

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 03/08/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Sirlene do Nascimento Senna

Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por
fungo filamentosos

São José do Rio Preto

2018

Sirlene do Nascimento Senna

Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por
fungo filamentoso

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves Prado

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

São José do Rio Preto

2018

Senna, Sirlene do Nascimento.

Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por fungo filamentosos / Sirlene do Nascimento Senna. – São José do Rio Preto, 2018

122 f. : il., tabs.

Orientador: Heloiza Ferreira Alves Prado

Coorientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. 3. Fungos. 4. Xilanases. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.12

Sirlene do Nascimento Senna

Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por fungo filamentosos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves Prado
UNESP–Câmpus de Ilha Solteira
Orientadora

Prof. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini
UNESP–Câmpus de Araraquara

Prof. Dr. Eduardo Martins da Silva
UEMG- Universidade de Minas Gerais

Prof. Dr^a Maria Lourdes Texeira de Moraes Polizeli
USP-Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr. Renato Grillo
UNESP–Câmpus de Ilha Solteira

São José do Rio Preto
03 de Agosto de 2018

Agradecimentos

A DEUS, pela saúde, por fortalecer minha fé e esperança, por guiar-me em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Izenilda e Auceniro, pelo amor e incentivo em todas as etapas da minha vida. Ao meu irmão Sergio, pelo apoio e convivência ao longo dos anos.

Ao meu namorado Mateus, pelo amor, compreensão, incentivo, ajuda e preocupação. Tenho certeza que a caminhada durante essa etapa teria sido muito mais difícil se eu não tivesse você do meu lado, me ajudando a lidar com as matemáticas da vida. Muito obrigada.

A minha orientadora, professora Dr^a. Heloiza Ferreira Alves Prado, por ter recebido no laboratório de Biotecnologia, pela paciência, confiança depositada e por me ajudado durante esses seis anos desde o mestrado.

Ao meu coorientador professor Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez por ter me ensinado e acompanhado em várias etapas da purificação. Obrigada por ter ficado do meu lado discutindo comigo os meus resultados e pelo acolhimento no laboratório de Bioquímica de proteínas.

Ao professores Dr^a. Eleni Gomes e Dr. Roberto da Silva, que disponibilizaram o Laboratório de Microbiologia Aplicada e alguns reagentes sempre que precisei utilizar.

Ao professor Dr. Paulo Ceresini por ter me disponibilizado o laboratório de Fitopatologia para a etapa de identificação do fungo e por ter me autorizado a submeter as sequências para Coréia. Em especial agradeço à sua pós doutoranda Vanina, pela amizade, disposição em ensinar e auxílio na etapa de Molecular do projeto.

A todos os meus amigos e amigas: (as) Luciana, Camila, Bárbara, Heloisa, Crislen, Mariana, Jaqueline Cristine, Jaqueline Ferreira, Andreia, Maria Fernanda, Keila, Luiz Fernando, Lisandra, Neuterlândio, Cristiane, Cinthia, Mirian e Glaucia. Obrigada pelo carinho, amizade, apoio, suporte e palavras de incentivo. Em especial a amiga

Elis Marina por ter ensinado a rodar estatística em parte dos meus resultados.

Aos amigos dos Laboratórios de Ilha e de São José do Rio Preto: Cintia Lionela, Jozi, Wanderleia, Raisal, Jéssica, Vanessa, Aline, Letícia, Lumena, Morgana, com os quais compartilhei as dificuldades e alegrias nesta árdua jornada, obrigada meninas pelas palavras de incentivo e ajuda. Agradeço também a Larissa pelas mensagens de fé, nos momentos difíceis e orações.

A amiga de pós graduação, Marianny Canedo, que foi minha segunda família no período em que eu morei em São José do Rio Preto. Obrigada pela amizade, carinho, preocupações e favores sempre que precisei resolver algo à distância, após ter voltado para Ilha Solteira.

À técnica de laboratório Selma Buzetti pela preocupação e pela ajuda ao longo desta etapa.

A CAPES pelo apoio financeiro por meio de bolsa de estudos.

A todos os funcionários da sessão de pós-graduação, do Instituto de Biociências, letras e Ciências Exatas UNESP, Campus de São José do Rio Preto, pela atenção e dedicação no atendimento.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite.

A todos que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os fungos filamentosos são microrganismos muito eficientes na produção de xilanases, enzimas que apresentam diversas aplicações biotecnológicas, tais como, branqueamento do papel, aditivos em rações animais, panificação, extração e clarificação de sucos, entre outras. Este trabalho teve como objetivo selecionar e otimizar as condições de cultivo do microrganismo de maior potencial para a produção de xilanase, caracterizando a mesma bioquimicamente, e purificar parcialmente a de interesse. Onze fungos isolados em áreas de Cerrado, no estado do Mato do Grosso Sul, com crescimento a 30 °C, foram reativados para ensaio de produção da xilanase. A maioria dos isolados produziram xilanase por cultivo em estado sólido, inicialmente, utilizando o farelo de trigo como substrato, se destacando três espécies identificadas como IPS8.2, IPS14.3F e IPS 9.3. O fungo IPS8.2 foi selecionado para estudo posteriores e identificado como *Gongronella butleri* com base sequenciamento de rDNA por ITSs. Além do cultivo inicial com farelo de trigo, esta espécie foi submetida ao efeito de diferentes fontes de carbono com outros substratos, tais como: casca de maracujá, serragem, papelão, casca de soja, sabugo triturado, bagaço de cana-de-açúcar, braquiária, sabugo de milho e xilana, nos cultivos em estado sólido (CES) e submerso (Csm). Os resultados obtidos nessa etapa não sobrepuseram à utilização inicial, em farelo de trigo em CES. Partindo desses resultados buscou-se verificar o efeito da concentração de sais, umidade e tempo no cultivo em estado sólido. Entre as condições testadas, *Gongronella butleri* IPS8.2 obteve sua melhor produção de xilanase em 72 horas de cultivo, com água destilada e 70% de umidade. A solução enzimática bruta, foi submetida à purificação parcial por troca iônica em Hitrap Q-Sepharose FF. As atividades da xilanase bruta e parcialmente purificada foram favorecidas à 45 °C e pH 5,5. A enzima parcialmente purificada apresentou uma estabilidade de temperatura e uma faixa de estabilidade de pH inferiores à amostra bruta. A maioria dos íons utilizados não inibiu a xilanase bruta e à parcialmente purificada. Para ambas as condições testadas, o íon Ag^+ foi o que proporcionou maior diminuição na atividade da enzima em estudo.

Palavras-chave: Fungos, resíduos agroindustriais, xilanases, caracterização e purificação enzimática.

ABSTRACT

Filamentous fungi are very efficient microorganisms in the production of xylanases, enzymes that present several biotechnological technologies, such as paper bleaching, additives in animal feed, breads, extraction and clarