (5,0)	-1 (1,0)	1 (20,0)	1 (7)	-1 (1,0)	-1 (1,0)	1,5
14	1 (7,0)	-1 (1,0)	1 (20,0)	1 (7)	1 (5,0)	-1 (1,0)	1,7
15	-1 (5,0)	1 (6,0)	1 (20,0)	1 (7)	-1 (1,0)	1 (5,0)	1,8
16	1 (7,0)	1 (6,0)	1 (20,0)	1 (7)	1 (5,0)	1 (5,0)	3,4
17	0 (6,0)	0 (3,5)	0 (12,5)	0 (3,5)	0 (3,0)	0 (3,0)	2,8
18	0 (6,0)	0 (3,5)	0 (12,5)	0 (3,5)	0 (3,0)	0 (3,0)	2,6
19	0 (6,0)	0 (3,5)	0 (12,5)	0 (3,5)	0 (3,0)	0 (3,0)	2,6
20	0 (6,0)	0 (3,5)	0 (12,5)	0 (3,5)	0 (3,0)	0 (3,0)	2,6

Como pode ser visto na Figura 1, o pH inicial e as concentrações de xilana, peptona, extrato de levedura, e KH_2PO_4 foram estatisticamente significativas enquanto que a concentração de $(NH_4)_2SO_4$,foi a única variável que não apresentou efeito significativo sobre a atividade enzimática máxima a 95 % de confiança.

Figura 1: Efeitos dos componentes do meio de cultivo sob a atividade de endo-xilanase no planejamento experimental fracionário.
* Componentes estatisticamente significativos



Mudanças nas variáveis pH , xilana , peptona e extrato de levedura do nível -1 a +1 nível levaram a um aumento, estatisticamente significativos na atividade de endo-xilanase enquanto que a variação na concentração de KH_2PO_4 a partir do nível -1 a +1 nível levaram à diminuição da atividade enzimática (- 1,51 $U.mL^{-1}$) . A produção de endo-xilanase foi afetada de modo significativo pela concentração de xilana (efeito positivo em média de 1,57 $U.mL^{-1}$), seguido pela concentração de peptona, extrato de levedura e pH.

A partir destes resultados, o pH inicial, assim como as concentrações de xilana , extrato de levedura e peptona foram selecionados para serem estudados no DCCR. A concentração de KH_2PO_4 foi fixada em zero (nível -1), uma vez que a remoção deste componente levou a um aumento da atividade de endo-xilanase. Lopes (2011), em estudos visando a otimização enzimática de endo-xilanase produzida por uma levedura isolada, verificou que na concentração de 1g.L^{-1} de $(NH_4)_2SO_4$ os resultados de atividade enzimática foram melhores. Com base nos resultados obtidos, a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ foi fixada em 1g.L^{-1} (nível -1) pois seu efeito não foi significativo porém considerado importante para a produção enzimática em outro estudo de obtenção de xilanase por *Cryptococcus*.

No delineamento composto central rotacional (Tabela 3), a atividade da enzima variou entre 0,8 e 6,9 $U.mL^{-1}$ sendo o ensaio 17, o qual apresentava um meio composto por: 10 g.L^{-1} de xilana (nível -2) , 10 g.L^{-1} de extrato de levedura (nível 0), 10 g.L^{-1} de peptona

(nível 0) e o pH de 6,5 (nível 0) o que proporcionou a maior atividade para endo-xilanase (6,9 $U.mL^{-1}$) atingida após 48 h de cultivo em pH 8,9 . A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para a atividade enzimática no DCCR com quatro variáveis estudadas: concentrações iniciais de xilana , extrato de levedura, peptona e pH .

Todos os ensaios realizados no DCCR apresentaram baixas atividades enzimáticas, com exceção do ensaio 17 o qual apresentou uma máxima atividade de 6,9 $U.mL^{-1}$, sendo esta atividade duas vezes maior que a atividade inicial da enzima (2,7 $U.mL^{-1}$). Essa atividade foi alcançada a partir do cultivo da levedura isolada por Otero et al., (2015).

Uma vez que apenas o ensaio 17 se destacou quanto a atividade de endo xilanase, novos cultivos foram realizados utilizando as mesmas condições visando confirmar a atividade alcançada. Esses cultivos foram realizados em triplicada e novamente a atividade encontrada foi superior as demais, e por esse motivo foi possível validar os resultados do ensaio contendo uma concentração de 10 $g.L^{-1}$ de xilana, extrato de levedura e peptona.

Os resultados do DCCR 2^4 foram avaliados quanto aos efeitos, coeficiente de regressão e ANOVA onde os resultados estão apresentados no Apêndice 3.

Tabela 3 - Valores reais, codificados e experimentais do DCCR (2^4) para produção de endo-xilanase

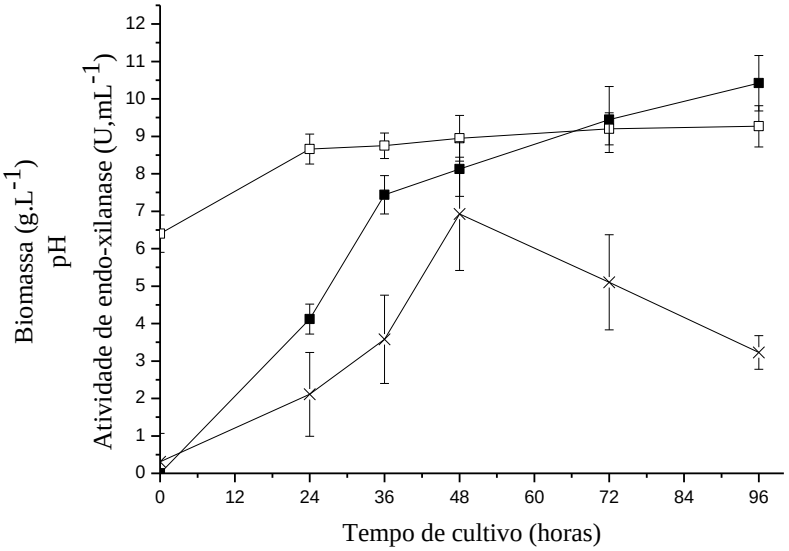
Ensaio	Xilana ($g.L^{-1}$)	Peptona ($g.L^{-1}$)	Extrato de levedura ($g.L^{-1}$)	pH	Máxima atividade ($U.mL^{-1}$)
1	-1 (17,5)	-1 (7,5)	-1 (7,5)	-1 (6)	1,6
2	+1 (32,5)	-1 (7,5)	-1 (7,5)	-1 (6)	1,0
3	-1 (17,5)	+1 (12,5)	-1 (7,5)	-1 (6)	1,1
4	+1 (32,5)	+1 (12,5)	-1 (7,5)	-1 (6)	1,7
5	-1 (17,5)	-1 (7,5)	+1 (12,5)	-1 (6)	1,2
6	+1 (32,5)	-1 (7,5)	+1 (12,5)	-1 (6)	1,3
7	-1 (17,5)	+1 (12,5)	+1 (12,5)	-1 (6)	1,4
8	+1 (32,5)	+1 (12,5)	+1 (12,5)	-1 (6)	1,5
9	-1 (17,5)	-1 (7,5)	-1 (7,5)	+1 (7)	1,6
10	+1 (32,5)	-1 (7,5)	-1 (7,5)	+1 (7)	1,4
11	-1 (17,5)	+1 (12,5)	-1 (7,5)	+1 (7)	1,1
12	+1 (32,5)	+1 (12,5)	-1 (7,5)	+1 (7)	1,5
13	-1 (17,5)	-1 (7,5)	+1 (12,5)	+1 (7)	1,2
14	+1 (32,5)	-1 (7,5)	+1 (12,5)	+1 (7)	1,5
15	-1 (17,5)	+1 (12,5)	+1 (12,5)	+1 (7)	0,8
16	+1 (32,5)	+1 (12,5)	+1 (12,5)	+1 (7)	1,1
17	-2 (10)	0 (10)	0 (10)	0 (6,5)	6,9
18	2 (40)	0 (10)	0 (10)	0 (6,5)	1,5
19	0 (25)	-2 (5)	0 (10)	0 (6,5)	1,4
20	0 (25)	2 (15)	0 (10)	0 (6,5)	1,9
21	0 (25)	0 (10)	-2 (5)	0 (6,5)	1,3
22	0 (25)	0 (10)	2 (15)	0 (6,5)	1,3
23	0 (25)	0 (10)	0 (10)	-2 (5,5)	1,3
24	0 (25)	0 (10)	0 (10)	2 (7,5)	1,3
25	0 (25)	0 (10)	0 (10)	0 (6,5)	1,2
26	0 (25)	0 (10)	0 (10)	0 (6,5)	1,4
27	0 (25)	0 (10)	0 (10)	0 (6,5)	1,2
28	0 (25)	0 (10)	0 (10)	0 (6,5)	1,1

A maioria das endo-xilanases produzidas por bactérias e fungos, parecem ser enzimas induzidas. Em geral, o mecanismo que regula a indução das xilanases é complexo e a resposta, em termos de produção enzimática, frente a um indutor, varia para cada micro-organismo, pois um indutor que leva a máxima atividade em uma espécie pode ser o inibidor da atividade em outra (KULKARNI et al., 1999). Biely (1995) propôs um mecanismo de indução de xilanase para a levedura Cryptococcus albidus no qual uma pequena quantidade de xilanase constitutiva, suficiente apenas para a indução do sistema, é produzida e excretada no meio, hidrolisando a xilana em compostos de peso molecular menor, capazes, então, de entrar na célula e induzir a produção de xilanase. Xilose e glicose, provenientes da ação da enzima sobre estes xilo-oligômeros, são repressores, funcionando como um controle sobre a produção. Segundo o autor, este sistema pode ser a explicação para a indução de xilanase em outros micro-organismos. Haltrich et al. (1996) descrevem, genericamente, a indução de xilanases produzidas por fungos por um mecanismo semelhante ao descrito anteriormente.

A composição dos meios estudados neste DCCR podem ter apresentado um excesso de nutrientes, especialmente de carbono, o que pode ter interferido na utilização da xilana pela levedura, conduzindo assim a uma supressão metabólica e, por conseguinte, uma dificuldade para a levedura produzir maiores quantidades de endo-xilanase. Palma (2003) verificou que quando a concentração de peptona foi aumentada de 1 $g.L^{-1}$ para 2 $g.L^{-1}$ houve uma repressão catabólica ou mudança no balanço Carbono: Nitrogênio que afetou de uma forma negativa (redução da atividade) a produção enzimática e acarretou uma aumento expressivo na biomassa total formada.

O acompanhamento celular bem como o pH ao longo dos cultivos foram realizados (Apêndice 4) sendo que as determinações do ensaio 17 (maior atividade enzimática) estão apresentadas na Figura 2. Observa-se que a levedura apresentou um aumento significativo em termos de biomassa, uma vez que no pico enzimático (48 h) a produção foi de 8,13 $g.L^{-1}$ sendo que esta continuou em crescente produção até atingir 10,4 $g.L^{-1}$ ao final do cultivo. O pH ao longo do cultivo apresentou um crescente aumento, partindo de um pH inicial de 6,4 e atingindo o pH final de 9,3.

Figura 2 - Acompanhamento do pH (-□-), atividade enzimática (-x-) e concentração de biomassa(-■-) da levedura *Cryptococcus laurentti* no ensaio 17, ao longo de 96 h de cultivo, bem como o desvio padrão.



A partir do ensaio 17, o qual apresentou a maior atividade enzimática, foi avaliada a influência da agitação do meio frente a atividade enzimática. Três diferentes velocidades (150, 175 e 200 rpm) foram estudados (Apêndice 5) onde observou-se que quando os cultivos foram mantidos a 175 rpm, aconteceu um aumento de 5% na atividade de endo-xilanase (7,3 $U.mL^{-1}$). Além disso, foi possível detectar que o pico máximo de atividade foi deslocado de 48 para 36 h de cultivo. Sales et al., (2010) observou também um aumento na atividade de endo-xilanases produzidas por *Aspergillus* quando a agitação usada para o cultivo foi de 180 rpm.

Quando a agitação foi aumentada para 200 rpm, foi observado um decréscimo da atividade enzimática. De acordo Warywoda et al. (1992), agitação elevada pode causar fugas de material intracelular por forças de cisalhamento e, possivelmente, interrompa a síntese da enzima.

Basaran et al., (2008) observaram que o aumento da agitação 140-180 rpm conduziu a um decréscimo na atividade enzimática de xilanases, concordando com os resultados obtidos no presente trabalho. Ellouze (2008) também observaram um aumento na atividade enzimática de endo-xilanase quando a agitação aumentou de 100 para 180 rpm.

Alam et al. (2008) realizaram a otimização do processo de produção de celulase por *Trichoderma harzianum*, por meio da bioconversão do estado líquido de lodo de esgoto doméstico, onde a melhor atividade foi obtida com agitação de 175 rpm.

Sales et al. (2010) ao estudar os fatores que influenciavam na atividade de xilanase produzida por Aspergilus, o qual observou que a máxima atividade encontrada (30,05 $U.mL^{-1}$) quando a agitação dos meios foi elevada para 180 rpm.

Ao aumentarmos a agitação dos meios de cultivo de 150 rpm para 175 foi possível elevar a atividade de endo-xilanase para 7,3 $U.mL^{-1}$, nas mesmas condições do ensaio 17. Embora este valor não seja estatisticamente diferente da atividade encontrada em 150 rpm (6,9 $U.mL^{-1}$) acredita-se que seja válido esse aumento de 25 rpm, uma vez que frente a atividade incial (5,4 $U.mL^{-1}$), ocorreu um aumento de atividade e um menor tempo para alcançar atingir essa atividade.

Para as diferentes agitações estudadas (150, 175 e 200 rpm), foram calculadas as produtividades enzimáticas, onde os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Produtividade enzimática máxima encontrada nas diferentes velocidades de agitação estudadas, mantendo as condições do ensaio 17.

Agitação (rpm)	Atividade máxima ($U.mL^{-1}$)	Produtividade ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)	Tempo do pico enzimático (h)
150	$6,98^{a}$	$0,14^{b}$	48
175	$7,26^{a}$	$0,20^{a}$	36
200	$5,17^{b}$	$0,15^{b}$	36

Letras iguais nas médias dos resultados (colunas) indicam que não existe diferença significativa entre elas a 95% de confiança (Teste de Tukey).

Em termos de produtividade enzimática, a agitação de 175 rpm proporcionou uma produtividade mais elevada (0,2 $U.mL^{-1}.h^{-1}$) em 36 h, sendo ela estatisiticamente diferente das demais (0,14 $U.mL^{-1}.h^{-1}$ para 150 rpm e 0,15 $U.mL^{-1}.h^{-1}$ para 200). Assim sendo, optou-se por realizar a produção de endo-xilanase utilizando a agitação do meio em 175 rpm.

4 CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível maximizar a atividade de endo-xilanase produzida por *Cryptococcus laurentti* fazendo uso da ferramenta de planejamento experimental. Através de um planejamento fracionário 2^{6-2} e de um planejamento central composto rotacional 2^{4} a atividade enzimática passou de 5,4 $U.mL^{-1}$ para 6,9 $U.mL^{-1}$. O aumento da atividade xilanolítica foi maior que 25% o que indica que as condições de pH

inicial de 6,5, concentração de xilana, peptona e extrato de levedura de 10 $g.L^{-1}$, sulfato de amônio 1 $g.L^{-1}$, 30ºC e agitação de 150 rpm foram bem sucedidas, além disso, observou-se que a agitação de 175 rpm proporcionou um aumento de 1,9 $U.mL^{-1}$ na atividade final, alcançando 7,3 $U.mL^{-1}$ de endo-xilanase.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M.Z.; MUYIBI, S.A.; WAHID, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4709-4716, 2008.

BAE, H. J.; KIM, H. J.; KIM, Y. S. Production of a recombinant xylanase in plants and its pot ential for pulp biobleaching applications. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3513-3519, 2008.

BASARAN, P.; OZSCAN, M. Characterization of β- xylosidase enzyme from a Pichia stipitis mutante. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 38-43, 2009.

CAI, Q.; YUE, X.; NIU, T.; JI, C.; MA, Q. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus Pleurotus ostreatus. **Process Biochemestry**, v. 39, p. 1561-1566, 2004.

ELLOUZE, O.; FATTOUCH, M.; MESTIRI, F.; ANIBA M.R.; MARZOUKI,M.N. Optimization of extracellular xylanase production by *Sclerotina sclerotium S2* using factorial desing. **Indian Journal Biochemestry and Biophysical**. v. 45, p. 404-409, 2008.

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

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, D.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from Thermoascus aurantiacus: characterization of two isozymes. **Journal Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 155-163, 1998.

KARADUMAN, Y.; GOKCAN, C.; ONAL, L. Effect of enzymatic pretreatment on the mechanical properties of jute fiber-reinforced polyester composites. **Journal of composites Materials**, v. 22, DOI 002199832446826. 2013.

KIM, J.H; KIM, S.C.; NAM, S.W. Constitutive overexpression of the endoxylanase gene in *Bacillus subtilis*. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 551-553, 2000.

LEMOS, J.L.S., FONTES, M.C.D., PEREIRA,N. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. **Applied Biochemestry and Biotechnology,** v. 91, p. 681-689, 2001.

LENARTOVICZ, V.; DE SOUZA, C. G. M.; MOREIRA, R. M. P. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable bxylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1775-1780, 2003.

LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C.C.P.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI-FILHO, F. Thermo-stable xylanases from non-conventional yeasts. **Journal of Microbiology and Biochemestry Technology,** v. 3, p. 36-42. 2011.

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 587-592, 2008.

OTERO,D.M.; CADAVAL,C.L.; TEIXEIRA,L.M.; ROSA,C.A.; SANZO, A.V.L.; KALIL,S.J. Screening of yeast capable of producing celullase-free xylanase. **African Journal of Biotechnology,** v. 14, p. 1961-1969, 2015.

SALES, M.R.; DE MOURA, R.B.; PORTO, T.S.; DE MACEDO, G.R..; PORTO, A.L.F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 45, p. 1290-1296, 2010.

SENTHILKUMAR, S.R.; ASHOKKUMAR, K.C.; RAJ, K.C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn in solid-state fermentation using central composite rotary desing. **Bioresouce Technology**, v. 96, p. 1380-1386, 2005.

SUBRAMANIAN, S.; PREMA, P. Optimization of cultural parameters for the synthesis of endo-xylanases from *Bacillus sp*. SSP-34. **Journal Science Industrial Research**. v. 57, p. 611-616, 1998.

VELKOVA, Z. I.; GOCHEVA, V. K.; KOSTOV, G.; ATEV, A. Optimization of nutritive media composition for hylanase production by *Aspergillus awamori*. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 13, p. 651-656, 2007.

ARTIGO 3: EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ENDO-XILANASE PRODUZIDA PELA LEVEDURA *Cryptococcus laurenti* .

EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ENDO-XILANASE PRODUZIDA PELA LEVEDURA *Cryptococcus laurenti*.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade de endo-xilanase bem como estudar as melhores condições para alcançar a máxima atividade enzimática produzida por *Cryptococcus laurenti*. Para tais avaliações, ensaios foram realizados usando cinco fontes de nitrogênio em duas concentrações diferentes. Através dos resultados obtidos foi possível observar que na presença de nitrato de amônio e sulfato de amônio (fontes inorgânicas de nitrogênio), na concentração de 3%, foram alcançadas as maiores atividades de endo-xilanase (6,2 $U.mL^{-1}$ e 6,0 $U.mL^{-1}$ respectivamente). A seguir um planejamento completo 2^2 foi realizado visando uma maximização da atividade de endo-xilanase, onde as variáveis xilana e extrato de levedura foram estudadas. Em todos os ensaios, os cultivos foram mantidos a 30°C, 175 rpm durante 96 h. As condições estabelecidas para maximizar a produção da enzima alvo foram: concentração de xilana de 18,6 $g.L^{-1}$, concentração de extrato de levedura de 10 $g.L^{-1}$ e sob estas condições atingindo 14,0 $U.mL^{-1}$, sendo esta enzima livre de celulase e com baixos níveis de β-xilosidase (0,006 $U.mL^{-1}$) o que garante a esta enzima diversas aplicações industriais.

Palavras-chave: xilanases, maximização da atividade, enzima.

1 INTRODUÇÃO

As endo-1,4-β-xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas produzidas principalmente por bactérias e bolores, que fazem a hidrólise dos substratos com ligações β- 1,4, sendo a xilana o principal representante dentre os substratos susceptíveis ao ataque hidrolítico das xilanases. Este polímero é o principal componente da hemicelulose e é composto por resíduos de β-xilopiranose, unidos por ligações β 1,4 com variáveis graus de substituições em suas cadeias laterais (HECK, 2006; JÄNIS, 2007; SANTOS, 2011).

As xilanases são enzimas que apresentam uma vasta possibilidade de aplicações, destacando-se especialmente na indústria de polpa e papel quando livres de celulases (BAE et

al., 2008; HAROS et al., 2002; JIANG et al., 2008), com expansão nas aplicações no setor de alimentos, principalmente usados como clarificantes de bebidas e agentes de melhoramento em panificação (TEUNISSEN; CAMP, 1993) e em rações animais aumentando a digestibilidade das mesmas (AHMAD et al., 2013; MATHLOUTHI, 2003; VIANA, 2011).

Ao se trabalhar com enzimas no âmbito industrial, visa-se a obtenção de altos rendimentos na produção e isso pode ser alcançado através de otimizações na produção utilizando como ferramenta planejamentos fatoriais que envolvam variáveis importantes processo produtivo. (LI et al., 2007). Entre os parâmetros do bioprocesso que podem afetar a atividade e produtividade das xilanases durante a fermentação incluem-se: o pH, a temperatura, as fontes de carbono e de nitrogênio. Esses fatores têm demonstrado influenciar na produtividade da xilanase em vários estudos, entretanto, as condições ótimas são únicas para cada micro-organismo e processo, por isso a necessidade de estudar cada componente em questão (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de diferentes fontes de nitrogênio e maximizar a atividade de endo-xilanase avaliando o efeito da concentração de xilana e extrato de levedura sobre a atividade da enzima endo-xilanases produzida pela levedura *Cryptococcus laurentii*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a levedura *Cryptococcus laurentii* a qual foi previamente isolada de chicória e selecionada como promissora na produção de endo-xilanase por Otero et al. (2015). Essa levedura foi mantida a 4 °C em ágar GYMP (2,0% glicose, 0,5 extrato de levedura, 1,0% extrato de malte e 0,2% Na_2PO_4).

2.2 PREPARO DO INÓCULO

As culturas foram transferidas do ágar GYMP e inoculadas para crescimento em meio complexo (10,0 $g.L^{-1}$ de xilana de *Beechwood*, 3,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 7,0 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 2,0 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 0,1 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4.7H_2O$, 1,0 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)SO_4$ e 5.0 $g.L^{-1}$ de peptona em pH 6,0. A esterilização dos meios foi realizada a 121 °C durante 15 min. Para o inóculo a levedura foi transferida para 150 mL de meio complexo (inóculo) e

cultivadas em erlenmeyers aletados com capacidade de 500 mL durante 24 h a 150 rpm e 30 °C em agitador orbital (LOPES et al., 2011).

Os cultivos de *Cryptococcus laurentti* foram iniciados através de uma suspensão celular (10^8 celulas. mL^{-1}) obtidas do inóculo com 24 h, e a esterilização dos meios foi conduzida conforme descrito anteriormente. Os cultivos foram realizados em meio complexo a 30ºC, 175 rpm por 96 h. Em intervalos de tempo apropriados, amostras dos cultivos foram retiradas para determinação da atividade de endo-xilanase, concentração celular e pH e as determinações realizadas em triplicata.

2.3 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

O meio de cultivo foi preparado conforme descrito por Otero et al.(2015) sendo realizada a retirada da peptona para avaliação. Em substituição á peptona diferentes fontes de nitrogênio foram usadas, sendo eles: nitrogênio orgânico (gelatina e uréia) e nitrogênio inorgânico (KNO_3, NH_4NO_3 e $(NH_4)_2SO_4$) (ADHYARU et al., 2014).As concentrações estudadas de cada fonte de nitrogênio acrescidas ao meio foram de 0,5 e 0,3 % (ADHYARU et al., 2014) sendo o meio ajustado para pH 6,5 (Tabela 1).

Tabela 1 - Condições para avaliação da atividade de endo-xilanase considerando o uso de diferentes fontes de nitrogênio.

Meio	**Composição ($g.L^{-1}$)**						
	Xilana	**Extrato levedura**	**Gelatina**	**Uréia**	**KNO_3**	**NH_4NO_3**	**$(NH_4)_2SO_4$**
1	10	10	5	-	-	-	-
2	10	10	-	5	-	-	-
3	10	10	-	-	3	-	-
4	10	10	-	-	-	3	-
5	10	10	-	-	-	-	3
6	10	10	3	-	-	-	-
7	10	10	-	3	-	-	-
8	10	10	-	-	5	-	-
9	10	10	-	-	-	5	-
10	10	10	-	-	-	-	5

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após avaliar os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio sobre as atividades de endo-xilanases, um planejamento central composto rotacional com adição de pontos axiais e centrais (DCCR 2^2) foi realizado. O DCCR 2^2 foi realizado usando duas variáveis (concentração de xilana e extrato de levedura) as quais foram definidas a partir dos resultados obtidos nos ensaios anteriores, sendo a atividade enzimática máxima usada como resposta. Foram fixadas a concentração de sulfato de amônio de 3 $g.L^{-1}$, 0,1 de $MgSO_4.7H_2O$ $g.L^{-1}$ e o pH foi ajustado em 6,5. Através da Tabela 2 pode-se observar os níveis codificados e reais que foram utilizados na realização do DCCR.

Tabela 2 - Valores dos níveis reais e codificados usados no DCCR para maximização da atividade de endo-xilanase.

Planejamento Experimental	**Nível codificado das variáveis**	**Xilana**	**Extrato de Levedura**
		$g.L^{-1}$	**$g.L^{-1}$**
DCCR (2^2)	*-1,41*	10	1
	-1	11,4	2,3
	0	15	5,5
	+1	18,6	8,7
	+1,41	20	10

A análise de variância foi aplicada ao DCCR com um nível de confiança de 95%. Para validar os resultados obtidos no estudo e finalizar a maximização de endo-xilanase, cultivos em triplicata com diferentes concentrações de extrato de levedura e a concentração de xilana fixada em 18,6 $g.L^{-1}$, foram realizados em triplicata, onde a concentração de extrato de levedura está descrita abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição dos meios de cultivo para os testes finais de maximização enzimática.

Meio	**Extrato de levedura ($g.L^{-1}$)**
1	8,7
2	10,0
3	12

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Determinações enzimáticas

A atividade de endo-xilanase foi determinada usando 1% (m/v) de xilana de *Beechwood* como substrato. A reação ocorreu usando 0,9 mL do substrato e 0,1 mL de extrato enzimático durante 5 min a 50º C conforme descrito por Bailey et al. (1992). A quantificação dos açúcares redutores liberados a partir da xilana, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959) e a quantidade de xilose foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol de xilose por minuto nas condições descritas do ensaio.

A atividade de β-xilosidase foi determinada através do substrato *p*-nitrofenil-b-D-xilopiranosídeo (*p*NPX) liberando *p*-nitrofenol. O meio reacional contêm 0,8 mL de *p*NPX (0,1% m/v) e 0,2 mL de extrato enzimático e a reação foi conduzida por 30 min a 50ºC (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987). A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de carbonato de sódio (10% m/v). O *p*-nitrofenol liberado pela ação da β-xilosidase foi determinado espectrofotometricamente a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a liberação de 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto.

A atividade de celulases foi determinada para Carboximetilcelulase (CMCase) e atividade total (FPase). CMCase foi determinada de acordo com metodologia descrita por Ghose (1989) onde o meio reacional é composto por 0,5 mL de substrato (solução de 2% de carboximetilcelulase) e 0,5 mL de extrato enzimático, sendo mantidos por 30 min a 50ºC. A quantificação dos açúcares redutores liberados foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959) e a quantidade de glicose foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. (MILLER, 1959). A atividade de celulases sob o substrato papel filtro foi conduzida conforme descrito por Ghose (1989) onde o meio reacional contêm 0,5 mL de extrato enzimático, 1,0 mL de tampão citrato de sódio (pH 5,3) e 50 mg de papel filtro Whatman nº1, sendo a reação mantida por 60 min a 50ºC. Uma unidade enzimática foi definida como 1 µmol de glicose liberado por minuto nas condições dos ensaios.

Para a determinação de todas as atividades enzimáticas foram conduzidos ensaios com brancos para as enzimas (enzima + tampão) e brancos para os substratos (tampão+

substrato) sendo estes valores subtraídos das atividades encontradas. Todas as determinações de atividades foram realizadas em triplicata.

2.5.2 Determinação de biomassa

A concentração de biomassa foi estimada através da medida de absorvância em espectrofotômetro a 620 nm, e relacionando as leituras da biomassa com as respectivas curvas de calibração (RECH et al., 1999).

2.5.3 Determinação de pH

Para determinação dos pH´s foram utilizados os meios de cultivo centrifugados e livres de células, os quais foram determinados em pHmetro digital.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para detectar diferenças significativas entre os tratamentos, usando o software *Statistic* versão 5.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

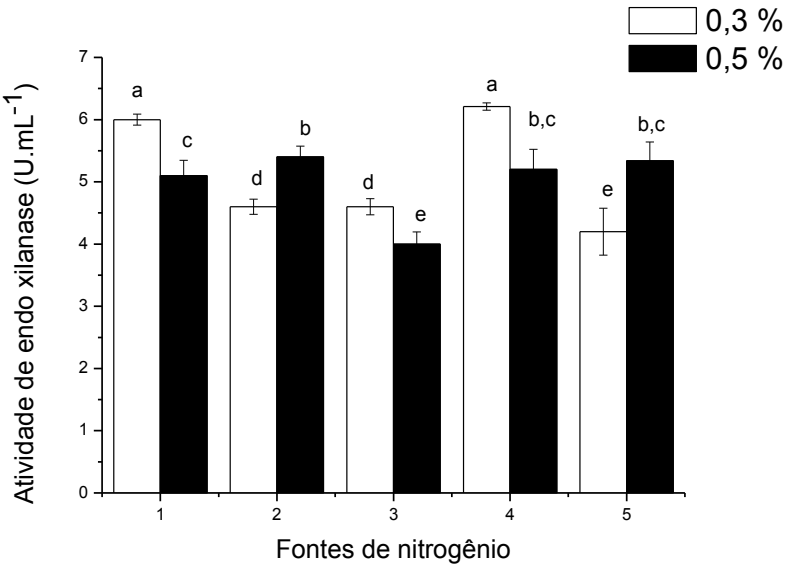
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (orgânico e inorgânico) sobre a atividade de endo-xilanase produzida pela levedura *Cryptococcus laurentti*, foram realizados cultivos removendo-se a peptona e inserindo-se fontes de nitrogênios nas concentrações de 0,5 e 0,3% (Figura 1).

A Figura 1 mostra que não há diferenças significativas entre as fontes de nitrogênio orgânico avaliadas neste trabalho. Os valores médios obtidos foram de 5,3 $U.mL^{-1}$ para uréia e 5,4 $U.mL^{-1}$ para gelatina na concentração de 0,5% . Por outro lado, as fontes de nitrogênio inorgânico diferem umas das outras em relação as fontes de nitrogênio orgânico. O valor mais baixo para a atividade enzimática (4,60 $U.mL^{-1}$) foi obtido quando se utilizou 0,5%

de KNO_3, indicando, assim, que este tem um efeito negativo (diminuição) sobre a atividade da endo-xilanases produzidas por *Cryptococcus laurentii.*

Figura 1 - Atividades de endo-xilanase obtidas de diferentes fontes de nitrogênio usando concentrações de 0,5% e 0,3%, sendo 1- $NH_4(SO_4)_2$, 2-gelatina, 3- KNO_3, 4-NH_4NO_3 e 5-uréia.



Barras verticais representam a média dos ensaios com os seus desvios e letras iguais nas médias dos resultados indicam que não há diferença significativa entre elas a 95% de confiança (teste de Tukey).

As melhores atividades foram observadas para concentrações de nitrogênio orgânico de 0,5% e para concentração nitrogênio inorgânico de 0,3%, resultados estes também observados por Adhyaru (2014) o qual verificou que 0,5% de gelatina e 0,3% de KNO_3 aumentavam a produção de endo-xilanase produzida por *Bacillus altitudinis.*

Segundo Santos et al., (2013) os estudos das fontes de nitrogênio no metabolismo das diferentes linhagens industriais são importantes na medida em que estes compostos apresentam uma complexidade estrutural e são fontes utilizadas pela levedura para um bom desempenho metabólico. O efeito da interação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio na eficiência fermentativa das leveduras industriais pode ser um fator importante para promover melhoria na eficiência fermentativa das leveduras industriais e melhorar a produção de enzimas.

As maiores atividades foram alcançadas quando foram adicionados ao meio de cultura com 0,3% de NH_4NO_3 ou $(NH_4)_2SO_4$ sendo que não há diferenças estatisticamente significativas entre eles, uma vez que as atividades alcançados foram de 6,2 e 6,0 $U.mL^{-1}$, respectivamente. Assim, os presentes resultados demonstraram que as fontes de nitrogênio

inorgânico (NH_4NO_3 e $(NH_4)_2SO_4$) poderiam ser usadas na concentração de 0,3% no meio de cultivo, considerando as condições estudadas para *Cryptococcus laurentii*.

O objetivo desta mudança é também uma tentativa para evitar a possível supressão da produção da enzima, reduzindo as concentrações e componentes do meio; isto também pode ser considerado uma vantagem econômica para o custo de produção de endo-xilanase em geral.

Otero et al. (2014) em trabalhos anteriores, observaram que quando foram utilizadas altas concentrações de peptona (12,5 $g.L^{-1}$) acompanhada de extrato de levedura (12,5 $g.L^{-1}$), houve influência na produção de endo-xilanase. Assim sendo, acredita-se que pode ter acontecido uma inibição da produção enzimática.

Magasanik (1992) observou que nem todas as fontes de nitrogênio propiciam crescimento igualmente eficiente para as leveduras, onde foi observado que amônia, glutamato, glutamina, e aspargina são preferencialmente utilizadas por leveduras e induzem a altas taxas de crescimento e produção de metabólitos de interesse.

Sherief et al. (2010) estudou diferentes fontes de nitrogênio para produção de enzimas onde os bons resultados foram obtidos em uréia e NH_4NO_3. Qinnghe et al (2004) compararam a atividade xilanolítica utilizando fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas, onde as fontes orgânicas conduziram uma maior atividade.

Para alcançarmos a maximização enzimática foi realizado um planejamento experimental (DCCR 2^2) onde foram estudadas as concentrações de xilana e extrato de levedura, mantendo o sulfato de amônio em 0,3%, uma vez que este componente já estava presente na formulação incial dos meios de cultivo, e o resultado expresso em atividade de endo-xilanase (Apêndice 6).

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para a atividade enzimática com as duas variáveis estudadas: xilana (X1) e concentrações de extrato de levedura (X2) onde a atividade máxima variou entre 4,7 e 12,5 $U.mL^{-1}$, sendo esta alcançada em 36 h de cultivo.

Tabela 4 - Valores reais, codificados do planejamento experimental DCCR (2^2) tendo como resposta a atividade de endo-xilanase.

Ensaio	Xilana	Extrato de Levedura	Máxima atividade ($U.mL^{-1}$)
1	+1 (18,6)	+1 (8,7)	12,5
2	+1 (18,6)	-1 (2,3)	8,3
3	-1 (11,4)	+1 (8,7)	10,7
4	-1 (11,4)	-1 (2,3)	6,1
5	0 (15,0)	0 (5,5)	8,1
6	0 (15,0)	0 (5,5)	9,2
7	0 (15,0)	0 (5,5)	8,5
8	0 (15,0)	0 (5,5)	8,7
9	0 (15,0)	0 (5,5)	8,5
10	+1,41 (10,0)	0 (5,5)	6,4
11	0 (15,0)	1,41 (10,0)	9,8
12	-1,41 (20,0)	0 (5,5)	9,5
13	0 (15,0)	-1,41 (1,0)	4,7

Os efeitos principais e as interações estimadas para a atividade da endo-xilanase foram calculados. As variáveis dependentes e independentes foram ajustadas a um modelo e analisadas em termos de qualidade do ajuste.

Uma análise de variância foi utilizada para avaliar a adequação do modelo ajustado. O modelo codificado foi considerado preditivo (uma vez que o R^2 apresentado foi de 0,81 e o $F_{calculado}$ foi 3 vezes maior do que $F_{tabelado}$), e pode ser usado para gerar a superfície de resposta para os efeitos sobre a atividade de endo-xilanase de acordo com a Equação 1.

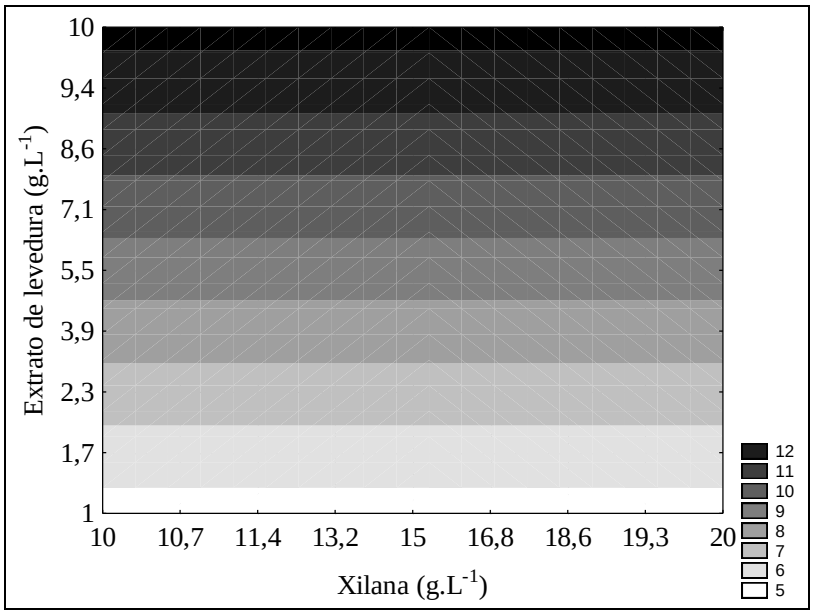
Atividade ($U.mL^{-1}$) = 8,48 + 3,89 (X2) (1)

Sendo:

X2= extrato de levedura

Uma visão geral da Eq.1 indica que a atividade é uma função de primeira ordem da concentração de extrato de levedura. O modelo codificado para a atividade endo-xilanase foi utilizado para construir a curva de contorno apresentada na Figura 2, para se visualizar as interações entre as variáveis de entrada e a concentração de cada componente necessário para a maximização da atividade enzimática. O coeficiente de regressão e ANOVA para o DCCR 2^2 encontram-se no Apêndice 7.

Figura 2- Curvas de contorno para a atividade de endo-xilanase em função da concentração de extrato de levedura e xilana.



Através da curva de contorno apresentada na Figura 2 é possível observar que o extrato de levedura influência na produção enzimática, uma vez que conforme a concentração de extrato de levedura é aumentada a atividade de endo-xilanase também se eleva, assim, buscando elevar a produção de endo-xilanase. Para fins de validação, os autores escolheram trabalhar com três formulações de meios, em triplicata, com diferentes concentrações de extrato de levedura. O acompanhamento das atividades encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade de endo-xilanase em diferentes formulações de meios de cultivo

	Concentração de extrato de levedura ($g.L^{-1}$)	**Endo-xilanase ($U.mL^{-1}$)**					
Experimentos		**0 h**	**24 h**	**36 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Meio 1	8,7	$0,7^{a,D}$	$10,0^{b,B}$	$12,4^{b,A}$	$10,2^{b,B}$	$6,8^{b,C}$	$6,0^{b,C}$
Meio 2	10,0	$0,6^{a,F}$	$12,0^{a,C}$	$14,0^{a,A}$	$13,5^{a,B}$	$10,3^{a,D}$	$8,2^{a,E}$
Meio 3	12,0	$0,5^{a,F}$	$7,0^{c,B}$	$11,4^{c,A}$	$6,4^{c,C}$	$4,8^{c,D}$	$4,2^{c,E}$

Letras iguais nas médias dos resultados (colunas) indicam que não há diferença significativa entre elas a 95% de confiança (teste de Tukey). Letras maiúsculas iguais nas médias dos resultados (linhas) indicam que não há diferença significativa entre elas a 95% de confiança (teste de Tukey).

A partir da Tabela 5 observa-se que o meio que apresentou a melhor produção da enzima, (14 $U.mL^{-1}$ em 36h de cultivo), foi o meio 2 o qual é composto por: 18,6 $g.L^{-1}$ de xilana, 10,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 3 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio e o pH inicial de 6,5. Observou-se que houve um aumento estatisticamente significativo na atividade da enzima em comparação com as atividades obtidas no ensaio 1 (o qual corresponde ao melhor ensaio do DCCR), isto indica que as condições empregadas foram bem escolhidas, permitindo a produção máxima da enzima.

Após o estudo, foi possível obter uma atividade elevada (14,0 $U.mL^{-1}$). Lopes et al., (2011) visando otimizar a atividade enzimática da enzima, usou dois planejamentos experimentais (DCC^2 e Plackett & Burman), o qual obteve a máxima atividade de endo-xilanase de 11,25 $U.mL^{-1}$ nas condições de 30ºC, pH 6,0 e 20 $g.L^{-1}$ de xilana.

No meio que proporcionou a melhor atividade enzimática (meio 2) foi realizado novo cultivo e determinados além da atividade de endo-xilanase outros parâmetros como biomassa, atividades enzimáticas (celulases e β-xilosidase) e pH em 36 h de cultivo, onde os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Atividade enzimática de CMCase, FPase, β-xilosidase e endo-xilanase em 36 h de cultivo em meio content 18,6 $g.L^{-1}$ de xilana, 10,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura e 3,0 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio em pH 6,5

Resposta avaliada	Resultado
Endo-xilanase	13,25 ± 0,4 ($U.mL^{-1}$)
β-xilosidase	0,0058 ± 0,0005 ($U.mL^{-1}$)
CMCase	0,22 ± 0,03 ($U.mL^{-1}$)
FPase	0,07 ± 0,03 ($U.mL^{-1}$)
pH final	8,5
Biomassa	4,4± 0,1 ($g.L^{-1}$)

A importância de determinar celulases e β-xilosidase é definir a aplicação da enzima. Como os níveis de β-xilosidase foram muito baixos esta xilanase pode ser aplicada para produção de xilo-oligossacarídeos (XOS), uma vez que β-xilosidases são glicosil hidrolases que catalisam a liberação de unidades de xilose a partir de xilo-oligossacarídeos derivados da degradação da xilana (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2000). Os XOS

apresentam um grande potencial de utilização em vários produtos, principalmente os farmacêuticos e em aplicações agrícolas (MENEZES, 2008).

Observa-se também que esta levedura foi capaz de produzir xilanases livres de celulases e assim pode ser aplicada no branqueamento de papel e polpa Kraft, sem causar perdas ao produto final e diminuindo o uso de compostos organoclorados (BAE, 2008).

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho observou-se que as fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico estudadas apresentaram influência sobre a atividade de endo-xilanase. Para as fontes orgânicas (gelatina e uréia) a melhor concentração foi de 5,0 $g.L^{-1}$ sendo que os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa entre as atividades (5,2 e 5,3 $U.mL^{-1}$ respectivamente) enquanto que para as fontes inorgânicas a concentração indicada foi de 3 $g.L^{-1}$, sendo que as melhores fontes para a atividade, foram o sulfato e nitrato de amônio, alcançando 6,0 e 6,2 $U.mL^{-1}$ respectivamente. Além disso, uma maior atividade de endo-xilanase (14,0 $U.mL^{-1}$) foi alcançada após o delineamento composto central rotacional utilizando 18,6 $g.L^{-1}$ de xilana, 10 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 3,0 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio, pH 6,5 agitação de 175 rpm e 30ºC. Uma vez que a xilanase produzida pela levedura *Cryptococcus laurentti* é livre de celulase e com níveis muito baixos de β-xilosidase, a enzima apresenta uma ampla gama de aplicações desde fármacos e produção de XOs até branqueamento de papel.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS, R. M. **Principles of Microbiology**. 2a ed., Boston, WCB/MacGrall-Hill, 1997, 1298p.

BAE, H. J.; KIM, H. J.; KIM, Y. S. Production of a recombinant xylanase in plants and its pot ential for pulp biobleaching applications. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3513-3519, 2008.

CAI, Q.; YUE, X.; NIU, T.; JI, C.; MA, Q. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemestry**, v. 39, p. 1561-1566, 2004.

ELLOUZE, O., FATTOUCH, M., MESTIRI, F., ANIBA M.R., MARZOUKI,M.N.. Optimization of extracellular xylanase production by *Sclerotina sclerotium S2* using factorial desing. **Indian Journal Biochemestry and Biophysical**, v. 45, p. 404-409, 2008.

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

KARADUMAN, Y.; GOKCAN ,C.; ONAL, L. Effect of enzymatic pretreatment on the mechanical properties of jute fiber-reinforced polyester composites. **Journal of composites Materials**, v. 22, DOI 002199832446826, 2013.

KIM, J.H.; KIM, S.C.; NAM, S.W. Constitutive overexpression of the endoxylanase gene in *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 10, p. 551-553, 2000.

LEMOS, J.L.S.; FONTES, M.C.D.; PEREIRA,N. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. **Applied Biochemestry and Biotechnology,** v. 91, p. 681-689, 2001.

LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C.C.P.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI-FILHO, F. Thermo-stable xylanases from non-conventional yeasts. **Journal of Microbiology and Biochemical Technology,** v. 3, p. 36-42, 2011.

MAGASANIK, B. **Regulation of nitrogen utilization**. In: BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; JONES, E. W. (Ed). The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression, New York: Cold Spring Harbor, v. 2, p. 283, 1992.

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 587-592, 2008.

OTERO, D.M.; CADAVAL,C.L.; TEIXEIRA,L.M.; ROSA,C.A.; BRAGA, A.R.C.; KALIL,S.J. Maximização da produção de endo xilanase de *Cryptococcus laurentti*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: COBEQ, 2014. 1 CD-ROM.

OTERO, D.M.; CADAVAL,C.L.; TEIXEIRA,L.M.; ROSA,C.A.; SANZO, A.V.L.; KALIL,S.J. Screening of yeast capable of producing celullase-free xylanase. **African Journal of Biotechnology,** v. 14, p. 1961-1969, 2015.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.;CHENG, J. QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1561–1566, 2004.

SALES, M.R.; MOURA, R.B.; MACEDO, G.R.; PORTO, A.L.F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 45, p. 1290–1296, 2010.

SANTOS, E. F. S.; SCHAUTZ, L. C. A.; CARDOSO, C. A. L.; FERNANDES, J. R.; BATISTOTE, M. The effect of the structural complexity of the carbon and nitrogen source in the fermentative performance of industrial yeast. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 35, n. 2 , p. 009-014, 2013.

SHERIEF,A.A.; EL-TANASH,A.B; ATIA, N. Cellulase Production by Aspergillus fumigatus Grown on Mixed Substrate of Rice Straw and Wheat Bran. **Research Journal of Microbiology,** v. 5, p. 199-211, 2010.

SENTHILKUMAR, S.R.; ASHOKKUMAR, K.C.; RAJ, K.C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by Aspergillus fischeri Fxn in solid-state fermentation using central composite rotary desing. **Bioresouce Technology,** v. 96, p. 1380-1386, 2005.

SUBRAMANIAN, S.; PREMA, P. Optimization of cultural parameters for the synthesis of endo-xylanases from *Bacillus sp*. SSP-34. **Journal Science Industrial Research,** v. 57, p. 611-616, 1998.

TEUNISSEN, M.J.; CAMP, H.J.M.O. Anaerobic fungi and their cellulolytic enzymes. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 63, n. 1, p. 63-76, 1993.

VELKOVA, Z. I., GOCHEVA, V. K., KOSTOV, G., & ATEV, A. Optimization of nutritive media composition for hylanase production be *Aspergillus awamori*. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 13, p. 651-656, 2007.

ARTIGO 4: SELEÇÃO DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTES DE XILANA EM CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE ENDO-XILANASE

SELEÇÃO DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTES DE XILANA EM CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE ENDO-XILANASE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir xilanases utilizando substratos agroindustriais ricos em hemicelulose como fontes de xilana nos meios de cultivo para duas leveduras. Cinco substratos agroindustriais (casca de arroz, casca de aveia, tegumento de soja, farelo de arroz desengordurado e sabugo de milho) foram utilizados neste trabalho como fonte de xilana para produção enzimática. Os ensaios foram realizados com substratos sem pré-tratamento (secos e moídos) e ensaios no qual os subtratos foram secos, moídos e pré-tratados com NaOH (4%) para alterar a estrutura da biomassa e tornar seus componentes mais disponíveis para o ataque microbiano. Os substratos foram adicionados na concentração de 2%, e os cultivos foram mantidos durante 96 h e retiradas alíquotas para determinação do pH e atividade enzimática. Duas leveduras foram utilizadas nestre trabalho, sendo a *Cryptococcus laurentii* isolada e *Pichia pastoris* Y-1603 obtida em banco de culturas. Dentre os coprodutos utilizados o que mais se destacou frente à produção da enzima foi o farelo de arroz desengordurado pré-tratado, o qual permitiu atingir uma atividade máxima de 8,7 $U.mL^{-1}$ em pH 7,3 enquanto que o sabugo de milho foi o coproduto que apresentou menor capacidade de produção enzimática (1,6 $U.mL^{-1}$) quando a levedura *Cryptococcus laurentti* foi estudada. Por sua vez, a levedura *Pichia pastoris* apresentou maior atividade enzimática quando foi cultivada em a casca de aveia e o farelo de arroz pré-tratados, alcançando atividades máximas de 7,6 e 7,5 $U.mL^{-1}$. Desta forma o farelo de arroz desengordurado merece um destaque especial frente aos demais coprodutos utilizados pois possibilitou substrato necessário e diponível para produção de endo-xilanases por leveduras.

Palavras-chave: resíduos, screening, enzimas

1 INTRODUÇÃO

A celulose e a hemicelulose são degradadas por enzimas hidrolíticas e oxidativas formando açúcares que serão metabolicamente utilizados por micro-organismos (WYMAN,

2013). Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando materiais ricos em hemicelulose como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado como é o caso das enzimas, em especial as xilanases (PANDEY 1999; REDDY et al., 2003; ROSALES et al., 2005; SOUZA et al. , 2006).

Os micro-organismos envolvidos na degradação da celulose e hemicelulose são encontrados em grupos taxonômicos extremamente variados (BÉGUIN; AUBERT, 1994). Estas enzimas são produzidas por bactérias, bolores e leveduras, mas a principal fonte comercial são os bolores (AGUIAR; FERRAZ, 2011; POLIZELI, 2005).

As enzimas obtidas a partir de micro-organismos vêm ganhando destaque, haja vista sua ampla aplicação na indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica e conversão da biomassa lignocelulósica. A produção industrial de enzimas microbianas é, geralmente, limitada pelo custo do substrato utilizado para o cultivo dos micro-organismos. Para tornar a produção de enzimas mais competitiva, a utilização de substratos de baixo custo e facilmente disponíveis deve ser explorada, além de avanços tecnológicos e da busca por novos micro-organismos (POLIZELLI et al., 2005; SUKUMARAN, 2009; TENGERDY e SZAKACS, 2003).

A endo 1,4 -β-xilanase (EC 3.2.1.8) forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que degrada, aleatoriamente, a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos (HALTRICH et al., 1996 ; KULKARNI et al., 1999).

A habilidade em hidrolisar xilana está restrita a limitado número de gêneros e/ou espécies. Dentre os gêneros de leveduras descritas na literatura como produtoras das enzimas endo-xilanases encontram-se a *Pichia* (AGBOGBO e COWARD-KELLY, 2008;; CARVALHO et al., 2013; LEE et al., 1986), *Cryptococcus* (CARVALHO et al., 2013; PARACHIN et al., 2009), *Aureobasidium* (LI et al., 2000; TANAKA et al., 2004; OHTA et al., 2001) e *Trichosporon* (LIU et al., 1998; SOUZA et al., 2010).

Toneladas de resíduos agrícolas são gerados pelas indústrias e estes podem ser utilizados como substrato para crescimento celular em processos de fermentação, o que além de ser economicamente viável, ajuda a solucionar os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza. Esses resíduos são constituídos de matéria orgânica (hemicelulose) que é usada como fonte de energia para o crescimento dos micro-organismos e o carbono para a síntese de biomassa celular (PANDEY et al., 1999; PANDEY, 2002), além de serem resíduos abundantemente disponíveis na região.

Devido à resistência do material lignocelulósico, muitos processos de produção têm sido desenvolvidos no intuito de converter os carboidratos presentes na biomassa em açúcares fermentescíveis, buscando por melhores rendimentos e menores custos de processamento (HIMMEL et al.,2007; SANTOS et al., 2010). Dentre esses processos estão os pré tratamentos, etapa que tem por finalidade alterar ou remover a lignina, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, o que acarreta em aumento na digestibilidade do complexo enzimático e, consequentemente, em elevados rendimentos em açúcar (SANTOS et al., 2010; WYMAN et al., 2003).

O uso de substratos agroindústrias para a produção de xilanases é amplamente descrito na literatura utilizando bolores (GOYAL et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2006; STROPARO et al., 2012) e bactérias (CUNHA, 2012; HECK et al, 2002; NINAWE e KUHAD, 2005;), porém o cultivo de leveduras utilizando substratos insdústriais é restrito, principalmente em cultivos submersos.

Assim sendo o objetivo deste trabalho foi produzir xilanases a partir de substratos agroindustriais ricos em hemicelulose como fontes da xilana nos meios de cultivo utilizando as leveduras *Pichia pastoris Y-1603* e *Cryptococcus laurenti.*

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMOS

Para verificar a capacidade das leveduras degradarem xilana foram realizados screening em placas contendo ágar xilana e a seleção realizada através da visualização de halos de hidrólise (OTERO et al., 2015).

A levedura *Pichia pastoris* Y-1603 foi obtida do banco de culturas ARS Culture Collection (NRRL) e estudada devido ao fato de ser uma levedura GRAS (Generally Recognized as Safe) e a *Cryptococcus laurentii* foi usada neste trabalho por ter sido isolada e selecionada em ensaios prévios (não apresentados) como uma levedura promissora frente à capacidade de produzir xilanase. As culturas foram mantidas em ágar GYMP inclinado (20 $g.L^{-1}$ glicose; 5 $g.L^{-1}$ extrato de levedura; 10 $g.L^{-1}$ extrato de malte; 2 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4 e 20 $g.L^{-1}$ ágar) e mantidas à 4 °C (MAUGERI, 2007).

2.2 SUBSTRATOS

Foram utilizados farelo de arroz desengordurado, casca de arroz, sabugo de milho, casca de aveia e tegumento de soja como fontes de xilana para a produção enzimática. Os substratos foram obtidos de industriais locais e cada um deles foi seco em estufa com circulação de ar (105ºC durante 5 h), moído em moinho de facas e submetidos a peneiramento para obter partículas com tamanho entre 0,300 mm e 0,355 mm (GOKHALE; BASTWADE, 1997).

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Cada substrato, com as partículas já padronizadas, foi tratado com NaOH 4% durante 30 min a 40ºC sob agitação para a disponibilização dos componentes da biomassa. Após os substratos foram lavados com água destilada até neutralização (SOUTHGATE, 1981).

2.4 PREPARO DO INÓCULO

As culturas foram transferidas do ágar GYMP e inoculadas para crescimento em meio complexo (10,0 $g.L^{-1}$ de xilana de *Beechwood*, 3,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 7,0 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 2,0 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 0,1 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4.7H_2O$, 1,0 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)SO_4$ e 5,0 $g.L^{-1}$ de peptona em pH 6,0. A esterilização dos meios foi realizada a 121 °C durante 15 min. Para o inóculo cada levedura foi transferidas para 150 mL de meio complexo e cultivadas em erlenmeyers aletados com capacidade de 500 mL durante 24 h a 150 rpm e 30 °C em agitador orbital (LOPES et al., 2011).

2.5 PRODUÇÃO DE XILANASE EM CULTIVOS SUBMERSOS USANDO SUBSTRATOS INDUSTRIAIS

As culturas (inóculo) foram transferidas para frascos erlenmeyers aletados com capacidade de 500 mL contendo 150 mL do mesmo meio de cultivo sendo a xilana substituída por 20,0 $g.L^{-1}$ de cada substrato agroindustrial com e sem pré-tratamento (Tabela 1) sendo inoculados com suspensão celular de 10^8 células. mL^{-1} obtidas após 24 h de inóculo, incubados em agitador rotatório orbital a 30 °C e 150 rpm.

Amostras foram coletadas ao longo de 96 h de cultivo sendo centrifugadas a 6.000 *x* g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante livre de células foi usado para determinação de pH e atividade enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados descritos como a média dos três ensaios.

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.6.1 Atividade enzimática

Atividade de endo-xilanase foi determinada conforme descrito por Bailey et al. (1992) usando como substrato a xilana de *Beechwood* 1%. Açúcares redutores foram determinados usando método DNS (MILLER, 1959). A xilose liberada foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de xilose por minuto sob as condições descritas.

2.6.2 Determinação de pH

Para determinação dos pH´s foram utilizados os meios de cultivo centrifugados e livres de células, os quais foram determinados em pHmetro digital.

2.6.3 Determinação da produtividade máxima

A produtividade enzimática máxima (*P*, $U.mL^{-1}.h^{-1}$) foi calculada em termos de atividade de endo-xilanase nas condições do melhor ensaio, através da equação 1:

$$P = \frac{A - A_0}{t - t_0} \quad (1)$$

Onde A_o é a produção enzimática inicial, *A* é a atividade de endo-xilanase no tempo de retirada da amostra, *t* é o tempo de cultivo em que a atividade máxima da enzima ocorre e t_0 é o tempo inicial do cultivo.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para detectar diferenças significativas entre os tratamentos, usando o software *Statistic* versão 5.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

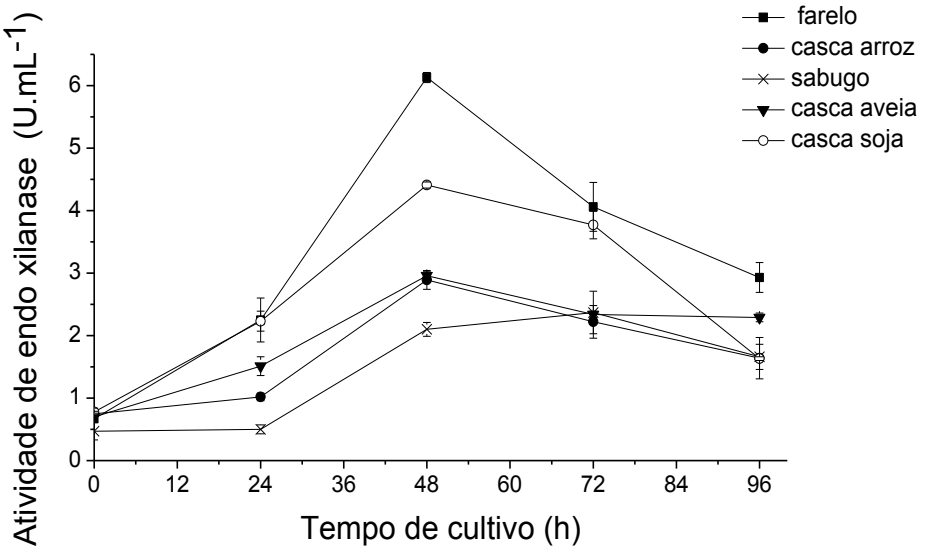
Buscando uma alternativa para minimizar os impactos ambientais gerados pelo acúmulo dos resíduos agroindustriais abundantes na região Sul do estado, utilizaram-se esses resíduos para verificar a capacidade desses, substituírem a xilana comercial presente nos meios de cultivo para produção de endo xilanases.

Além disso, foi estudada a influência e a necessidade da realização do pré-tratamento desses resíduos visando aumentar a disponibilidade da hemicelulose para a produção enzimática. Para isso foram realizados cultivos submersos com as leveduras *Pichia pastoris* Y-1603 pois dentre as leveduras testadas foi a que apresentou melhores halos de degradação da xilana (Apêndice 8) e *Cryptococcus laurentti* isolada em trabalhos anteriores (Otero et al., 2015), tendo como parâmetro de resposta a atividade de endo-xilanase.

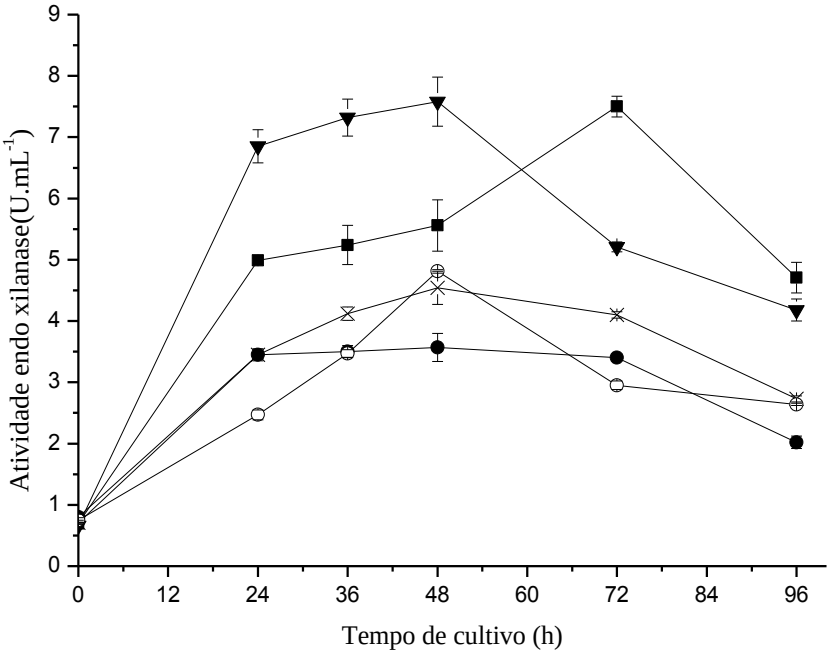
Através dos cultivos realizados com a levedura *Pichia pastoris* Y-1603 (Figura 1) pode-se observar que o substrato que mais se destacou frente à produção de endo-xilanases foi o farelo de arroz desengordurado. Em ambos cultivos (com pré tratamento alcaline e sem pré tratamento) este resíduo apresentou altas atividades para endo xilanase, sendo sua maior atividade de 7,5 $U.mL^{-1}$ quando o resíduo foi submetido a ação de hidróxido de sódio 4% para deslignificação.

A casca de aveia, apresentou uma maior fonte de hemicelulose, como substrato para a levedura produzir a enzima de interesse, quando pré tratada, onde a máxima atividade alcançada foi de 7,6 $U.mL^{-1}$. Quando esses dois resíduos são comparados frente à atividade de endoxilanase, não apresentam diferença estatísticas significativas entre sí.

Figura 1- Acompanhamento da produção de endo-xilanase pela levedura *Pichia pastoris* em meios contendo: (■) - farelo de arroz desengordurado; (●) - casca de arroz; (×) – sabugo de milho; (▼) - casca de aveia e (○) - tegumento de soja sem tratamento (a) e com pré-tratamento alcalino (b)

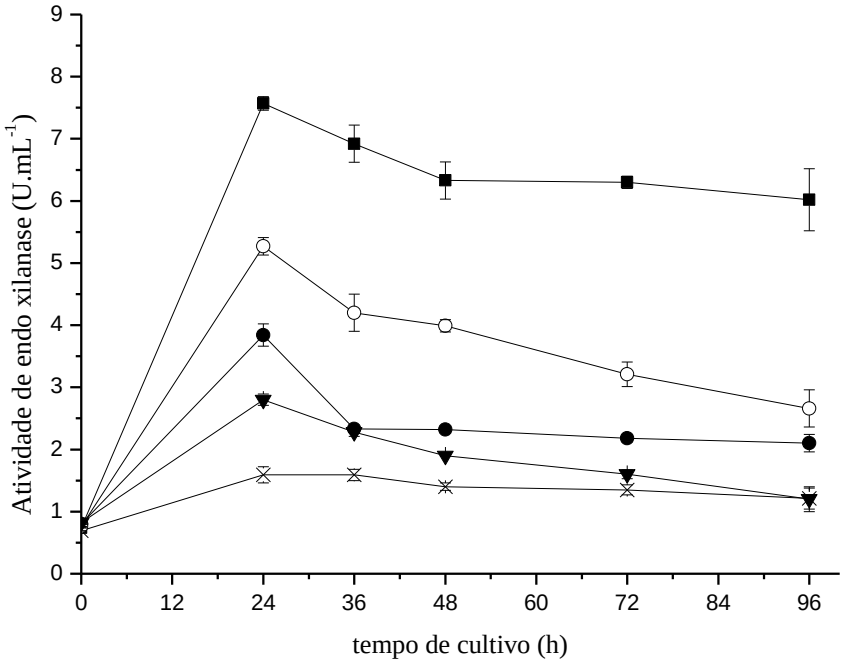


(a)

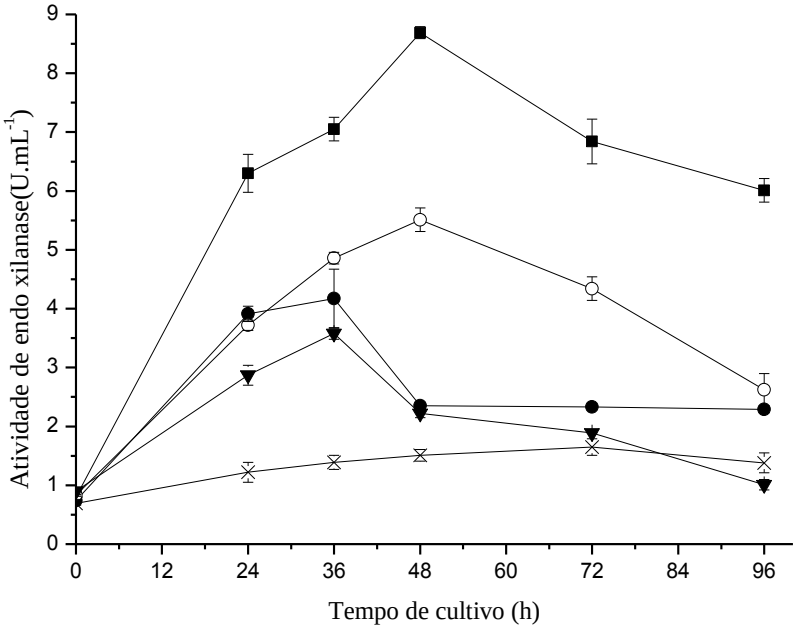


(b)

Figura 2- Acompanhamento da produção de endo-xilanase pela levedura *Cryptococcus laurentti* em meios contendo: (■) - farelo de arroz desengordurado; (●) - casca de arroz; (×) – sabugo de milho; (▼) - casca de aveia e (○) - tegumento de soja sem tratamento (a) e com pré tratamento alcalino (b)



(a)



(b)

A levedura *Pichia pastoris Y-1603* apresentou uma menor produção de endo-xilanase quando cultivada em meio à base de casca de arroz enquanto que a levedura *Cryptococcus laurentti* teve sua produção enzimática (Figura 2) diminuída quando a fonte de

xilana usada foi o sabugo de milho. Esses resultados indicam que cada micro-organismo apresenta um metabolismo e exigências nutricionais e de crescimento próprios, por esse motivo essas diferenças para os substratos são normais, pois cada levedura atua de uma forma em dado substrato.

O farelo de arroz desengordurado foi o substrato agroindustrial que melhor induziu a atividade enzimática para a levedura *Cryptococcus laurentti*, onde a atividade máxima atividade de endo-xilanase foi de 8,7 $U.mL^{-1}$ nos cultivos submersos utilizando o substrato pré-tratado.

O farelo de arroz desengordurado destaca-se como uma boa fonte de vitaminas do complexo B e E, sendo rico em vitamina A e ausente de vitamina D, o nível de proteína bruta do farelo é em torno de 15%, sendo superior à proteína do trigo e do milho (HAMADA, 2000; MASSARO e PINTO, 2002). Com relação à sua composição mineral, este é extremamente rico em fósforo e manganês, além dos níveis de cobre, ferro, cromo e zinco (CONTE, 2000), além da presença de biofenóis (RODRIGUES; PESSOA FILHO; MEIRELLES, 2004).

Harada (2008) utilizou farelo de arroz para produção de xilanases, sendo a hemicelulose do farelo utilizada como substrato a única fonte de carbono para *Paenibacillus sp*, o qual foi capaz de produzir xilanases (valores não apresentados).

Para todos os substratos agroindustriais, a realização do pré-tratamento promoveu um aumento na atividade enzimática, ocorrendo variações maiores (casca de aveia para a *Pichia*) e outras menores (sabugo de milho para *Cryptococcus*), porém sempre ocorreu o incremento.

O pré-tratamento realizado (NaOH 4%) nos materiais lignocelulósicos foi eficiente visto que a produção de endo- xilanase por *Pichia pastoris* em meio contendo casca de aveia aumentou de 3,0 $U.mL^{-1}$ para 7,6 $U.mL^{-1}$ e de 6,1 $U.mL^{-1}$ para 7,5 $U.mL^{-1}$ em farelo de arroz. Já quando a levedura *Cryptococcus laurentti* foi cultivada em farelo de arroz a atividade passou de 7,6 $U.mL^{-1}$, não tratado, para 8,7 $U.mL^{-1}$, tratado.

Os processos alcalinos de pré-tratamento utilizam condições moderadas de operações, em termos de temperaturas e pressões, em comparação com sistemas ácidos. O principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali tende a causar um inchamento da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma (BAUDEL, 2006; KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2001). Pelo inchaço da biomassa, a superfície é aumentada proporcionando maior abertura da estrutura para a água

migrar para dentro do material. Uma vez dentro da biomassa, a água rompe a ligação de hidrogênio entre a hemicelulose e a lignina (BALAT; BALAT; OZ, 2008). O efeito é a diminuição da cristalinidade e a ruptura da lignina.

Na literatura são encontrados relatos de pré-tratatamentos com NaOH na concentração de 4% para os subtratos agroindustriais utilizados como fonte de carbono em cultivos para a produção de xilanase. Almeida (2012), observou que o tratamento com solução de NaOH 4% durante 1 hora para o farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar foram eficientes na produção de xilanases utilizando os bolores *Trichoderma* e *Penicillium* em cultivos submersos. Manrich (2012) também utilizou este tratamento para pó de madeira de faia e bagaço de cana de açúcar, o qual foi satisfatório para a remoção da lignina visando a produção de xilo-oligossacarídeos. Estes autores indicam que o uso deste tipo de agente na concentração estudada resulta na baixa formação de agentes inibidores e assim não prejudica a produção enzimática.

Visto que a moagem dos substratos agroindustriais é considerada um pré-tratamento físico (REZENDE et al., 2011) existe a possibilidade do farelo de arroz ter sua hemicelulose exposta já nesta etapa do processo e por esse motivo não houve grande diferença na atividade de endo-xilanase produzida após o pré tratamento. Por outro lado, para a levedura *Pichia pastoris*, após o tratamento químico da casca de aveia, a atividade enzimática aumentou significativamente (250%), o que indica que mesmo após a moagem, ainda havia interação entre lignina-hemicelulose, indicando que o tratamento com NaOH 4% foi eficiente e necessário.

Além disso, observa-se que a produção enzimática está diretamente relacionada com o micro-organismo cultivado em um dado substrato, uma vez que a levedura *Pichia pastoris* apresentou maior atividade enzimática do que a *Cryptococcus laurentti*, ambas cultivadas em casca de aveia pré-tratada sob as mesmas condições de processo.

Substratos hemicelulósicos de baixo custo, como sabugo de milho, farelo de trigo, palha de trigo, bagaço de cana, farelo ou palha de arroz têm amplamente estudados para a produção de xilanases (ALMEIDA et al., 2012; BENEDETTI et al., 2009; LI et al., 2005; MANRICH et al., 2009; SONG et al., 2010), sendo usados para a produção enzimática utilizando micro-organismos diversos como: *Aspergillus* (KADOWAKI et al., 1997), *Aureobasidium* (KARNI et al., 1993), *Fusarium* (KUHAD et al., 1998), *Melanocarpus* (JAIN, 1995),*Termomyces* (PUCHART et al., 1999), *Bacillus* (GESSESSE; MAMO, 1999), *Clostridium* (RANI; NAND, 2000), *Streptomyces* (MAHESWARI; CHANDRA, 2009; TECHAPUN et al., 2002).

Carvalho et al. (2013) isolou leveduras do cerrado de Minas Gerais e selecionou uma cepa de *Cryptococcus laurentti* como potencial produtora de xilanase. Esta levedura foi cultivada em diversos substratos agroindustriais (bagaço e palha de cana, sabugo de milho, farelo de trigo e casca de cacau) apresentando máxima atividade (1,6 $U.mL^{-1}$) quando cultivado em meio líquido contendo farelo de trigo, sendo esta atividade inferior aquela encontrada quando a levedura foi cultivada em meio contendo xilana (2,1 $U.mL^{-1}$). Para os meios contendo palha de cana e sabugo de milho não foi observada produção enzimática.

Para os cultivos realizados, foram determinadas as produtividades das leveduras *Pichia pastoris* e *Cryptococcus laurentti* frente à produção de endo-xilanases nos meios contendo substratos agroindustriais como fontes de hemicelulose, onde os resultados encontram-se apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Produtividade da levedura *Pichia pastoris* frente à produção enzimática em diferentes substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento, bem como as máximas atividades de endo-xilanase.

	Sem pré-tratamento	**Com pré-tratamento**	**Sem pré-tratamento**	**Com pré-tratamento**
Fonte de xilana	**Máxima atividade de endo-xilanase ($U.mL^{-1}$)**	**Máxima atividade de endo-xilanase ($U.mL^{-1}$)**	**Produtividade máxima ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)**	**Produtividade máxima ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)**
Farelo de arroz desengordurado	6,13±0,10 [a]	7,50± 0,20[a]	0,11± 0,040[a]	0,18±0,021[b]
Casca de arroz	2,89±0,15[c]	3,57±0,23[c]	0,04± 0,001[c]	0,11±0,016[c]
Sabugo de milho	2,37±0,34[d]	4,54±0,30[b]	0,03±0,002[d]	0,11±0,012[c]
Casca de aveia	2,96±0,10[c]	7,58±0,40[a]	0,05±0,001[c]	0,26±0,020[a]
Tegumento de soja	4,41±0,05[b]	4,81±0,03[b]	0,07± 0,002[b]	0,08±0,002[d]

*Letras diferentes minúsculas nas colunas indicam que as médias são estatisticamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

A máxima produtividade enzimática (endo-xilanase) alcançada nos cultivos utilizando casca de aveia pode ser observada para a levedura *Pichia pastoris* foi capaz de alcançar 0,26 $U.mL^{-1}.h^{-1}$ no substrato agroindustrial com tratamento alcalino, sendo seguida pelos cultivos contendo farelo de arroz desengordurado também tratado.

Usando a levedura *Cryptococcus laurentti* nos cultivos contendo substratos agroindustriais, a maior produtividade alcançada pela levedura em termos de atividade de endo-xilanase foi observada no farelo de arroz desengordurado, seja ele com ou sem tratamento prévio, o que demonstra que este susbtrato apresenta ser uma ótima fonte de xilana com disponibilidade de ser usada pela levedura como substrato para a produção enzimática. Por outro lado observa-se que o sabugo de milho foi o substrato agroindustrial que proporcionou uma menor produtividade enzimática.

Tabela 2 - Produtividade da levedura *Cryptococcus laurentti* frente à produção enzimática em diferentes substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento, bem como as máximas atividades de endo-xilanase.

	Sem pré-tratamento	**Com pré-tratamento**	**Sem pré-tratamento**	**Com pré-tratamento**
Fonte de xilana	**Máxima atividade de endo-xilanase ($U.mL^{-1}$)**	**Máxima atividade de endo-xilanase ($U.mL^{-1}$)**	**Produtividade máxima ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)**	**Produtividade máxima ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)**
Farelo de arroz desengordurado	$7,57\pm0,11^{a}$	$8,69\pm0,10^{a}$	$0,28\pm 0,021^{a}$	$0,23\pm0,019^{b}$
Casca de arroz	$3,84\pm0,20^{c}$	$4,17\pm0,50^{c}$	$0,13\pm0,010^{d}$	$0,13\pm0,014^{d}$
Sabugo de milho	$1,59\pm0,15^{e}$	$1,65\pm0,15^{e}$	$0,04\pm0,001^{g}$	$0,02\pm0,003^{h}$
Casca de aveia	$5,27\pm0,15^{b}$	$5,51\pm0,20^{b}$	$0,19\pm0,003^{c}$	$0,12\pm0,009^{d,e}$
Tegumento de soja	$2,8\pm0,10^{d}$	$3,58\pm0,10^{d}$	$0,08\pm0,001^{f}$	$0,08\pm0,003^{f}$

*Letras diferentes minúsculas nas colunas indicam que as médias são estatisticamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho observou-se que a casca de aveia e o farelo desengordurado de arroz foram potenciais fontes de hemicelulose para o cultivo de leveduras visando à produção de endo-xilanase através de cutivos submersos, onde o pré-tratamento com hidróxido de sódio a 4% auxiliou de forma positiva na atividade enzimática de endo-xilanase. Isso pode ter sido possível através da disponibilidade de açúcares fermentescíveis, inchamento da biomassa, quebra da matriz lignocelulósica a qual expõe os carboidratos ou até mesmo remoção da lignina e celulose presentes na biomassa. Por sua vez, observa-se também que a capacidade de produzir a enzima está relacionada diretamento com a capacidade do micro-organismo e não só dos substratos agroindustriais.

4 CONCLUSÃO

A atividade de endo-xilanase produzida pelas leveduras estudadas (*Pichia pastoris* e *Cryptococcus laurentti*) apresentou resultados satisfatórios quando cultivadas em meios contendo substratos agroindustriais como fonte de xilana. Para a levedura *Cryptococcus laurentti*, o melhor indutor foi o farelo de arroz desengordurado, uma vez que a atividade máxima encontrada foi 8,7 $U.mL^{-1}$ com o substrato pré-tratado enquanto que a levedura *Pichia pastoris* Y-1603 apresentou sua melhor condição para produção de endo-xilanase quando cultivada em meio contendo casca de aveia tratada (7,6 $U.mL^{-1}$).

Deve-se levar em consideração que as fontes de xilana disponíveis nos substratos agroindustriais não são purificadas, apenas tratada com solução de NaOH 4% e por esse motivo, talvez ainda possam ser realizados métodos de extração ou purificação dessas hemiceluloses e com isso um possível aumento da atividade enzimática.

Desta maneira, o aproveitamento de susbtratos agroindustriais lignocelulósicos como fontes de xilana para processos biotecnológicos realizados com o objetivo de produzir endo-xilanses é uma alternativa econômica frente ao uso de xilana comercial e ambientalmente viável, pois irá agregar valor a esses resíduos podendo reduzir um problema ambiental causado pelo seu acúmulo excessivo.

O uso de hidróxido de sódio 4% como pre tratamento dos resíduos agroindustriais não é válido, uma vez que a atividade enzimática não sofreu grandes alterações e esse processo acaba gerando mais resíduos no ambiente, sendo assim os cultivos devem ser realizados com os materiais hemicelulósicos em estudo apenas moídos e secos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeasts *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters,** v. 30, p. 1515–1524, 2008.

ALVES, L. A.; et al. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemestry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 89-98, 1998.

BALAT, M.; BALAT, H.; O'ZB, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.

BEGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 25-58, 1994.

CARVALHO, F.; P.; DE SOUZA, A.; C.; MAGALHÃES-GUEDES, K.; T.; DIAS, D.; R.; SILVA, C.; F.; SCHWAN, R.; F. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 4176-4190, 2013.

CUNHA,C.C.Q.B. **Caracterização de celulases e xilanases produzidas por *Streptomyces sp* cultivado em resíduos lignocelulósicos**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, Goiânia, Goiás. 2012.

FELIPE, M.G.A. et al. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 18, p. 251-254, 1997.

FELIPE, M.G.A. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. In: SAHA, B.C.; HAYASHI, K. (eds**.) Lignocellulose Biodegradation**; American Chemical Society, cap. 18, 2004.

HAMADA J. S. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 305–310, 2000.

HARADA, M.H.; TANAKA, K.; FUKUDA, Y.; HASHIMOTO,W.;MURATA,K. *Paenibacillus sp*. Strain HC1 xylanases responsible for degradation of rice bran hemicellulose. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p.293-298, 2008.

HECK,J.X.;HERTZ,P.F.; AYUB, M.A.Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 33, p. 213-218, 2002.

HIMMEL, M.E., DING, S.Y., JOHNSON, D.K., ADNEY, W.S., NIMLOS, M.R.,BRADY, J.W., FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresourses and Technology**, v. 97, p. 583–591, 2006.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. Potential Source of Energy and Chemical Products. **The Biotechnology of Ethanol**. Seções 5-8. 2001

LIU, W.; ZHU,W.; LU,Y.; KONG,J.; MA,G. Production, partial purufucation and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum SL-409*. **Process Biochemestry**, London, v. 33, p. 331-336, 1998.

MASSARO, A. F.; PINTO, L. A. de A. Enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado com sangue bovino, utilizando a técnica de leito de jorro. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 67, p. 77-84, 2002.

NACZK, M.; SHAHIDI, F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 1523-1545, 2006.

NINAWE, S.; KUHAD, R.C. Use of xylan rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by Streptomyce cyaneus SN 32. J. **Applied Microbiology**, v. 99, p. 1141-1148, 2005.

OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L.F., TAMBOURGI, E.B. Production of xylanase and protease by Penicillium janthinellum CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 862-867, 2006.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed - bed Column bioreactor for Production of Enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 14, p. 486- 488, 1992.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 2, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A . Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1-4, 2002.

POLIZELI, M.L.T.M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 67, p. 577-591, 2005.

REDDY, G. V.; BABU, P.R.; KOMARAIAH, P.; ROY, K.R.R.M.; KOTHARI, I.L Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and P. sajor caju). **Processing Biochemestry**, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2003.

REZENDE, C.R.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuel**, v. 4, p. 1-12, 2011.

RODRIGUES, C.E.C.; PESSOA FILHO P. A.; MEIRELLES, A.J.A. Phase equilibrium for the system rice bran oil fatty acids ethanol water γ-oryzanol tocols. **Fluid Phase Equilibria**, v. 216, p. 271–283, 2004.

ROSALES, E.; COUTO S. R.; SANROMÁN, M. A. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by Trametes hirsuta. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 4, p. 419-423, 2005.

SANTOS, F.A.; DE QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T.; Potential of sugarcane straw for ethanol production. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SENE, L.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G.; SILVA, S.S. Effect of enviromental conditions on xylose reductase and xylitol dehidriogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemestry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 371-380, 2000.

SOUZA, O.C. **Caracterização queratinolítica, xilanolítica e otimização da produção de xilanases por culturas de *Trichosporon***. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Faculdade de Biologia, Recife, 2010.

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

SUKUMARAN, R. K.; SHINGHANIA, R. R.; MATHEW, G.M.; PANDEY,A. Cellulase prodution using biomass feed stok and its aplication in lignocellulose saccharification for bio-ethanol prodution. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SILVA, M.A.; SANCHES, C.; AMANTE, E.R. Prevention of Hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v.75, v.4, p. 487-491, 2006.

SOUZA, D. F.; TYCHANOWICK, G.K.; DE SOUZA, C.G.; PERALTA, R.M. Co-production of ligninolytic enzymes by Pleurotus pulmonarius on wheat bran solid state cultures. **Journal Basical Microbiology**, v. 46, n. 2, p.126-134, 2006.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 169-179, 2003.

WYMAN, C.E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals and power. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 254-262, 2003.

ZHAO, L.; GENG,J.; GUO,Y.; LIAO,X.; LIU,X.; WU,R.; ZHENG,Z.; ZHANG, R. Expression of the Thermobifida fusca xylanase Xyn11A in *Pichia pastoris* and its characterization. **BMC Biotechnology,** v. 15, n.18, p. 2-12, 2015.

CAPITULO IV
CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

4 CONCLUSÃO GERAL

Através deste estudo foi possível isolar 119 leveduras a partir de fontes alimentícias e resíduos agroindustriais, e destas, sete foram selecionadas como potenciais produtoras da enzima xilanase. As leveduras foram estudades frente à capacidade de produzir endo–xilanases em meio complexo através de cultivos submersos, sendo a levedura 18Y (*Cryptococcus laurentti*) selecionada como a melhor produtora por atingir atividade de 2,7 $U.mL^{-1}$para endo-xilanase, valores inferiores a 0,11 $U.mL^{-1}$ para β-xilosidade e ser livre de celulases e por esse motivo pode ser aplicada em diversas áreas como na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, branqueamento de papel, entre outras.

Esta levedura foi submetida a estudos, usando a técnica de planejamento experimental, visando a maximização da atividade enzimática para endo-xilanase. Para isso dois planejamentos experimentais foram realizados: um planejamento fracionário 2^{6-2} e um delineamento composto central rotacional 2^4 com pontos axiais. No primeiro estudo as variáveis estudadas foram pH inicial, concentração de xilana, extrato de levedura, peptona, fosfato e sulfato de amônio. Através deste foi possível alcançar a atividade de 5,4 $U.mL^{-1}$. Com base nos resultados obtidos no planejamento fracionário foram definidas as variáveis do planejamento completo onde o pH e as concentrações de de xilana, peptona e extrato de levedura foram estudados, sendo fixada a concentração de sulfato de amônio em 1 $g.L^{-1}$ (apresentou efeito negativo) e o fosfato monobásico removido do meio, uma vez que a melhor condição não usou fosfato no meio. Assim foi possível obter atividade enzimática de 6,93 $U.mL^{-1}$ em meio composto por 10 $g.L^{-1}$ de xilana, 10 $g.L^{-1}$ de peptona e 10 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura em pH inicial de 6,5. Além disso foram estudadas três diferentes velocidades de agitações (150, 175 e 200 rpm) para os meios de cultivos, onde a atividade atingiu 7,3 $U.mL^{-1}$ com agitação de 175 rpm e o pico da produção foi em tempo reduzido (36 h de cultivo), sendo assim possível obter aumento significativo da atividade de endo-xilanase usando a levedura isolada.

Após a maximização enzimática foram estudados os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas frente à atividade de xilanase, para tal foram usadas como fontes de nitrogênio orgânicos gelatina e uréia e como nitrogênio inorgânico KNO_3, NH_4NO_3 e $(NH_4)_2SO_4$) em duas concentrações diferentes (3 e 5 $g.L^{-1}$). Pode-se observar que as maiores atividades obtidas foram encontradas em NH_4NO_3 (6,2 $U.mL^{-1}$) na concentração de $3g.L^{-1}$. Após este estudo um planejamento completo 2^2 foi realizado tendo como variáveis a concentração de xilana e extrato de levedura. A máxima atividade foi alcançada (12,5 $U.mL^{-1}$)

quando o meio de cultivo foi compostos por 18,6 $g.L^{-1}$ de xilana e 10 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura. Através da construção de uma curva de contorno para as variáveis xilana e extrato de levedura observou-se que o aumento da concentração de extrato de levedura indicava também um aumento na atividade enzimática e por esse motivo, três novas concentrações de extrato de levedura foram estudadas. Observou-se que ao manter a concentração de 18,6 $g.L^{-1}$ de xilana e aumentando a concentração de extrato de levedura para 10 $g.L^{-1}$ e 3 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio, a atividade enzimática atingiu em 36 h de cultivo seu máximo (14,01 $U.mL^{-1}$). Assim sendo o objetivo deste trabalho foi concluído uma vez que a atividade final da enzima endo-xilanase foi de 14,01 $U.mL^{-1}$ e baixos níveis de celulases e β-xilosidase.

Visando o aproveitamento de substratos agroindustriais pelas leveduras *Cryptococcus laurentti* e *Pichia pastoris* Y-1603 para a produção de endo-xilanase em cultivos submersos contendo substratos agroindustriais como: farelo de arroz desengordurado, casca de arroz, sabugo de milho, casca de aveia e tegumento de soja foram realizados. Estes foram moídos e utilizados como fonte de xilana nos cultivos. Foi verificada também a necessidade de pré-tratamento alcalino (NaOH, 4% durante 30 min) nesses susbtratos onde foram realizados cultivos com e sem tratamento e seus resultados avaliados conforme a atividade enzimática produzida. Foi possível observar que o pré-tratamento para todos as fontes de hemicelulose foi eficiente e promoveu aumento nas atividades produzidas. *Cryptococcus laurentti* apresentou maior atividade enzimática (8,7 $U.mL^{-1}$) em farelo de arroz desengordurado e pré-tratado, enquanto que a levedura *Pichia pastoris* Y-1603 apresentou sua melhor condição para produção de endo-xilanase quando cultivada em meio contendo casca de aveia tratada. Estes resultados indicam que os substratos agroindustriais tratados física e químicamente são uma excelente fonte de xilana para o cultivo de leveduras e produção enzimática, fornecendo opções para problemas ambientais, agregando valor a esses substratos, bem como diminuição do valor gasto para a produção do bioproduto.

A partir dos resultados obtidos nestre trabalho foi possível alcançar os objetivos propostos, uma vez que foi possível isolar uma levedura com capacidade de degradar xilana e esta através de diferentes estudos apresentou um incremento na sua atividade final (14,0 $U.mL^{-1}$) frente a inicial (2,7 $U.mL^{-1}$) de 418%. Além disso, foi possível obter, a partir de farelo de arroz desengordurado, uma atividade de endo-xilanase elevada, tanto com cultivos com *Pichia pastoris* quanto com *Cryptococcus laurentti*.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Purificar parcialmente a endo-xilanase produzida por *Cryptococcus laurentii* através de técnicas mais simples como precipitação e diálise;
- Realizar a caracterização enzimática quanto ao pH e temperatura ótimos, $V_{máx}$ e Km;
- Verificar a capacidade da enzima para a produção de xilo-oligossacarídeos e identificar os possíveis compostos formados através de cromatografia líquida de alta performance;
- Avaliar a possível aplicação da enzima produzida em produtos alimentícios, branqueamento de papel, fármacos e rações animais;
- Estudar diferentes concentrações dos substratos agroindustriais usados como substratos para a produção de endo-xilanases;
- Testar diferentes pré-tratamentos (alcalinos, enzimáticos e ácidos) para remoção da lignina presente nos substratos agroindustriais e assim verificar a influência da deslignificação sobre a produção enzimática;

CAPITULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SATER, M.A.; EL-SAID, A.H.M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrias wastes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p. 15-21, 2001.

ADESINA, F.C.; ONILUDE, A.A. Isolation, identification and screening of xylanase and glucanase-producing microfungi from degrading wood in Nigeria. **African Journal Agricultural Research**, v. 8, p. 4414 – 4421, 2013.

AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeasts *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**. v. 30, p. 1515–1524, 2008.

AGUIAR, A., FERRAZ, A. Revisão: Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Quimica Nova**, v. 34, p. 1729-1738, 2011.

AHMAD. Z.; BUTT, M.S.; HUSSAIN, R.; AHMED, A.; RIAZ, M. Effect of oral application of xylanase on some hematological and serum biochemical parameters in broilers. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 3, p. 388-390, 2013.

ALAM, M.Z.; MUYIBI, S.A.; WAHID, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4709-4716, 2008.

ALVES, L. A.; et al. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemestry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 89-98, 1998.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp*. For the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 325-330, 2002

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

ANAGNOSTAKIS. S.L.; HANKIN, L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. **Journal Milk Food Technolology**, v. 38. p. 570 – 572, 1975.

ANDRADE, S.V. **Estudos comparativos das -xylosidases poduzidas por *Aspergillus versicolor* cultivado em xilana ou xilose como únicas fontes de carbono**. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

ANDRADE, S.V.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A. Effect of carbon source on the biochemical properties of -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemestry**. v. 39, p. 1931-1938, 2004.

ARAUJO, J.H.B.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Bleaching of kraft pulp with commercial xilanases. **Applied Biochemestry Biotechnology**, v. 79, p. 713-722, 1999.

ARCHANA, A.;SATYNARAYANA,T. Xylanase production by *Thermophilic bacillus* licheniformis A99 in solid- state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p 12-17, 1997.

ATLAS, R. M. **Principles of Microbiology**. 2. ed. Boston: WCB/MacGrall-Hill, 1997. 1298 p.

BAE, H. J.; KIM, H. J.; KIM, Y. S. Production of a recombinant xylanase in plants and its pot ential for pulp biobleaching applications. **Bioresource Technology**, 99, p. 3513-3519, 2008.

BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTNEN, K. Interlaboratory testing of methodos for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23: 257-270. 1992.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D,F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BALAT, M.; BALAT, H., O'ZB, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BASARAN, P.; OZSCAN, M. Characterization of β- xylosidase enzyme from a Pichia stipitis mutante. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 38-43, 2009.

BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2010.

BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.S.; GOKHALE, D.V. Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 220-224, 1994.

BEG, Q.K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BEGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 25-58, 1994.

BENASSI. M. V.; DE LUCAS, R. C.; MICHELIN, M.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI,L,M,T. Production and action of an *Aspergillus phoenicis*enzymatic pool using different carbon sources. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15,p. 253-260, 2012.

BENEDETTI, A.C.E.P. **Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase**. 2009. 108 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

BIELY, P.; VRSANKA, M.; KRATKY, Z. Xylan degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. Identification and cellular localization. **European Journal Biochemestry**, v. 108, p. 313-321, 1980.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.

BOCCHINI, D. A.; ALVES-PRADO, H. F.; BAIDA, L. C.; ROBERTO, I. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using responde surfasse methodology. **Process Biochemestry**, v. 38, p. 727-731, 2002.

BODDIREDDY, S.; CHARYA, S. Isolation, identification and screening of potencial cellulose-free xylanase producting fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 4624-4630, 2011.

BOONMAK,C.; LIMTONG,S.; JINDAMORAKOT,S.; AM,N,S.; MANITCHAI,W.; ICHIRO S. W.; NAKASE,T.; KAWASAKI, H. *Candida xylanilytica* sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from Thailand. **International Journal Systems Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 1230–1234, 2011.

BUCHERT, J.; RANUA, M.; KANTELINEM, A.; VIIKARI, L. The role of two Trichoderma reesei xilanases in the bleaching of kraft pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 825-829, 1992.

CACAIS, A.O.G.; SILVEIRA, F.Q.P.; FERREIRA FILHO, E.X. Production of xylan-degrading enzymes by a *Trichoderma harzianum* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 3, p. 141-143, 2001.

CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1338-1342, 2009.

CAMACHO, N.A.; AGUILAR, O.G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xilanase from *Aspergillus sp*. and its application in bakery. **Applied Biochemestry and Biotechnology**, v. 104, p. 159-172, 2003.

CAI, Q.; YUE, X.; NIU, T.; JI, C.; MA, Q. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemestry**. v. 39, p. 1561-1566, 2004.

CARVALHO, S. A. D.; FURTADO, A. T. O melhoramento genético de cana de açúcar no Brasil e o desafio das mudanças climáticas globais. **Management and Connections Journal**, v. 2, p, 22-46, 2004.

CARVALHO, F.; P.; DE SOUZA, A.; C.; MAGALHÃES-GUEDES, K.; T.; DIAS, D.; R.; SILVA, C.; F.; SCHWAN, R.; F. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 4176-4190, 2013.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, J. O. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHANDRA, R. O.; EWANICK, S. M.; CHUNG, P. A.; AU-YEUNG, K.; RIO, L. D.; MABEE, W.; SADDLER, J. L. Comparasion of methods to assess the enzyme accessibility and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1217-1222, 2009

CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolitic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 413-433, 2006.

CRAUFRIER, F.; MARTINOU, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. **Carbohydrates. Research**. v 338, p. 687-692, 2003.

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

COWARD-KELLY, G.; AIELLO-MAZZARI, C.; KIM, S.; GRANDA, C.; HOLTZAPLLE, M. Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulose activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, p. 745-749, 2003.

CUNHA,C.C.Q.B. **Caracterização de celulases e xilanases produzidas por *Streptomyces sp* cultivado em resíduos lignocelulósicos**. 2012, 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás. 2012.

CZJZEK, M.; DAVID, A.B.; BRAVMAN, T.; SHOHAM, G.; HENRISSAT, B.; SHOHAM, Y. Enzyme-substrate complex structures of a GH39 -xylosidase from *Geobacillus stearothermophillus*. **Journal Molecular Biologycal,** v. 353, p. 838-846, 2005.

DAMIANO, V.B.; SILVA, R. Aplicação de xilanase termoestável do *Bacillus licheniformis* - 2 a pasta Kraft de eucalipto. **Revista UNORP**, v. 2, p. 41-47, 2003.

DEBYSER, W. DERDELINCKX, G.; DELCOUR, J.A. Arabinoxylan solubilization and inhibition of the berley malt system by wheat during mashing with wheat whole meal adjunct, evidence for a new class of enzyme inhibitors in wheat. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 55, p. 153-157, 1997.

DERVILLY, G.; LECLERCQ, C.; ZIMMERMAN, D.; ROUE, C.; THIBAULT, J.F.; SAULINER, L. Isolation and characterization of high molecular mass water- 93 soluble arabinoxylans from barley malt. **Carbohydrates Polymers**, v. 47, p. 143-149, 2002.

DE PAULA, E, H.; FARIA, F. P.; BARBOSA, C. D.; CORNELIO, I. N.; PEREIRA, L. R.; AZEVEDO, M. O. Sacarificação de compostos lignocelulósicos pelo extrato enzimático do fungo *Humicola grisea var. thermoidea*. Anais da Enzitec, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.

ELLOUZE, O.; FATTOUCH, M.; MESTIRI, F.; ANIBA M.R.; MARZOUKI,M.N. Optimization of extracellular xylanase production by *Sclerotina sclerotium S2* using factorial desing. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v.45, p. 404-409, 2008.

FARIA, F. P. **Clonagem, Caracterização e Análise de Expressão de um gene de xilanase (Hxyn2) do Fungo *Humicola grisea var. thermoidea***. 2000. 183f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade de Brasília, 2000.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO,M.; MANCILHA,I.M.; SILVA.S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal Industrial Microbiology**, v. 18, p. 251-254, 1997.

FELIPE, M.G.A. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. In: SAHA, B.C.; HAYASHI, K. (eds.) **Lignocellulose Biodegradation**; American Chemical Society, cap. 18, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERREIRA, G.; BOER, C.G.; PERALTA, R.M. Production of xylanolytic enzymes by *Asperillus tamarii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiologycal Letters**, v. 173, p. 335-339, 1999.

FLORES, M.E.; PÉREZ, R.; HUITRÓN, C. β-xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces sp*. CH-M-1035. **Letters Applied Microbiology**, v. 24, p. 410-416, 1997.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C.S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. **Enzyme Research**, p. 1-7, 2012.

GANGA, M.A.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombiant wine yeast strain expressing the Aspergillus nidulans xlnA gene. **International Journal Food Microbiology**, v. 47, n. 3, p.171-178, 1999.

GEOK, L. P.; RAZAK, C. N. A.; RAHMAN, R. N. Z. A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B.Isolation and screening of and extracellular organic solvent-tolerant protease producer. **Biochemical Engeering Journal**, v. 13, p. 73-77, 2003.

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

GOKHALE,D.V.; PATIL,S.G.; BASTAWDE,K.B. Potential application of yeast cellulose-free xylanase in agrowaste material treatment to remove hemicellulose fractions. **Bioresource Technology**, v. 63, n. 2, p. 187-191, 1998.

GOMES, D.J.; GOMES, J. ; STEINER, W. Factors influencing the induction of endoxylanase by *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Biotechnology**, v. 33, p. 87 – 94, 1994.

GOTTSCHALK, L.M.F.; PAREDES, R.S.; TEIXEIRA, R.S.S.; SILVA, A.S.; BON, E.P.S. Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, B-xylosidase, ferulic acid esterase ando B-glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 569-576, 2013.

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

GRABBER, J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability. A review of cell wall model studies. **Crop Science**, v. 45, p. 820-831, 2005.

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

GUIMARÃES, L.H.S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; RIZZATI, A.C.S.; SANDRIM, V.C.; ZANOELO, F.F.; AQUINO, A.C.M.M.; JUNIOR, A.B.; POLIZELI, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37. p. 474-480, 2006.

HAAPALA,R.;LINKO,S.;PARKKINEN,E.;SOUMINEN,P. Production o fendo-1,4-L-glucanase and xylanase by *Trichoderma reesi* immobilized on polyurethane foam. **Biotechnology and Technology,** v. 8, p. 401-406, 1994.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D; STEINER, W.; ZUPANIC, S. Production of fungal xilanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1996.

HAMADA J. S. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 305–310, 2000.

HARADA, M.H. et al. Paenibacillus sp. Strain HC1 xylanases responsible for degradation of rice bran hemicellulose. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 293-298, 2008.

HARBAK, L.; THYGESEN, H.V. Safety evaluation of a xilanase expressed in Bacillus subtilis. **Food Chemestry Toxicology**, v. 40, p. 1-8, 2002.

HECK,J.X.;HERTZ,P.F.; AYUB,M.A.Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal Microbilogy,** v. 33, p. 213-218, 2002.

HERNALSTEENS S., MAUGERI F.; Partial Purification and Characterization of Extracellular Fructofuranosidase with Transfructosylating Activity from *Candida* sp**. Food Bioprocess Techonologycal,** v. 3, p. 568–576, 2010.

HIMMEL, M.E., DING, S.Y., JOHNSON, D.K., ADNEY, W.S., NIMLOS, M.R., BRADY, J.W., FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

ITO,K.OGASSAWARA,J.SUGIMOTO,T.;ISHIKAWA,T. Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 547-550, 1992.

JEFFRIES, T.W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**, v. 1, p. 163-176, 1983.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, D.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus:* characterization of two isozymes. **Journal Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 155-163, 1998.

KANEKO, S.; SHIMASAKI, T.; KUSAKABLE, I. Purification and some properties of intracellular -L-arabinofuranoside from *Aspergillus niger* 5- 16. **Bioscience Biotechnological and Biochemestry**, v. 57, p. 1161-1165, 1993.

KARADUMAN, Y, GOKCAN C, ONAL L. Effect of enzymatic pretreatment on the mechanical properties of jute fiber-reinforced polyester composites. **Journal of composites Materials**, v. 22, p. 1293-1302, 2013.

KO, C.H., LIN, Z.P., TU, J., TSAI, C.H., LIU, C.C., CHEN, H.T., WANG, T.P. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 13–19. 2005.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. Potential Source of Energy and Chemical Products. The **Biotechnology of Ethanol**. Seções 5-8. 2001.

KIM, J.H.; KIM, S.C.; NAM, S.W. Constitutive overexpression of the endoxylanase gene in *Bacillus subtilis*. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 551-553, 2000.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresources and Technology**, v. 97, p. 583–591, 2006.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xilanases. **FEMS Microbiology Review**, v. 23, p. 411-456, 1999.

LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T.; BARKER, J.S.F. *Kadomaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 172-177, 1999.

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

LEMOS, J.L.S., FONTES, M.C.D., PEREIRA,N. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. **Applied Biochemestry and Biotechnology,** v. 91, p. 681-689, 2001.

LEMOS, J.L.S.; PEREIRA, J. N. Produção de xilanases por *Aspergillus awamori* e a determinação do seu peso molecular por eletroforese em condições desnaturantes. **Acta Scientiae & Technicae**, v. 1, p. 45-52, 2013.

LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C.G.M.; MOREIRA, F.G.; PERALTA, R.M. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemestry,** v. 38, p. 1775-1780, 2003.

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS. R.; TOLAN, J.; KIM, J.S.; ERIKSSON K.E.L. Relationships between activities of xilanases and xylan structures. **Enzyme Microbiol Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000.

LIU, W.; ZHU,W.; LU,Y.; KONG,J.; MA,G. Production, partial purufucation and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum SL-409*. **Process Biochemestry**, London, v. 33, p. 331-336, 1998.

LOPES F, MOTTA F, ANDRADE CCP, RODRIGUES MI, MAUGERI-FILHO F. Thermo-stable xylanases from non-conventional yeasts. **Journal of Microbiology Biochemestry Technology**, v. 3, p. 36-42, 2011.

MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. In: BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; JONES, E. W. (Ed). **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression**, New York: Cold Spring Harbor, v.2, p.283, 1992.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461- 488, 2000.

MALADADI, R.B.; RAGHAVENDRA, S.; KUMAR, S.V. Production of cellulose-free xylanase from a novel yeast strain used from biobleaching in paper industry. **Research Journal of Microbiology,** v. 2, p. 24-33, 2007.

MASSARO, A. F.; PINTO, L. A. de A. Enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado com sangue bovino, utilizando a técnica de leito de jorro. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 67, p. 77-84, 2002.

MATHLOUTHI, N.; MOHAMED, M.A.; LARBIER, M. Effect of enzyme preparation containing xylanase and ß-glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean meal based diets. **British Poultry Science**, v. 44, p. 60-66, 2003.

MATSUO, M.; ENDOU, A.; OKADA, T.; YAMAOKA, Y. Purification and characterization of -xylosidase from *Thermoascus sp.*.**Journal Fermentation and Bioengineer**, v. 86, p. 403-405, 1998.

MAUGERI,F.; HERNALSTEENS,S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49 p. 43–49, 2007.

MEDEIROS, R.G.; SILVA, L.P.; AZEVEDO, R.B.; SILVA JR, F.G.; FILHO, E.X. F. The use of atomic force microscopy as a tool to study the effect of a xylanase from *Humicola grisea var. thermoidea* in kraft pulp bleaching. **Enzymes Microbiology and Technology**, v. 40, p. 723-731, 2007. .

MENDOZA, N.S.; CALIWARA, T.E.M.; UNCIANO, N.M. A Local Isolate of Non-cellulolytic, xylanolytic, and pectinolytic thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* C_{1a}. **Philippine Journal of Science**, v. 135, p. 113-119, 2006.

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, p. 587-592, 2008.

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

MONTI, R. **Produção de celulase e xilanase pelo fungo termófilo Humicola grisea variedade thermoidea RP-17: fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas.** 1989. 169 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1989.

MOTTA, F. B. **Triagem, seleção, produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres**. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MORAES, W. P.; FARIA, F. P.; AZEVEDO, M. O. Produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo termofílico *Humicola grisea var. thermoidea* em diferentes substratos. 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, p.121, 2002.

MUSSATO, S.I.; FERNANDES, M.; MILGRES, A.M.F. Enzimas poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**, v. 41, p. 28–33, 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 41, p. 1523-1545, 2006.

NAGAR, S., MITTAL, A., KUMAR, D., KUMAR, L., KUHAD, R.C., GUPTA, V.K. Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV- 85S using wheat bran under solid state fermentation. **New Biotechnology**, v. 28, p. 581-587. 2011.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V.K. A cost effective method for screening and isolation of xylan degrading of bacteria using agro waste material. **Asian Journal Biologycal Science**, v. 5, p. 384-394, 2012.

NAWEL, B., SAID, B., ESTELLE, C., HAKIM, H., DUCHIRON, F. Production and partial characterization of xylanase produced by Jonesia denitrificans isolated in Algerian soil. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 519–525, 2011.

NINAWE, S.; KUHAD, R.C. Use of xylan rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyce cyaneus* SN 32. **Journal Applied Microbiology**, v. 99, p. 1141-1148, 2005.

NOR, Z. M.; TAMER, M. I.; MEHRVAR, M.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; JERVIS, E. J. Improvement of intracellular β-galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 845-849, 2001.

OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L.F., TAMBOURGI, E.B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 862-867, 2006.

OTERO, D.M.; CADAVAL,C.L.; TEIXEIRA,L.M.; ROSA,C.A.; BRAGA, A.R.C.; KALIL,S.J.Maximização da produção de endo xilanase de *Cryptococcus laurentti*. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, SC, 2014.

OTERO, D.M.; CADAVAL,C.L.; TEIXEIRA,L.M.; ROSA,C.A.; SANZO, A.V.L.; KALIL,S.J. Screening of yeast capable of producing celullase-free xylanase. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 1961-1969, 2015.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed - bed Column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 14, p. 486- 488, 1992.

PANDEY, A. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

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

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1- 4, 2002.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUES, H.; DOMÍNGUES, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1, Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 191-201, 1998.

PASTORE, G.M. Isolamento de micro-organismos produtores de invertase lactase e aproveitamento para a produção de prébioticos industriais**.** IX Feira de Ciência e Arte. UNICAMP, Campinas- SP, 2010.

PATEL, R.N.; GRABSKI, A.C.; JEFRIES, T.W. Cromophore release from kraft by purified *Spremomices roseiscleroticus* xilanase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 405-412, 1993.

PATEL R.N. Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceutics. **Enzyme Microbiology Technology**, v.31, p. 804-826, 2002.

PEIXOTO, A.B. **Estudo da capacidade produtiva de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil**. 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PETRESCU, I.; LAMOTE-BRASSEUR, J.; CHESSA, J.P.; NTARIMA, P.; CLAEYSSENS, M.; DEUREESE, B.; MARINO, G.; GERDAY, C. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. **Extremophiles**, v. 4, p. 137-144, 2000.

PIRROTA, D. P. B. R.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C.S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para a produção de enzimas envolvidas na bioconversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, DOI: 10.1590/0103-8478cr20141241, 2015.

PIZARRO A.V.L., PARK E.Y.; Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1077-108, 2003.

POLIZELLI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENZI, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577- 591, 2005.

PRADE, R.A. Xylanases, from biology to biotechnology. **Biotechnology General Engineer,** v. 13, p. 101-131, 1995.

PUCHART, V.; BIELY, P. A simple enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl -1,4- D-xylobioside, a chromogenic substrate for assay and differentiation of endoxilanases. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 576-586, 2007.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.;CHENG, J. QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1561–1566, 2004.

RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** 2010. 454 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2010.

RAJAGOPALAN G, YEW KW, HE J, YONG KL. Production, purification and characterization of a xylooligosaccharides forming xylanase from high butanol producing strain *Clostridium sp* BOH3. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 448-457, 2013.

RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Letters Applied Microbiological**, v. 47, p. 9-24. 2008.

RECH, R.; CASSINI, C.F.; SECCHI, A.; AYUB, M. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of b-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

REDDY, G. V.; BABU, P.R.; KOMARAIAH, R.; ROY, K.R.R.M.; KOTHSARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus species* (P. ostreatus and P. sajor caju). **Processing Biochemestry**, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2003.

REZENDE, C.R.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuel**, v. 4, p. 1-18, 2011.

RIBEIRO, L.F.C.; RIBEIRO, L.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, L.T.M. Screening of filamentous fungi for xylanases and cellulases not inhibited by xylose and glucose. **British Biotechnology Journal**, v. 4, p. 30-39, 2014.

RIZZATTI, A.C.S. Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolítico do fungo **Aspergillus phoenicis**. 2004. 148 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

RODRIGUES, C.E.C.; PESSOA FILHO P. A.; MEIRELLES, A.J.A. Phase equilibrium for the system rice bran oil fatty acids ethanol water γ-oryzanol tocols. **Fluid Phase Equilibria**, v. 216, p. 271–283, 2004.

ROSA, C.A.; LACHANCE, M.A.; TEIXEIRA, L.C.R.S.; PIMENTA, R.S.; MORAIS, P.B. *Metschnikowia cerradonensis sp. Nov.*, a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitibulid beetles in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 161-165, 2007.

ROSALES, E.; COUTO S. R.; SANROMÁN, M. A. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **Journal of Food Engineering,** v. 66, n. 4, p. 419-423, 2005.

SAHA, B. Purification and properties of an extracellular -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresource technology**, v. 90, p. 33- 38, 2003.

SALES, M.R.; MOURA, R.B.; MACEDO, G.R.; PORTO, A.L.F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 45, p. 1290–1296, 2010.

SHAO, W.; WIEGEL, J. Purification and characterization of thermostable - xylosidase from *Thermoanaerobacter ethnolicus*. **Journal Bacteriologycal**, v. 174, p. 5848-5853, 1992.

SANNIGRAHI, P.; MILLER, S.; RAGAUSKAS, A. J. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. **Carbohydrates Research**, v. 345, p. 965-970, 2010.

SANTOS F.A., QUEIRÓZ J.H., COLODETTE J.L., FERNANDES S.A., GUIMARÃES V.M., REZENDE S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quimica Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, E. F. S.; SCHAUTZ, L. C. A.; CARDOSO, C. A. L.; FERNANDES, J. R.; BATISTOTE, M. The effect of the structural complexity of the carbon and nitrogen source in the fermentative performance of industrial yeast. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 35, p. 009-014, 2013.

SÁ-PEREIRA, P.; MESQUITA, A.; DUARTE,J.C.; BARROS,M.R.A.; COSTA-PEREIRA, M. Rapid production of thermostable celulase-free xylanase by strain of *Bacillus subtilis* and its properties. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 30, p. 924-933, 2002.

SAMANTA, A.K.; KOLTE, A.P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; JAYAPAL, N. A simple and efficient diffusion technique for assay of endo β-1,4-xylanase activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1349-1353, 2011.

SANGHI, A.; GARG, N.; KUHAR, K.; KUHAD, C.R.; GUPTA, K.V. Enhanced production of celulase – free xylanase by alkalophilic *Bacillus subtilis* ash and its application in biobleaching of kraft pulp. **Bioresource Technology**, v. 3, p. 1109-1129, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial.** Edgard Blücher LTDA, São Paulo, SP, 2001.

SENE, L.; VITOLO, M.; FELIPE, M.G.; SILVA, S.S. Effect of enviromental conditions on xylose reductase and xylitol dehidriogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemestry and Biotechnology**, v. 84, p. 371-380, 2000.

SENTHILKUMAR, S.R, ASHOKKUMAR, K.C, RAJ, K.C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn in solid-state fermentation using central composite rotary desing. **Bioresouce Technology**, v. 96, p. 1380-1386, 2005.

SHARMA A.D., KAINTH S., GILL P. K.; Inulinase production using garlic (*Allium sativum)* powder as a potential substrate in *Streptomyces sp*. **Journal of Food Engineering**, v.77, p. 486-491, 2006.

SHERIEF,A.A.; EL-TANASH,A.B; ATIA, N. Cellulase Production by *Aspergillus fumigatus* Grown on Mixed Substrate of Rice Straw and Wheat Bran**. Research Journal of Microbiology,** v.5, p. 199-211, 2010.

SILVA, M.A.; SANCHES, C.; AMANTE, E.R. Prevention of Hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v.75, v.4, p. 487-491, 2006.

SOUZA, O.C. **Caracterização queratinolítica, xilanolítica e otimização da produção de xilanases por culturas de *Trichosporon***. 2010.97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de fungos) – Faculdade de Ciências Biológicas, Recife, 2010.

SOUZA, D. F.; TYCHANOWICK, GK.; DE SOUZA, C.G.; PERALTA,R.M. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. **Journal Basical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 126-134, 2006.

SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 72, n.3, p. 253-260, 2000.

STEINER, W.; LAFFERTY, R.M.; GOMES, I.; ESTERBAUER, H. Studies on a wild type strain of *Schizophyllum commune*: Cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide schizophyllan. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 169–178, 1987.

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

SUBRAMANIAN, S.; PREMA, P. Optimization of cultural parameters for the synthesis of endo-xylanases from *Bacillus sp*. SSP-34. **Journal Science Industrial Research,** v. 57, p. 611-616, 1998.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 1-20, 2000.

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

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase prodution using biomass feed stok and its aplication in lignocellulose saccharification for bio-ethanol prodution. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fracional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolitic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Review Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresouce Technology**, v. 83, p. 1-11. 2010.

SWEETT, M.S.; WINANDY, J.E. Influence of degree of polymerization of cellulose and hemicelluloses on strength loss in fire retardant treated southern pine. **Holzforshung**. v. 53, p. 311-317, 1999.

TALLAPRAGADA, P.; VENKATESH, K. Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Journal Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, p. 137-14, 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. Purification and characterization of thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689-692, 1987.

TECHAPUN,C.;POOSARAN,N.;WATANABLE,M.;SASAKI,K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose free cylanases produced from agricultural waste and the properties required for use in pulp bleaching bioprocess: a review. **Process Biochemestry**, v. 38, p. 1237-130, 2003.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 169-179, 2003.

TEUNISSEN, M.J.; CAMP, H.J.M.O. Anaerobic fungi and their cellulolytic enzymes. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 63, p. 63-76, 1993.

VÁZQUEZ, M.J.; GARROTE, G.; ALONSO, J.L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 889-896, 2005.

VELKOVA, Z. I.; GOCHEVA, V. K.; KOSTOV, G.; ATEV, A. Optimization of nutritive media composition for hylanase production be *Aspergillus awamori*. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 13, p. 651-656, 2007.

VIANA, M.T.S.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; SILVA, E.A.; VIEIRA, R.A.; RIBEIRO, J.V. Use of xylanase in diets composed of corn and soybean meal for comercial laying hens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 385-390, 2011.

VICENTE, N.E.V**. Biodegradação de bagaço de cana de açúcar por linhagens/espécie de *Pleurotus spp* e avaliação nutricional para ruminantes**. 2002. 237f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculadade em Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2002.

VIEIRA, W.B.; MOREIRA, L.R.S.; NETO, A.M.; FERREIRA FILHO, E.X. Production and characterization of an enzyme complex from a new strain of *Clostridium thermocellum* with emphasis on its xylanase activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 237-242, 2007.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal Molecular Catalisys. B: Enzymes**, v. 9, p. 113-148, 2000.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching, from an idea to the industry. **FEMS Microbiology Review**, v. 13, p. 335- 350, 1994.

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

WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. **Handbook of Food Enzymology**, Routledge, USA, 2002.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SANDDLER, J.N. Multiplicity of -1-4-xylanase in microorganisms, functions and applications. **Microbiology Review**, v. 52, p. 305- 317, 1988.

WYMAN, C.E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals and power. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 254-262, 2003.

ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant -D-xylosidase form *Scytalidium thermophilum*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 31, p. 170- 176, 2004.

ZANOTTO, E.; SHAH, Z.H.; JACOBS, H.T. The bidirectional promoter of two genes for the mitochondrial translational apparatus in mouse is regulated by an array of CCAAT boxes interacting with the transcription factor NF-Y. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 664–677, 2007.

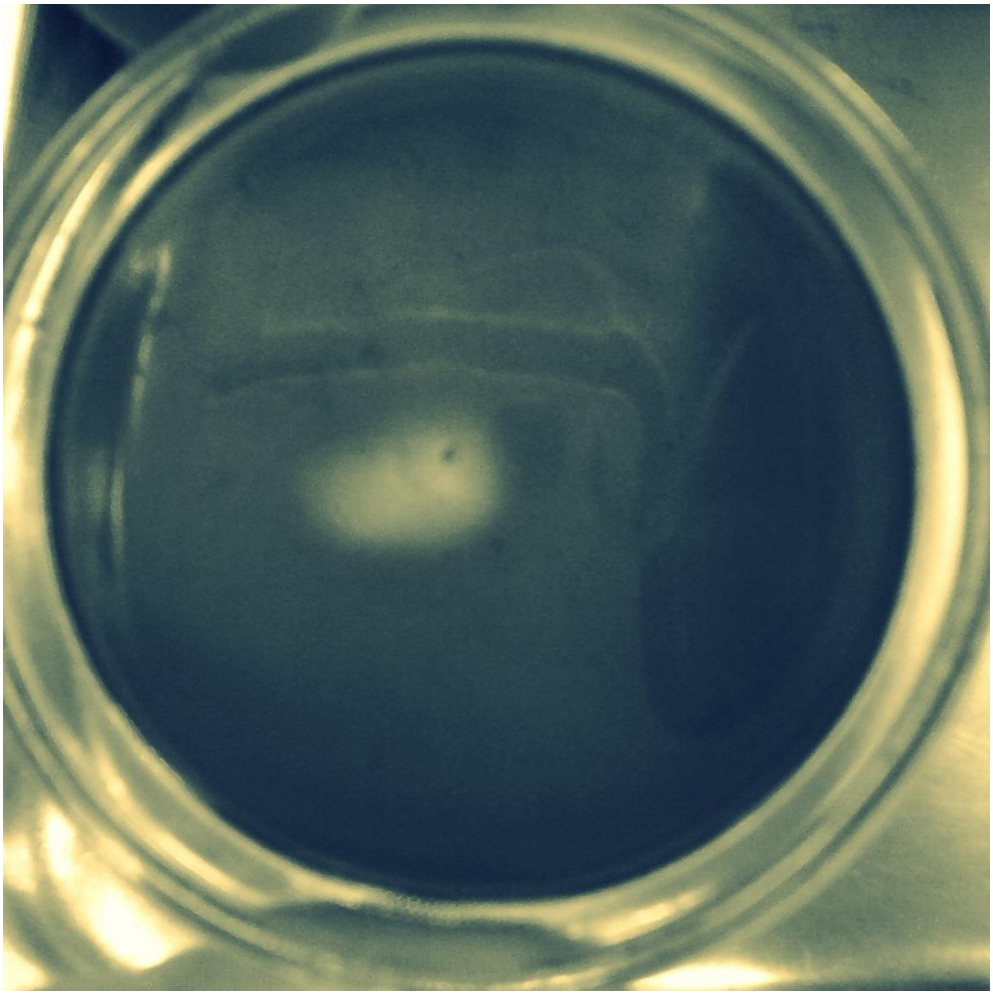
ZHAO,L.; GENG,J.; GUO,Y.; LIAO,X.; LIU,X.; WU,R.; ZHENG,Z.; ZHANG, R. Expression of the Thermobifida fusca xylanase Xyn11A in *Pichia pastoris* and its characterization. **BMC Biotechnology**, v.15, .n. 18, p. 15-18, 2015.

ZHAO, Y.; CHANY, C. J.; SIMS, P. F. G. & SINNOTT, M. L. Definition of the substrate specificity of the ‘sensing’ xylanase of *Streptomyces cyaneus* using xylooligosaccharide and

cellooligsaccharide glycosides of 3,4-dinitrophenol. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 181-190, 1997.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Halos de degradação produzidos pela levedura *Cryptococcus laurentti* isolada de chicória.



Apêndice 2 – Halos de degradação para as 23 leveduras que apresentaram capacidade de hidrolisar a xilana presente nos meios.

Levedura	Método 1(IE > 1,0)	Método 2 (IE > 2,5)
19 Y	2,3	2,5
60 Y	4,0	2,5
5 Y	3,0	3,0
27 Y	1,5	1,5
34 Y	3,0	3,5
93 Y	1,3	2,0
13 Y	6,0	4,0
118 Y	2,5	2,0
94 Y	2,0	2,0
44 Y	2,0	2,0
33 Y	2,0	2,0
18 Y	3,0	3,0
53 Y	2,5	3,0
32 Y	1,2	2,0
49 Y	3,7	2,5
40 Y	2,0	2,7
47 Y	1,1	2,0
36 Y	1,2	2,0
28 Y	1,4	3,0
68 Y	2,0	0,0
46 Y	1,0	2,0
104Y	0,9	2,0
30 Y	0,9	3,1

Apêndice 3 – Análise de efeitos, Coeficiente de regressão e ANOVA do planejamento composto central rotacional 2^4

Effect Estimates; Var.:ativ máxima; R-sqr=,53113; Adj:,02618
4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Residual=1,158539
DV: ativ máxima

Factor	Effect	Std.Err.	t(13)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	**+95,% Cnf.Limt**
Mean/Interc.	1,187500	0,538177	2,20652	0,045944	0,02484	2,350161	1,187500	0,538177	0,024839	2,350161
(1)xilana (L)	-0,718333	0,439420	-1,63473	0,126076	-1,66764	0,230976	-0,359167	0,219710	-0,833821	0,115488
xilana (Q)	1,280000	0,439420	2,91293	0,012104	0,33069	2,229309	0,640000	0,219710	0,165346	1,114654
(2)peptona (L)	-0,203333	0,439420	-0,46273	0,651207	-1,15264	0,745976	-0,101667	0,219710	-0,576321	0,372988
peptona (Q)	-0,212500	0,439420	-0,48359	0,636719	-1,16181	0,736809	-0,106250	0,219710	-0,580904	0,368404
(3)extrato lev(L)	-0,281667	0,439420	-0,64100	0,532663	-1,23098	0,667642	-0,140833	0,219710	-0,615488	0,333821
extrato lev(Q)	-0,022500	0,439420	-0,05120	0,959941	-0,97181	0,926809	-0,011250	0,219710	-0,485904	0,463404
(4)pH (L)	-0,153333	0,439420	-0,34894	0,732718	-1,10264	0,795976	-0,076667	0,219710	-0,551321	0,397988
pH (Q)	-0,195000	0,439420	-0,44377	0,664508	-1,14431	0,754309	-0,097500	0,219710	-0,572154	0,377154
1L by 2L	0,092500	0,538177	0,17188	0,866181	-1,07016	1,255161	0,046250	0,269089	-0,535081	0,627581
1L by 3L	-0,050000	0,538177	-0,09291	0,927395	-1,21266	1,112661	-0,025000	0,269089	-0,606331	0,556331
1L by 4L	-0,065000	0,538177	-0,12078	0,905714	-1,22766	1,097661	-0,032500	0,269089	-0,613831	0,548831
2L by 3L	0,115000	0,538177	0,21368	0,834108	-1,04766	1,277661	0,057500	0,269089	-0,523831	0,638831
2L by 4L	-0,090000	0,538177	-0,16723	0,869762	-1,25266	1,072661	-0,045000	0,269089	-0,626331	0,536331
3L by 4L	0,022500	0,538177	0,04181	0,967287	-1,14016	1,185161	0,011250	0,269089	-0,570081	0,592581

Effect Estimates; Var.:ativ máxima; R-sqr=,39002; Adj:,36656
4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Residual=,7535997
DV: ativ máxima

Factor	**Effect**	Std.Err.	t(26)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,972500	0,217025	4,481044	0,000132	0,526398	1,418602	0,972500	0,217025	0,526398	1,418602
xilana (Q)	1,351667	0,331512	4,077283	0,000382	0,670235	2,033099	0,675833	0,165756	0,335117	1,016549

ANOVA; Var.:ativ máxima; R-sqr=,39002; Adj:,36656
4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Residual=,7535997
DV: ativ máxima

Factor	SS	df	MS	F	p
xilana (Q)	12,52802	1	12,52802	16,62424	0,000382
Error	19,59359	26	0,75360		
Total SS	32,12161	27			

Effect Estimates; Var.:ativ máxima; R-sqr=,53113; Adj:,02618
4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Pure Error=,001825
DV: ativ máxima

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,187500	0,021360	55,5945	0,000013	1,119523	1,255477	1,187500	0,021360	1,119523	1,255477
(1)xilana (L)	-0,718333	0,017440	-41,1880	0,000031	-0,773836	-0,662830	-0,359167	0,008720	-0,386918	-0,331415
xilana (Q)	1,280000	0,017440	73,3929	0,000006	1,224497	1,335503	0,640000	0,008720	0,612248	0,667752
(2)peptona (L)	-0,203333	0,017440	-11,6588	0,001356	-0,258836	-0,147830	-0,101667	0,008720	-0,129418	-0,073915
peptona (Q)	-0,212500	0,017440	-12,1844	0,001190	-0,268003	-0,156997	-0,106250	0,008720	-0,134002	-0,078498
(3)extrato lev(L)	-0,281667	0,017440	-16,1503	0,000516	-0,337170	-0,226164	-0,140833	0,008720	-0,168585	-0,113082
extrato lev(Q)	-0,022500	0,017440	-1,2901	0,287459	-0,078003	0,033003	-0,011250	0,008720	-0,039002	0,016502
(4)pH (L)	-0,153333	0,017440	-8,7919	0,003100	-0,208836	-0,097830	-0,076667	0,008720	-0,104418	-0,048915
pH (Q)	-0,195000	0,017440	-11,1810	0,001533	-0,250503	-0,139497	-0,097500	0,008720	-0,125252	-0,069748
1L by 2L	0,092500	0,021360	4,3305	0,022708	0,024523	0,160477	0,046250	0,010680	0,012261	0,080239
1L by 3L	-0,050000	0,021360	-2,3408	0,101146	-0,117977	0,017977	-0,025000	0,010680	-0,058989	0,008989
1L by 4L	-0,065000	0,021360	-3,0431	0,055732	-0,132977	0,002977	-0,032500	0,010680	-0,066489	0,001489
2L by 3L	0,115000	0,021360	5,3839	0,012552	0,047023	0,182977	0,057500	0,010680	0,023511	0,091489
2L by 4L	-0,090000	0,021360	-4,2135	0,024424	-0,157977	-0,022023	-0,045000	0,010680	-0,078989	-0,011011
3L by 4L	0,022500	0,021360	1,0534	0,369517	-0,045477	0,090477	0,011250	0,010680	-0,022739	0,045239

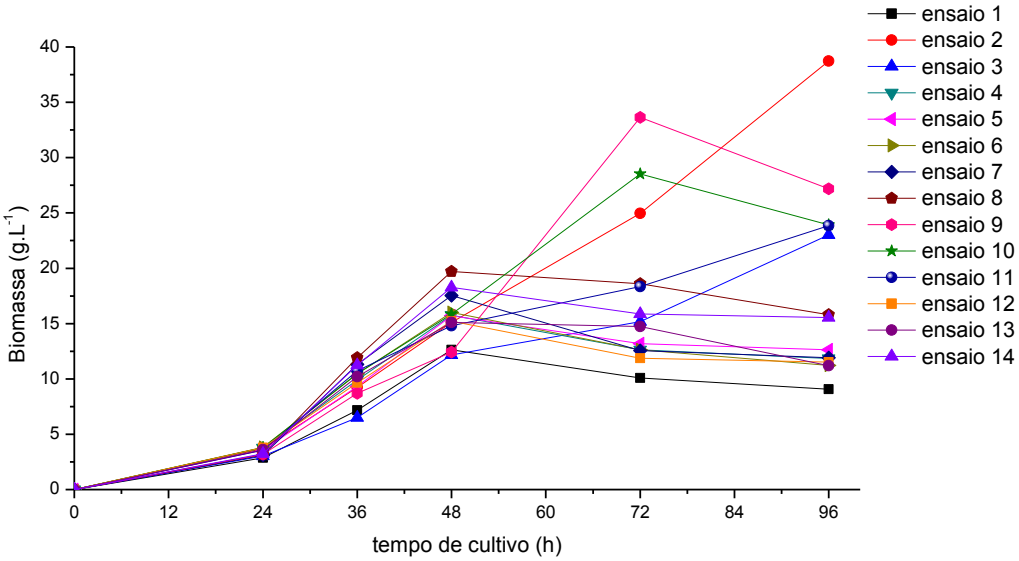
Effect Estimates; Var.:ativ máxima; R-sqr=,53013; Adj:,25374
4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Pure Error=,001825
DV: ativ máxima

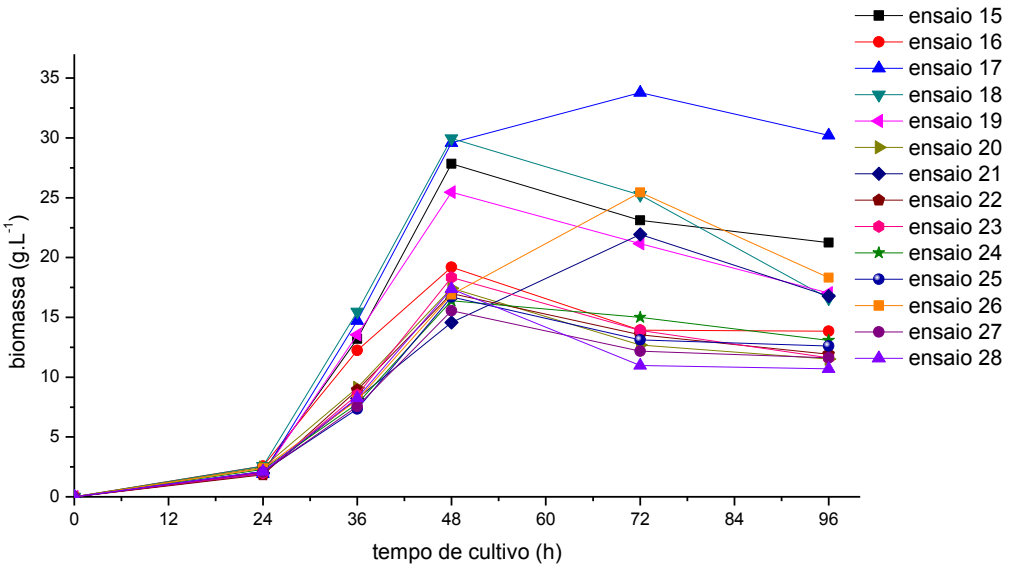
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,170625	0,016887	69,3228	0,000007	1,116884	1,224366	1,170625	0,016887	1,116884	1,224366
(1)xilana (L)	-0,718333	0,017440	-41,1880	0,000031	-0,773836	-0,662830	-0,359167	0,008720	-0,386918	-0,331415
xilana (Q)	1,285625	0,016887	76,1330	0,000005	1,231884	1,339366	0,642812	0,008443	0,615942	0,669683
(2)peptona (L)	-0,203333	0,017440	-11,6588	0,001356	-0,258836	-0,147830	-0,101667	0,008720	-0,129418	-0,073915
peptona (Q)	-0,206875	0,016887	-12,2509	0,001171	-0,260616	-0,153134	-0,103437	0,008443	-0,130308	-0,076567
(3)extrato lev(L)	-0,281667	0,017440	-16,1503	0,000516	-0,337170	-0,226164	-0,140833	0,008720	-0,168585	-0,113082
(4)pH (L)	-0,153333	0,017440	-8,7919	0,003100	-0,208836	-0,097830	-0,076667	0,008720	-0,104418	-0,048915
pH (Q)	-0,189375	0,016887	-11,2145	0,001520	-0,243116	-0,135634	-0,094687	0,008443	-0,121558	-0,067817
1L by 2L	0,092500	0,021360	4,3305	0,022708	0,024523	0,160477	0,046250	0,010680	0,012261	0,080239
2L by 3L	0,115000	0,021360	5,3839	0,012552	0,047023	0,182977	0,057500	0,010680	0,023511	0,091489
2L by 4L	-0,090000	0,021360	-4,2135	0,024424	-0,157977	-0,022023	-0,045000	0,010680	-0,078989	-0,011011

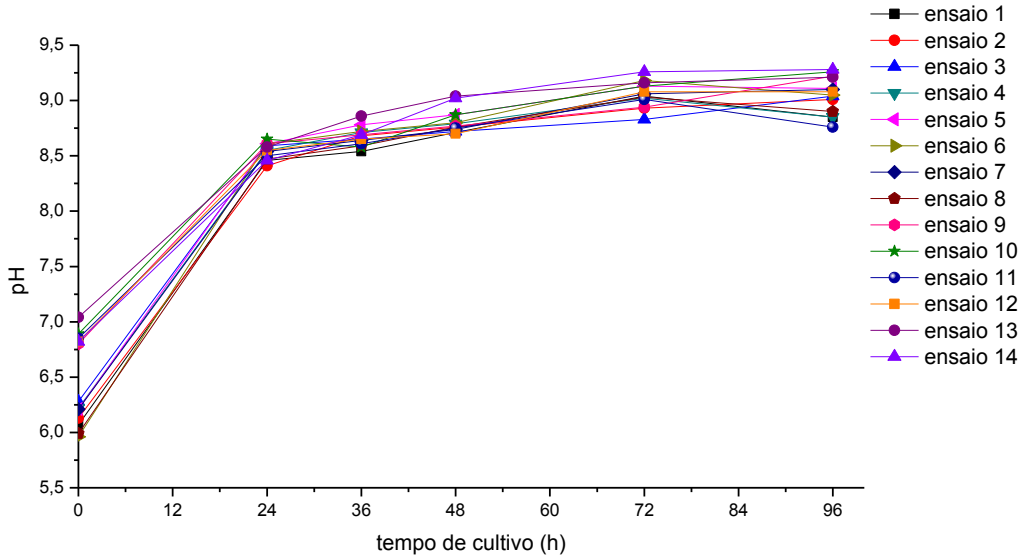
ANOVA; Var.:ativ máxima; R-sqr=,53013; Adj:,25374
4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Pure Error=,001825
DV: ativ máxima

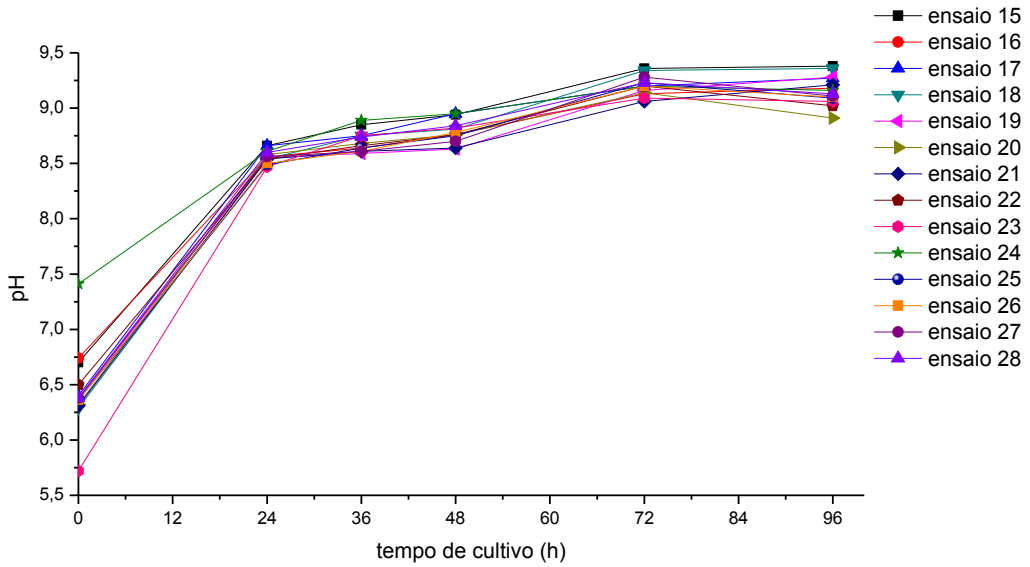
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)xilana (L)	3,09602	1	3,09602	1696,447	0,000031
xilana (Q)	10,57812	1	10,57812	5796,232	0,000005
(2)peptona (L)	0,24807	1	0,24807	135,927	0,001356
peptona (Q)	0,27390	1	0,27390	150,084	0,001171
(3)extrato lev(L)	0,47602	1	0,47602	260,831	0,000516
(4)pH (L)	0,14107	1	0,14107	77,297	0,003100
pH (Q)	0,22952	1	0,22952	125,766	0,001520
1L by 2L	0,03423	1	0,03423	18,753	0,022708
2L by 3L	0,05290	1	0,05290	28,986	0,012552
2L by 4L	0,03240	1	0,03240	17,753	0,024424
Lack of Fit	15,08750	14	1,07768	590,509	0,000101
Pure Error	0,00547	3	0,00182		
Total SS	32,12161	27			

Apêndice 4 – Acompanhamento da biomassa e pH nos ensaios do delineamento central composto rotacional utilizando a levedura *Cryptococcus laurentti* para produção de endo-xilanase.

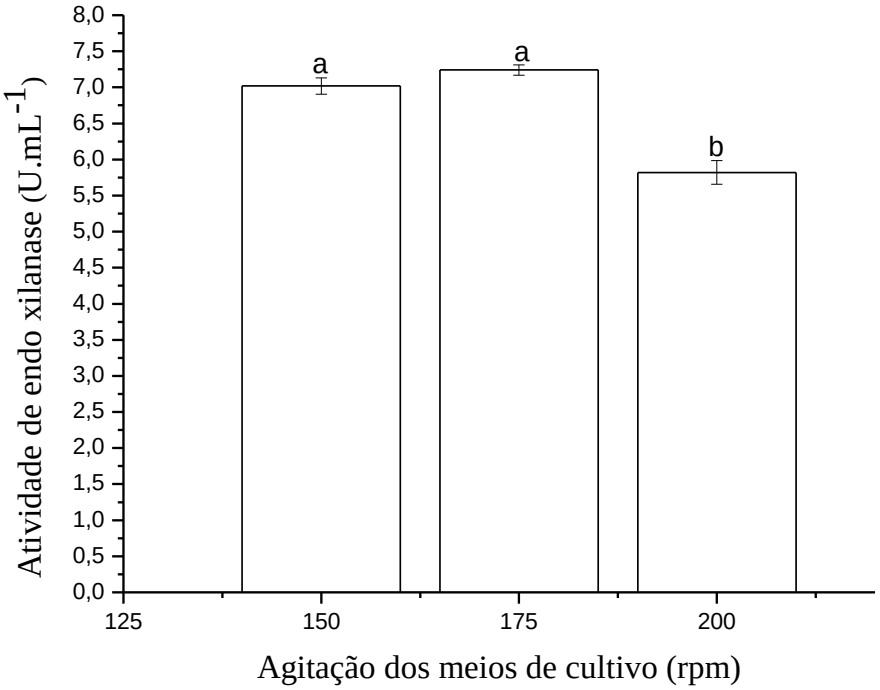





ensaio 1
ensaio 2
ensaio 3
ensaio 4
ensaio 5
ensaio 6
ensaio 7
ensaio 8
ensaio 9
ensaio 10
ensaio 11
ensaio 12
ensaio 13
ensaio 14
pH
9,5
9,0
8,5
8,0
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
0
12
24
36
48
60
72
84
96
tempo de cultivo (h)

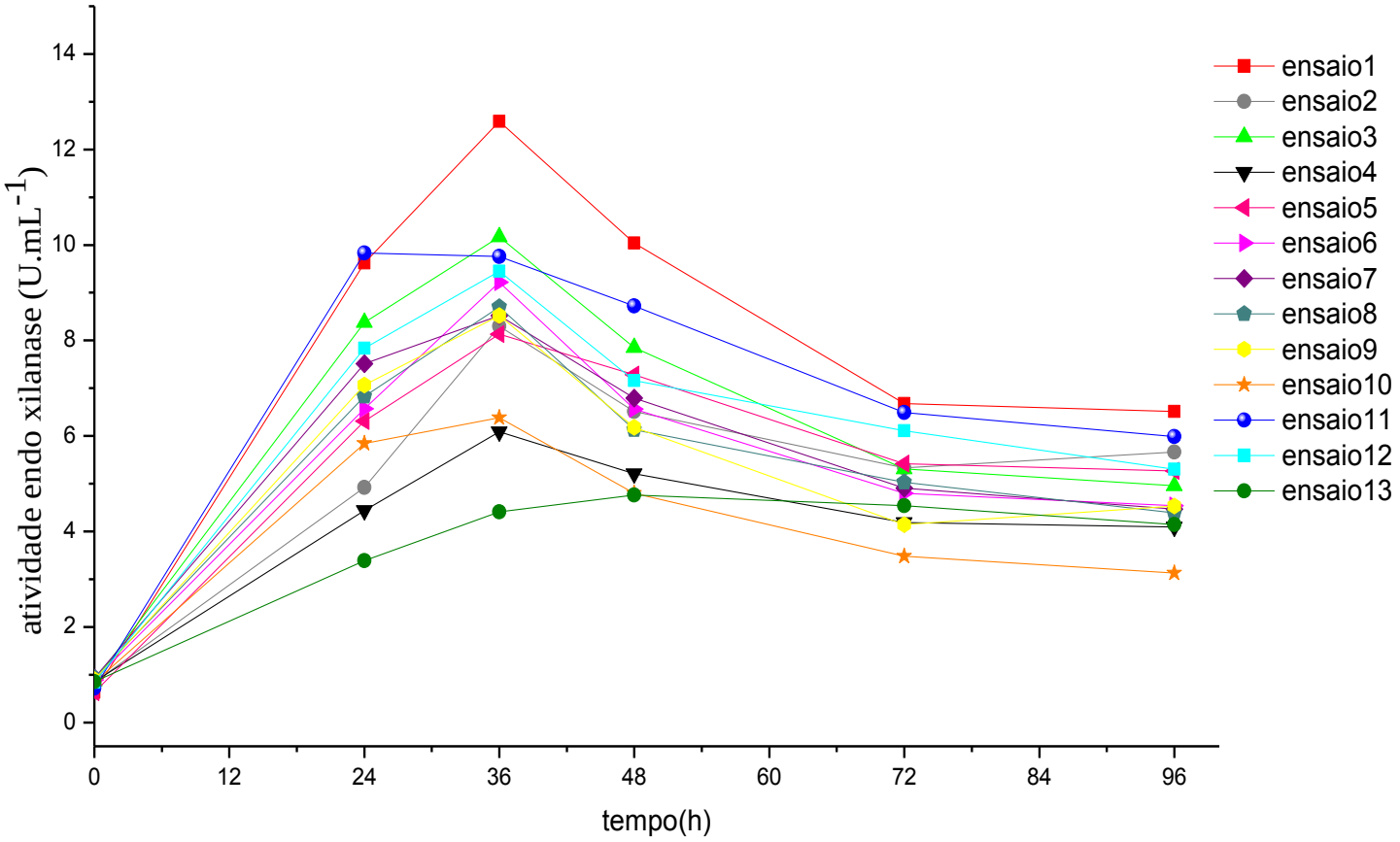

ensaio 15
ensaio 16
ensaio 17
ensaio 18
ensaio 19
ensaio 20
ensaio 21
ensaio 22
ensaio 23
ensaio 24
ensaio 25
ensaio 26
ensaio 27
ensaio 28
pH
9,5
9,0
8,5
8,0
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
0
12
24
36
48
60
72
84
96
tempo de cultivo (h)

Apêndice 5 – Influência da agitação dos meios de cultivo frente a atividade de endo-xilanase



*Barras verticais representam a média dos ensaios com os seus desvios e letras iguais nas médias dos resultados indicam que não há diferença significativa entre elas a 95% de confiança (teste de Tukey).

Apêndice 6 – Cinética de acompanhamento da atividade de endo-xilanase produzida por *Cryptococcus laurentti* obtidas nos ensaios realizados no DCCR 2^2



Apêndice 7 – Coeficiente de regressão, análise de efeitos e ANOVA para o delineamento composto central rotacional (DCCR 2^2)

Effect Estimates; Var.:atividade máxima; R-sqr=,65801; Adj:,31602 (matriz completo 2 2)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=3,184357
DV: atividade máxima

Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	8,573303	1,030256	8,321528	0,000410	5,92495	11,22166	8,573303	1,030256	5,92495	11,22166
(1)xilana (L)	0,075550	1,263697	0,059785	0,954643	-3,17289	3,32399	0,037775	0,631848	-1,58644	1,66199
xilana (Q)	0,186942	1,507919	0,123973	0,906166	-3,68929	4,06317	0,093471	0,753960	-1,84464	2,03159
(2)extrato de levedura(L)	3,891251	1,263697	3,079260	0,027493	0,64282	7,13969	1,945626	0,631848	0,32141	3,56984
extrato de levedura(Q)	-0,436769	1,507919	-0,289650	0,783711	-4,31300	3,43946	-0,218385	0,753960	-2,15650	1,71973
1L by 2L	0,105000	1,784477	0,058841	0,955358	-4,48214	4,69214	0,052500	0,892238	-2,24107	2,34607

Effect Estimates; Var.:atividade máxima; R-sqr=,64854; Adj:,60949 (matriz completo 2 2)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=1,818048
DV: atividade máxima

Factor	Effect	Std.Err.	t(9)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	8,482727	0,406543	20,86552	0,000000	7,563063	9,402391	8,482727	0,406543	7,563063	9,402391
(2)extrato de levedura(L)	3,891251	0,954849	4,07525	0,002778	1,731233	6,051270	1,945626	0,477425	0,865616	3,025635

ANOVA; Var.:atividade máxima; R-sqr=,64854; Adj:,60949
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Residual=1,818048
DV: atividade máxima

Factor	SS	df	MS	F	p
(2)extrato de levedura(L)	30,19358	1	30,19358	16,60769	0,002778
Error	16,36244	9	1,81805		
Total SS	46,55602	10			

Effect Estimates; Var.:atividade máxima; R-sqr=,65801; Adj:,31602 (matriz completo 2 2)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0108
DV: atividade máxima

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	8,573303	0,059999	142,8901	0,000049	8,315147	8,831459	8,573303	0,059999	8,315147	8,831459
(1)xilana (L)	0,075550	0,073594	1,0266	0,412557	-0,241101	0,392200	0,037775	0,036797	-0,120550	0,196100
xilana (Q)	0,186942	0,087817	2,1288	0,167054	-0,190904	0,564788	0,093471	0,043909	-0,095452	0,282394
(2)extrato de levedura(L)	3,891251	0,073594	52,8744	0,000358	3,574601	4,207902	1,945626	0,036797	1,787300	2,103951
extrato de levedura(Q)	-0,436769	0,087817	-4,9736	0,038128	-0,814616	-0,058923	-0,218385	0,043909	-0,407308	-0,029461
1L by 2L	0,105000	0,103923	1,0104	0,418682	-0,342145	0,552145	0,052500	0,051962	-0,171072	0,276072

Effect Estimates; Var.:atividade máxima; R-sqr=,65648; Adj:,57059 (matriz completo 2 2)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0108
DV: atividade máxima

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	8,660828	0,043697	198,2008	0,000025	8,472814	8,848842	8,660828	0,043697	8,472814	8,848842
(2)extrato de levedura(L)	3,891251	0,073594	52,8744	0,000358	3,574601	4,207902	1,945626	0,036797	1,787300	2,103951
extrato de levedura(Q)	-0,491238	0,084007	-5,8476	0,028021	-0,852690	-0,129787	-0,245619	0,042003	-0,426345	-0,064893

ANOVA; Var.:atividade máxima; R-sqr=,65648; Adj:,57059
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0108
DV: atividade máxima

Factor	SS	df	MS	F	p
(2)extrato de levedura(L)	30,19358	1	30,19358	2795,702	0,000358
extrato de levedura(Q)	0,36930	1	0,36930	34,195	0,028021
Lack of Fit	15,97154	6	2,66192	246,474	0,004046
Pure Error	0,02160	2	0,01080		
Total SS	46,55602	10			

Apêndice 8 – Índices enzimáticos (IE) das leveduras de banco de culturas

Levedura	**Nº. NRRL**	**Método 1 (IE > 1,0)**	**Método 2 (IE> 2,5)**
Aureobasidium pullulans	Y-12996	1,9	3,3
Pichia stipitis	YB-3756	1,2	2,7
Pichia pastoris	Y-1603	1,3	2,6

Apêndice 9 – Artigo publicado

academicJournals

Vol. 14(23), pp. 1961-1969, 10 June, 2015
DOI: 10.5897/AJB2015.14476
Article Number: 6B43AA853545
ISSN 1684-5315
Copyright © 2015
Author(s) retain the copyright of this article
http://www.academicjournals.org/AJB

African Journal of Biotechnology

Full Length Research Paper

Screening of yeasts capable of producing cellulase-free xylanase

Otero, D. M.[1]*, Cadaval, C. L.[1], Teixeira, L. M.[1], Rosa, C. A[2], Sanzo, A. V. L.[1] and Kalil, S. J[1]

[1]Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Microbiologia e Biosseparações, Rio Grande, Brazil.
[2]Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Belo Horizonte, Brazil.

Received 1 April, 2015; Accepted 1 June, 2015

Xylanases have largely been obtained from filamentous fungi and bacteria; few studies have investigated the production of this enzyme by yeasts. The aim of this study was to isolate yeasts from different sources, such as vegetables, cereal grains, fruits, and agro-industrial waste and to obtain yeasts capable of producing celulase-free xylanase. Samples were enriched using yeast malt broth, and yeasts were isolated on Wallerstein nutrient agar. In all, 119 yeast strains were isolated and evaluated in terms of their ability to degrade xylan, which was found in the medium by using agar degradation halos, the basis of this polysaccharide, and Congo red dye. Selected microorganisms were grown in complex medium and the enzymatic activities of endo-xylanase, β-xylosidase, carboxymetilcellulase, and filter paper cellulose were determined over 96 h of cultivation; the pH and biomass concentration were also evaluated. The yeast strain 18Y, which was isolated from chicory and later identified as *Cryptococcus laurentii*, showed the highest endo-xylanase activity (2.7 U.mL^{-1}). This strain had the ability to produce xylanase with low levels of cellulase production (both CMCase [0.11 U.mL^{-1}] and FPase [0.10 U.mL^{-1}]). This result gives this strain great biotechnological potential since this enzyme can be used for industrial pulp and paper bleaching.

Key words: *Cryptococcus laurentii*, endo-xylanase, xylan.

INTRODUCTION

Xylan, the major component of the hemicellulose complex, is a heterogeneous polysaccharide found in the plant cell wall, formed by xylopyranosyl residues linked by β-1,4-glycosidic bonds (Flores, 1997). An enzymatic complex is responsible for the total hydrolysis of xylan, but its main enzymes are endo-1,4-β-xylanase and β- xylosidase (Polizeli, 2005). These enzymes are responsible for the hydrolysis of the main chain: the former attacks the main internal chain of xylosidic linkages and the latter yields xylosyl residues by endwise attack of xylooligosaccharides (Subramaniyan and Prema, 2002).

Endo-1,4-β-xylanase and β-xylosidase are divided into two categories: one is associated with polysaccharidases (for example, cellulases) and the other is cellulase-free (Biely, 1985). The former is used for the production of hydrolysates in food and beverage processing (Sreenath,

*Corresponding author. E-mail: deborah.m.otero@gmail.com. Tel: +(55)(53)32935381.

Author(s) agree that this article remains permanently open access under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 International License

1996), in animal feed, to reduce viscosity and improve the digestibility of nutrients (Ahmad et al., 2013; Viana, 2011; Mathlouthi, 2003) and production of xylitol used as a natural sweetener (Parajó et al., 1998; Usama et al., 2013). Cellulase-free xylanase is used for paper and vegetable fiber bleaching (Damiano, 2003; Bocchini et al., 2003; Techapun et. al., 2003; Shangi, 2009).

Cellulase-free xylanase is used mainly in the pulp and paper industries for pretreating pulp prior to bleaching to minimize the use of chlorine, the conventional bleaching agent. This application has great potential as an environmentally safe method (Subramaniyan, Prema, 2000).

These enzymes are produced by molds, bacteria, yeasts, marine algae, among other organisms, but their main commercial sources are filamentous fungi (Polizeli et al., 2005). Xylanases from filamentous fungi are generally associated with the production of cellulases (Steiner, 1987), which may not be desirable, depending on the application of the enzyme.

Xilanolitic systems have largely been obtained from filamentous fungi (Adesina, 2013; Rao, 2002, Cacais, 2001) and bacteria (Rajagopalan et al. 2013; Chavez et al., 2006); there are few studies on the production of this enzyme by yeasts (Lara et al., 2014; Lopes, 2011; Pe9trescu, 2000). To the best of our knowledge, there have been no studies on the production of hydrolytic cellulases (CMCase and FPase) and β-xylosidase associated with the production of xylanases by yeasts; the only related studies have been conducted on filamentous fungi (Malabadi, 2007; Petrescu, 2000; Gottschalk, 2013).

It is important to isolate yeast strains that produce the xylanase enzyme to develop new process for synthesizing products of biotechnological interest. Therefore, the aim was to isolate and select yeasts from food and residues capable of producing cellulase-free xylanase enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Samples were obtained from different cities in southern Rio Grande do Sul: Pelotas (31º63´S/52º33´W), Rio Grande (31º21´S/52º38´W), São Lourenço (31º25´S/52º13´W), Quinta (32º08´S/52º26´W), and Povo Novo (31º93´S/52º30´W). The samples collected were vegetables (chayote, chicory, radicci, tomato), grains (soybeans, corn, rice), fruits (banana, jelly palm, grape), and agro-industrial wastes (rice husk, corn cobs, soybean hulls). Samples (10 g) were collected, stored in sterile plastic bags and transported under refrigeration to the laboratory within 24 h. For the isolation of yeasts, parts of the fruits and vegetables (stems, leaves, roots) were evaluated separately.

Yeast isolation

For enrichment, about 2.5 g of each sample was inoculated into 25 mL yeast malt broth composed of 3 $g.L^{-1}$ yeast extract; 3 $g.L^{-1}$ malt extract; 5 $g.L^{-1}$ peptone; and 10 $g.L^{-1}$ glucose (pH 6.0); the samples were then incubated at 25ºC for 72 h at 150 rpm (Maugeri, 2007).

Cultures were streaked onto Petri dishes with Wallerstein nutrient agar composed of 4 $g.L^{-1}$ yeast extract; 5 $g.L^{-1}$ bactocasitone; 50 $g.L^{-1}$ dextrose; 550 $mg.L^{-1}$ KH_2PO_4; 125 $mg.L^{-1}$ KCl; 250 $mg.L^{-1}$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 2.5 $mg.L^{-1}$ $FeCl_3$; 2.5 $mg.L^{-1}$ $MnSO_4$; 22 $mg.L^{-1}$ Bromocresol green, and 20 $g.L^{-1}$ agar at pH 5.5. Cultures were grown at 25°C for 72 h. Colonies were transferred and maintained in GYMP agar (20 $g.L^{-1}$ glucose, 5 $g.L^{-1}$ yeast extract, 10 $g.L^{-1}$ malt extract, 2 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, and 20 $g.L^{-1}$ agar at pH 5.5) at 4°C in a slant tube (Maugeri, 2007). HCl was used to adjust the pH.

Screening yeast for xylanase activity

For the selection of yeasts capable of producing xylan-degrading enzymes, all isolated yeasts were tested using two different methods. In Method 1 (Whitaker, 2002), only a medium containing xylan (2 $g.L^{-1}$) and agar (17 $g.L^{-1}$) was used. In Method 2 (Lopes, 2011), the following medium was used: 10 $g.L^{-1}$ Beechwood xylan (Sigma); 0.6 $g.L^{-1}$ yeast extract; 7.0 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4; 2.0 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4; 0.1 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$; 1.0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, and 15 $g.L^{-1}$ agar; HCl was used to adjust the pH to 5.0. From the yeasts in GYMP agar, the inoculum was transferred to xylan agar plates, by picking one by one using a toothpick and incubated at 30°C for 72 h. The clearance zones produced around the yeast colonies in the medium were visible when Congo red was used. They were discolored by sodium chloride at different concentrations.

The diameters of the zones of clearance and colonies were measured in millimeters and the enzymatic index (EI) was calculated by Equation 1:

$$EI = \frac{diameter\ hydrolysis\ zone}{diameter\ colony}. \quad (1)$$

Strains with an EI above 1.0 were considered to be potential producers of xylanase in Method 1 (Whitaker, 2002), whereas strains with an EI above 2.5 were considered to be potential producers in Method 2 (Lopes, 2011).

Production of xylanase in liquid medium

Only the yeast strains considered to be potential producers of xylanase (which met the criteria described above) were pre-grown in liquid medium. The inoculum was grown in 150 mL medium, as follows: 10.0 $g.L^{-1}$ Beechwood xylan; 3.0 $g.L^{-1}$ yeast extract; 7.0 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4; 2.0 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4; 0.1 $g.L^{-1}MgSO_4.7H_2O$; 1.0 $g.L^{-1}$ $(NH_4)SO_4$ and 5.0 $g.L^{-1}$ peptone; the samples were grown at pH 6.0 (adjusted using HCl), 30ºC, and 150 rpm for 24 h (Lopes, 2011). The cultivation was carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL of the same medium and was inoculated with cellular suspension (10^8 $cells.mL^{-1}$) obtained from a 24 h inoculum, incubated in a rotary shaker at 30°C and 150 rpm. The samples, which had been collected over 96 h of fermentation (samples were taken every 12 h until peak activity was observed, after which they were immediately withdrawn every 24 h), were centrifuged at 6,000 × *g* at 4°C for 10 min. The cell-free supernatant was used to determine pH and the activities of enzymes (endo-xylanase, cellulase, and β-xylosidase). The precipitated cells were then used for biomass determination; the tests and analytical measurements

were performed in triplicate.

Analytical methods

Enzyme assay

Carboxymethylcellulase activity was assayed using a reaction medium containing 0.5 mL substrate (2% [w/v] solution of carboxymethylcellulose) and 0.5 mL crude enzymatic extract and incubated for 30 min at 50ºC. Reducing sugars were assayed as glucose using the DNS method (Miller, 1959). Filter paper activity was assayed using a reaction medium containing 0.5 mL crude enzymatic extract, 1.0 mL citrate sodium buffer (pH 4.8), and 50 mg filter paper incubated for 60 min at 50ºC (Ghose, 1989). One international unit of filter paper activity was considered as the amount of enzyme that forms 1 µmol glucose (reducing sugar as glucose) per min during the hydrolysis reaction. One enzyme activity unit (U) of Carboxymethylcellulase was defined as the amount of enzyme required to produce 1 µmol of glucose per min under the assay conditions..

For all enzymatic activities, blanks were performed with enzymes (buffer + enzyme) and substrates (buffer + substrate). All tests of enzymatic activities were performed in triplicate.

Biomass determination

The biomass concentration was estimated by measuring absorbancy in a spectrophotometer at 620 nm and relating the readings to biomass dry weight with a calibration curve (Rech et al., 1999).

Kinetic parameter determination

Kinetic parameters were determined for each growth curve: maximum biomass concentration (X_{max}, $g.L^{-1}$), maximum specific growth rate (μ_{max}, $1.h^{-1}$), and enzymatic productivity (P, $U.mL^{-1}.h^{-1}$) of each selected yeast grown in liquid medium, as described in "production of xylanase in liquid medium" section of this work.

The productivity (P) was calculated when the time of maximum activity was reached, and the maximum specific growth rate (μ_{max}) was calculated using Equation 2 by exponential regression of the logarithmic growth curve (Bailey and Ollis, 1986). The enzymatic productivity was calculated using Equation 3, according to Schmidell et al. (2001).

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt} \quad (2)$$

$$P = \frac{A - A_0}{t - t_0} \quad (3)$$

Where, µ is the specific growth rate (h^{-1}), X is the biomass concentration ($g.L^{-1}$), A_o is initial enzymatic production, t is cultivation time at which maximum enzymatic activity occurs and t_o is the start point of cultivation.

Yeast identification

Only the yeast strain with the highest xylanase activity was identified. Identification was based on the sequencing of the D1/D2 domains of the large subunit of the rRNA gene. The D1/D2 domains were amplified by PCR, directly from whole cells as previously described (Lachance et al., 1999). Sequencing was performed on an ABI 3130 automated DNA gene analyzer according to the manufacturer's instructions. The sequences were assembled, edited, and aligned using the program MEGA6 (Tamura et al., 2013). The sequences obtained were compared to those included in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST at http:// www.ncbi.nlm.nih.gov).

Statistical analysis

The results were evaluated statistically through Variance Analysis and Tukey test at 95% confidence level ($p < 0.05$), using Statistica 5.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

In all, 119 yeasts strains were isolated from different types of samples to obtain microorganisms capable of producing xylanolytic enzymes. Strains that were capable of degrading xylan present in the medium and that met the criteria of both methods were chosen. Results were expressed in terms of rings of hydrolysis, revealed by the addition of Congo red dye. Among the strains tested, 23 were able to hydrolyze xylan, but only 7 of those (6% of all microorganisms) met the criteria of both methods and thus were selected (Table 1). These results were considered promising since they are similar to those of previous studies. For example, Rao et al. (2008) obtained 374 yeasts from tree bark and decaying fruits that were evaluated for the ability to ferment xylose, and found that 27 isolates (7.2%) converted it into ethanol. Similarly, Lopes et al. (2011) evaluated 349 yeasts in Petri plates, and found that 9 (2.6 %) showed an enzymatic index above 2.5.

The enzymatic index, a semi-quantitative parameter applied to evaluate the ability of yeast strains to produce enzymes in solid medium, has been used by several authors (Ribeiro et al., 2014; Adesina, 2013; Florencio, 2012; Nagar, 2012; Samanta et al., 2011; Tallapragada, 2011), who have considered it an efficient method for screening for microorganisms. The next selection step was performed according to the capacity of yeast strains to produce the xylanolytic enzyme in liquid medium with xylan. Based on the activity of endo-xylanases in the seven yeasts under study (Figure 1a), yeast 18Y showed the highest xylanolytic activity (2.7 $U.mL^{-1}$), followed by yeast 34Y (2.1 $U.mL^{-1}$), after 36 h of cultivation. Yeast 19Y (0.5 $U.mL^{-1}$) had the lowest ability to produce the enzyme endo-xylanase. As shown in Figure 1, yeast 19Y had the highest peak activity in the fastest culture time (12 h), followed by yeast 13Y, which needed 24 h to reach its maximum enzymatic activity. Yeast 40Y needed most time (48 h) to reach its maximum compared to the other yeasts, which had high production up to 36 h of cultivation followed by a significant decrease after 48 h of cultivation. The only exception was yeast 60Y since it did not show any meaningful decrease in its activity. β-Xylosidases are glycoside hydrolases, which catalyze the

Table 1. Enzymatic index of yeasts isolated from different samples

Strain	Samples	Enzymatic index (>1.0) (Method 1)	Enzymatic index (>2.5) (Method 2)
13Y	Tomato	6.0	4.0
18Y	Chicory	3.0	3.0
19Y	Chicory	2.3	2.5
34Y	Tomato	3.0	3.5
40Y	Corn Seed	2.0	2.7
53Y	Tomato	2.5	3.0
60Y	Chicory	4.0	2.5

release of xylose units from xylo-oligosaccharides derived from the degradation of xylan; thus, their presence may prove to be unsatisfactory when the aim is to obtain xylo-oligosaccharides (Subramaniyan and Prema, 2000). Therefore, the low levels of β-xylosidases produced by yeasts 18Y (0.003 $U.mL^{-1}$) and 34Y (0.0006 $U.mL^{-1}$) can be considered a positive factor. Low activities similar to the ones found in this study (Figure 1b) were also found by Biely (1980), who reported β-xylosidase levels below 0.1 $U.mL^{-1}$ produced by *Cryptococcus albidus* CCY 1741 in medium containing Beechwood xylan, and Bastawde (1994), who reported low levels of β-xylosidase by a yeast isolated from decaying wood (NCIM 3574). However, when cultivation is conducted with filamentous fungi, the levels of β-xylosidase tend to be higher, as reported by Lemos (2000). This author described β-xylosidase activities of 1.3 $U.mL^{-1}$ when cultivating *Aspergillus awamori* in medium with sugar cane bagasse.

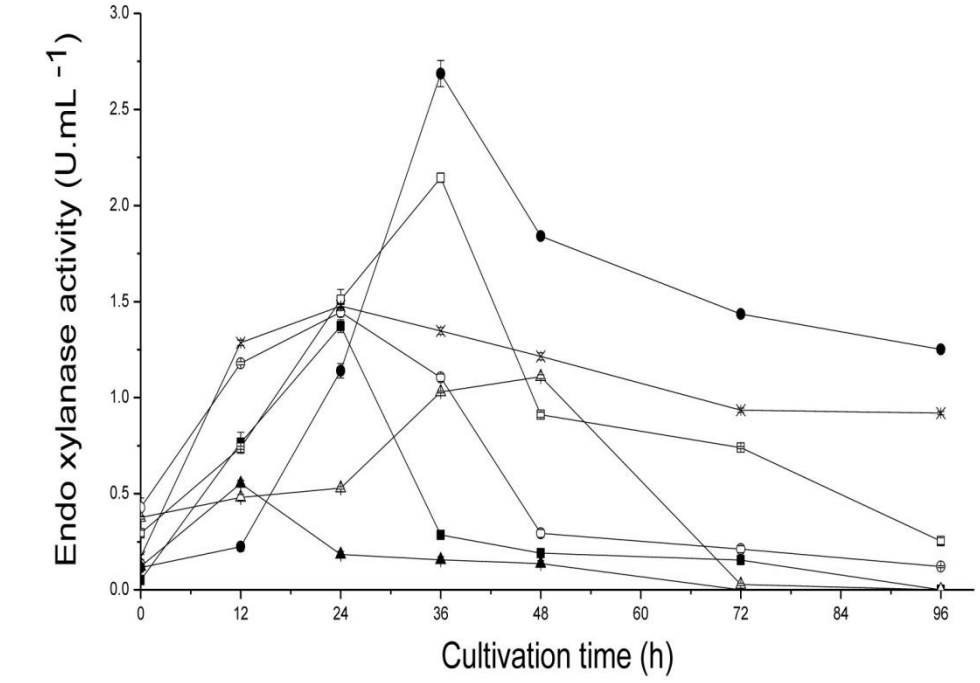
In the present study, the production of cellulases (CMCase and FPase) was extremely low since all yeast activities were lower than 0.11 $U.mL^{-1}$ (Figure 1c and d). Therefore, xylanases produced by the yeasts under study could be applied to the textile (degumming of natural fibers), pulp, and paper industries. The values of cellulase found in this study agreed with the results of free-cellulase xylanase (0.02 $U.mL^{-1}$ for CMCase and FPase) from *Thermomyces lanuginosus* reported by Mendoza (2006). Boddireddy (2011) obtained free-cellulase xylanase from different isolated fungi with CMCase activities of 0.1 to 0.6 $U.mL^{-1}$ in submerged cultures. Alves-Prado (2010) cultivated *Lysinibacillus sp*. strain P5B1 in submerged cultures with xylan to produce endo-xylanase and reported a CMCase activity of 0.58 $U.mL^{-1}$. Therefore, considering these previous results, the findings obtained by the present study are promising.

The pH of the medium ranged from 6.0 to 7.2 (Figure 2a) during the cultivation of yeasts aimed at the production of xylanase. The only exception was yeast Yeasts 18Y and 34Y reached maximum enzyme 60Y: its initial pH was 6.2 but it reached 7.6 after 96 h. production within the first 36 h of culture at pH 7.1 and 6.7, respectively. Lopes (2011) isolated environmental yeasts and produced xylanase in medium with xylan. They observed that yeasts LEB-AY 10 and LEB-AAD5 reached their maximum enzymatic activity when the pH was around 6.5.

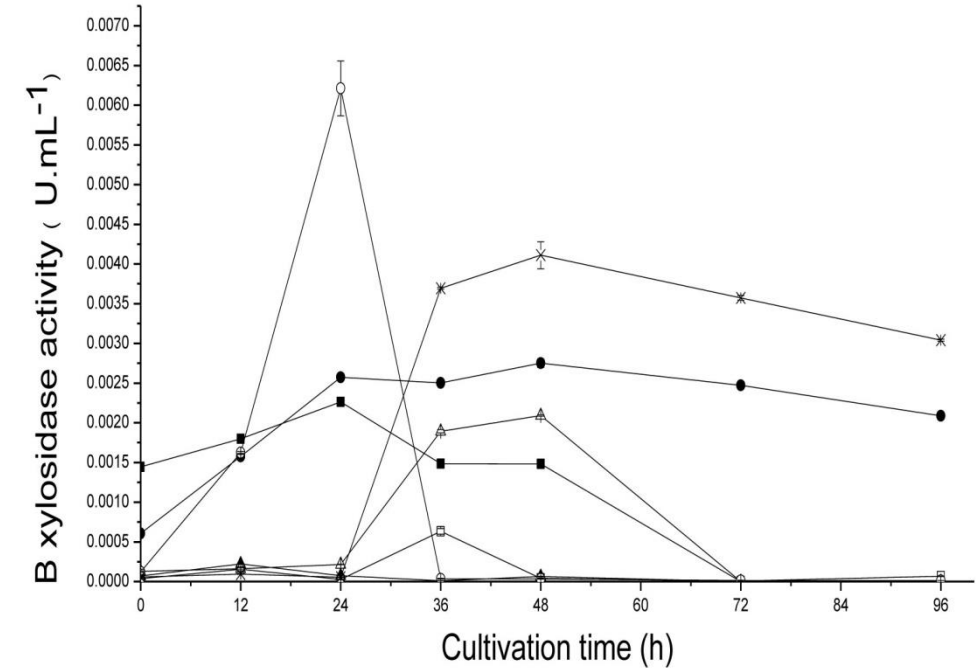
Regarding the production of biomass (Figure 2b), yeast 34Y stood out in terms of cell growth since it reached 12.27 $g.L^{-1}$. Yeast 18Y showed a maximum peak of endo-xylanase activity of 2.7 $U.mL^{-1}$, coinciding with the maximum increase in biomass production (5.75 $g.L^{-1}$), which occurred after 36 h.

The X_{max} found in the yeasts under study (Table 2) ranged from 2.54 $g.L^{-1}$ (yeast 53Y) to 12.27 $g.L^{-1}$ (yeast 34Y), whereas the productivity ranged from 0.015 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (yeast 53Y) to 0.07 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (yeast 18Y). The highest maximum specific growth rate (0.23 h^{-1}) was obtained by yeast strain 53Y while yeast 34Y had the lowest one (0.05 h^{-1}).

Yeast 18Y, which showed the highest endo-xylanase activity, was submitted to sequencing of the D1/D2 domains of the large subunit of the rRNA gene, and identified as *Cryptococcus laurentti*. Studies using micro-organisms for xylanase production are mainly performed using filamentous fungi (Guimarães, 2006) and bacteria (Vieira, 2007). The yeasts described in the literature as producing endo-xylanase include *Trichosporon* (Stevens, 1977), *Pichia stipitis* (Lee et al., 1986), *Aureobasidium pullulans* (Leathers et al., 1986), *Cryptococcus albidus* (Biely, 1980), and *Cryptococcus flavus* (Parachin et al., 2009; Yasui, 1984). Lopes (2011) isolated two strains of *Cryptococcus* that produced endo-xylanase with activities of 0.67 and 0.73 $U.mL^{-1}$. Morais et al. (2013) isolated yeasts from decaying wood and tested their ability to ferment xylose and produce endo-xylanase; the main yeasts were *Cryptococcus laurentti*, *Cr. humicola*, *Cr. flavences*, and *Cr. podzolicus*. Lara et al. (2014) isolated *C. laurentti* UFMG-HB-48, which
produced extracellular xylanase with an activity of nearly 1.3 $U.mL^{-1}$.



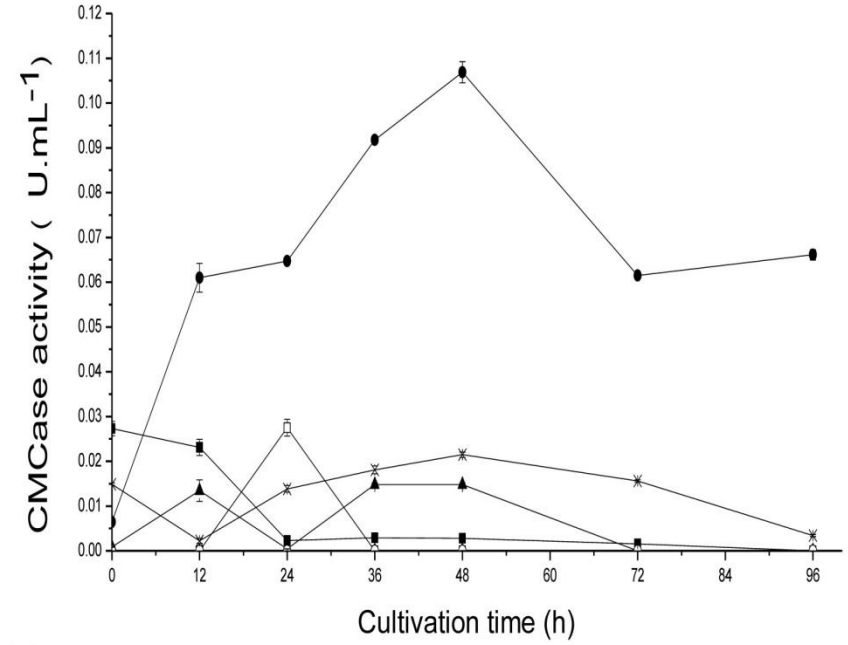
(a)



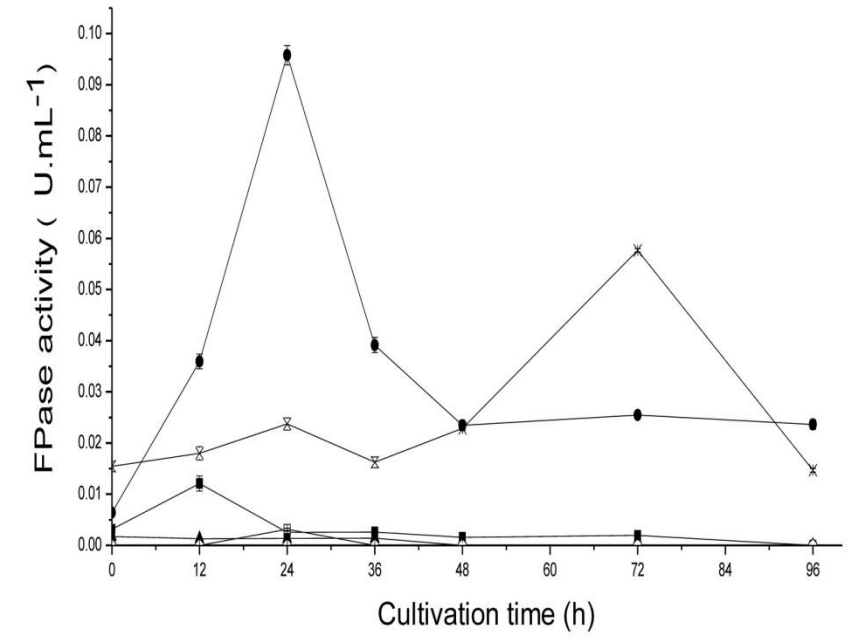
(b)

Figure 1. Activities of endo-xylanase (a), β-xylosidase (b), CMCase (c), and FPase (d) in the isolated yeasts in medium with xylan as its carbon source. (■) Yeast 13Y; (●) Yeast 18Y; (▲) Yeast 19Y; (□) Yeast 34Y; (Δ) Yeast 40Y; (o) Yeast 53Y; and (×) Yeast 60Y.

The enzymatic activities obtained in the present study are relevant not only because xylanase was produce d from yeasts but also because the activities that were observed were found under conditions that had not been



(c)

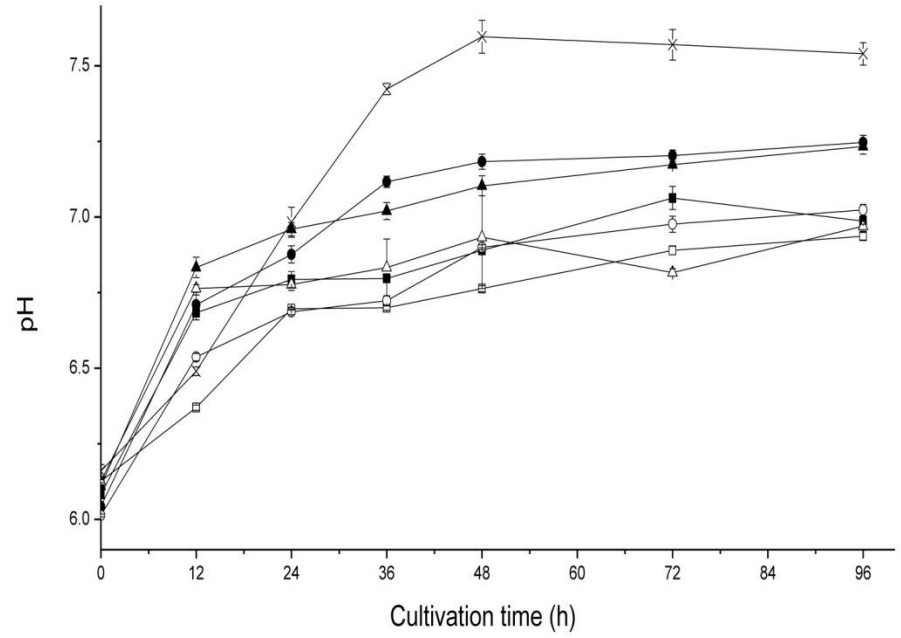


(d)

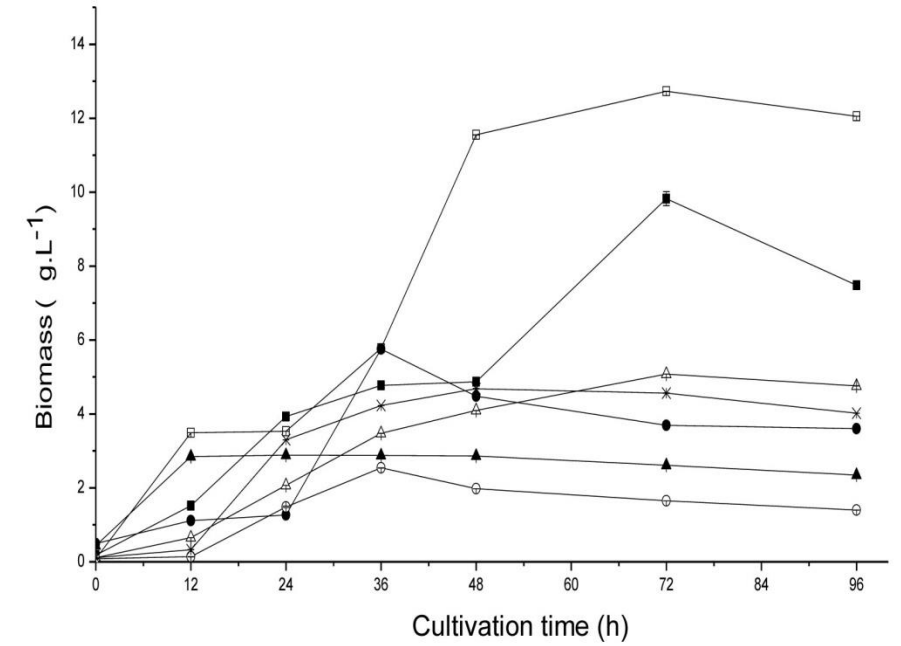
Figure 1. Contd.

optimized in terms of pH, temperature, stirring speed, the addition of ions, and so forth. Thus, their activities could be higher than observed.

The results also indicate that the samples used were suitable for the isolation of yeasts capable of producing xylan-degrading enzymes. Out of 119 isolated yeast strains, *C. laurentti* 18Y (isolated from chicory) showed the highest production of endo-xylanase (2.7 $U.mL^{-1}$); the averages of all the yeasts were evaluated statistically throughout the cultivation, as well as the maximum



(a)



(b)

Figure 2. The pH (a) and biomass (b) of the isolated yeasts in medium with xylan as its carbon source over 96 h, where: (■) Yeast 13Y; (●) Yeast 18Y; (▲) Yeast 19Y; (□) Yeast 34Y; (Δ) Yeast 40Y; (o) Yeast 53Y; and (×) Yeast 60Y.

temperatures were compared, where the yeast was statistically superior 18Y of other yeasts. This yeast species had the ability to produce endo-xylanase that was free of cellulase (CMCase and FPase) and showed low levels of β-xylosidade.

The potential industrial application of such cellulase-free xylanase, especially from yeast strains that show activity at a neutral pH, will be attractive to the paper and

Table 2. Kinetic parameters of isolated yeasts ± standard deviation.

Yeast	X_{max} ($g.L^{-1}$)	μ_{max} (h^{-1})	Productivity ($U.mL^{-1}.h^{-1}$)
13Y	9.82 ± 0.180	0.13 ± 0.002	0.05 ± 0.0021
18Y	5.75 ± 0.001	0.13 ± 0.001	0.07 ± 0.0016
34Y	12.27 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.05 ± 0.001
40Y	5.08 ± 0.001	0.11 ± 0.001	0.01 ± 0.001
53Y	2.54 ± 0.001	0.23 ± 0.007	0.05 ± 0.001
60Y	4.68 ± 0.005	0.13 ± 0.001	0.05 ± 0.001
19Y	2.88 ± 0.001	0.16 ± 0.001	0.03 ± 0.001

pulp industries to improve the quality of paper pulp as well as to minimize environmental pollution, which occurs due to the use of hazardous chemicals by these industries. In addition, these xylanases could also be used in agriculture; in the production of human food, cattle feed, and pet food; and in the production of xylo-oligosaccharides for pharmaceutical purposes.

Conflict of interests

The author(s) did not declare any conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico* (CNPq) process number 486.238/2012-1, the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS) process number 12.1785-0, Fundação do Amparo a pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) process number APQ-01347-12 and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for scholarship.

REFERENCES

Adesina FC, Onilude AA (2013). Isolation, identification and screening of xylanase and glucanase-producing microfungi from degrading wood in Nigeria. Afr. J. Agric. Res. 8:4414-4421.

Ahmad Z, Butt MS, Hussain R, Ahmed A, Riaz M (2013). Effect of oral application of xylanase on some hematological and serum biochemical parameters in broilers. Pak. Vet. J. 3: 388-390.

Alves-Prado HF, Pavezzi FC, Leite RS, de Oliveira VM, Sette LD, Dasilva R (2010). Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. Appl. Biochem. Biotechnol. 161: 333-346.

Bailey MJ, Biely P, Poutnen K (1992). Interlaboratory testing of methodos for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. 23:257-270.

Bailey JE, Ollis DF (1986). Biochemical Engineering Fundamentals, Singapore: McGraw-Hill.

Bastawde KB, Puntambekar US, Gokhale DV (1994). Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. J. Ind. Microbiol. 13:220-224

Biely P, Vrsanka M, Kratky Z (1980). Xylan degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. Identification and cellular localization. Eur. J. Biochem. 108: 313-321.

Biely P (1985). Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol. 3: 286-290.

Bocchini DA, Damiano V, Gomes E, Da Silva R (2003). Effect of *Bacillus circulans* DI themostable xylanase on bio-bleaching of Eucalyptus Kraft Pulp. Appl. Biochem. Biotechnol. 106, 393-402.

Boddireddy S, Charya S (2011). Isolation, identification and screening of potencial cellulose-free xylanase producting fungi. Afr. J. Biotechnol. 10:4624-4630.

Cacais AOG, Silveira FQP, Ferreira Filho EX (2001). Production of xylan-degrading enzymes by a *Trichoderma harzianum* strain. Braz. J. Microbiol. 32: 141-143.

Chavez R, Bull P, Eyzaguirre J (2006). The xylanolitic enzyme system from the genus *Penicillium*. J. Biotechnol. 123: 413-433.

Florencio C, Couri S, Farinas CS (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. Enzyme Res. 1-7.

Flores ME, Pérez R, Huitrón C (1997). β-xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces sp*. CH-M-1035. Lett. Appl. Microbiol. 24: 410-416.

Guimarães LHS, Peixoto-Nogueira SC, Michelin M, Rizzati ACS, Sandrim VC, Zanoelo FF, Aquino ACMM, Junior AB, Polizeli MLTM (2006). Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Braz. J. Microbiol. 37: 474-480.

Ghose TK (1987). Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 59: 257-268.

Gottschalk LMF, Paredes RS, Teixeira RSS, Silva AS, Bon EPS (2013). Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, B-xylosidase, ferulic acid esterase ando B-glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. Braz. J. Microbiol. 44:569-576.

Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT, Barker JSF (1999) *Kadomaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian Hibiscus flowers. Can. J. Microbiol. 45:172-177.

Lara CA, Santos RO, Cadete RM, Ferreira C, Marques S, Gírio F, Oliveira ES, Rosa CA, Fonseca C (2014). Identification and characterisation of ylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. Antonie van Leeuwenhoek 105:1107-1119.

Leathers TD, Detroy RW, Bothas, RJ (1986). Induction and glucose repression of xylanase from a colour variant strain of *Aurobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett. 8*:867-872.

Lee H, Biely P, Latta RK, Barbosa MFS, Schneider H (1986). Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains. Appl. Environ. Microbiol. Appl. 52:320-324.

Lemos JLS, Bom EPS, Santana MFE, Junior NP (2000). Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. Braz. J. Microbiol. 31:206-211.

Lopes F, Motta F, Andrade CCP, Rodrigues MI, Maugeri-filho F (2011). Thermo-stable xylanases from non-conventional yeasts. J. Microbiol. Biochem. Technol. 3:36-42.

Malabadi RB, Raghavendra S, Kumar SV (2007). Production of cellulose-free xylanase from a novel yeast strain used from

biobleaching in paper industry. Res. J. Microbiol. 2:24-33.
Mathlouthi N, Mohamed MA, Larbier M (2003). Effect of enzyme preparation containing xylanase and ß-glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean meal based diets. Br. Poult. Sci. 44:60-66.
Maugeri F, Hernalsteens S (2007). Screening of yeast strains for transfructosylating activity. J. Mol. Catal. B Enzym. 49: 43-49.
Mendoza NS, Caliwara TEM, Unciano NM (2006). A Local Isolate of Non-cellulolytic, xylanolytic, and pectinolytic thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* C_{1a}. Philipp. J. Sci. 135:113-119.
Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.
Nagar S, Mittal A, Gupta VK (2012). A cost effective method for screening and isolation of xylan degrading of bacteria using agro waste material. Asian. J. Biol. Sci. 5: 384-394.
Parachin NS, Siqueira S, de Faria FP, Torres FAG, de Moraes LMO (2009).Xylanase from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: enzymatic profile, isolation and heterologous expression. Of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Catal. B Enzym. 59:52-57.
Petrescu I, Lamote-Brasseur J, Chessa JP, Ntarima P, Claeyssens M, Deureese B, Marino G, Gerday C (2000). Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. Extremophiles 4:137-144.
Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Review Appl. Microbiol. Biotechnol. 67:577-591.
Rajagopalan G, Yew KW, He J, Yong KL (2013). Production, purification and characterization of a xylooligosaccharides forming xylanase from high butanol producing strain *Clostridium sp* BOH3. Bioenerg. Res. 6:448-457.
Rao RS, Bhadra B, Shivaji S (2008). Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. Lett. Appl. Microbiol. 47:9-24.
Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub M (1999). Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of b-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 23:91-96.
Ribeiro LFC, Ribeiro LF, Jorge JA, Polizeli LTM (2014). Screening of filamentous fungi for xylanases and cellulases not inhibited by xylose and glucose. Brit. Biotechnol. J. 4:30-39.
Samanta AK, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Jayapal N (2011). A simple and efficient diffusion technique for assay of endo-β-1,4-xylanase activity. Braz. J. Microbiol. 42:1349-1353.
Schmidell W, Lima AU, Aquarone E, Borzani W (2001). Biotecnologia Industrial. Edgard Blücher LTDA, São Paulo, SP.
Sreenath HK, Shah AB, Yang VW, Gharia MM, Jeffries TW (1996). Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. J. Ferment. Bioeng. 81:18-20.
Steiner W, Lafferty RM, Gomes I, Esterbauer H (1987). Studies on a wild type strain of *Schizophyllum commune*: Cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide schizophyllan. Biotechnol. Bioeng. 30: 169–178.
Subramaniyan S, Prema P (2000). Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 183:1-20.
Subramaniyan S, Prema P (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. Crit. Rev. Biotechnol. 22:33-64.
Tallapragada P, Venkatesh K (2011). Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. J. Microbiol. Biotechnol. Res 1:137-147
Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739.
Tan L, Mayers P, Saddler J (1987). Purification and characterization of thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Can. J. Microbiol. 33: 689-692.
Techapun C, Poosaran N, Watanabe M, Sasaki K (2003). Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses a review. Process. Biochem. 38, 1327-134.
Usama FA, Ibrahim ZM, George I (2013). Ethanol and xylitol production from xylanase broth of *Thermomyces lanuginosus* grown on some lignocellulosic wastes using Candida tropicalis EMCC2. Life Sci. J. 10:968-978.
Viana MTS, Albino LFT, Rostagno HS, Silva, EA, Vieira RA, Ribeiro JV (2011). Use of xylanase in diets composed of corn and soybean meal for comercial laying hens. R. Bras. Zootec. 40:385-390.
Vieira WB, Moreira LRS, Neto AM, Ferreira Filho EX (2007). Production and characterization of an enzyme complex from a new strain of *Clostridium thermocellum* with emphasis on its xylanase activity. Braz. J. Microbiol. 38:237-242.
Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS (2002). Handbook of Food Enzymology, Routledge, USA.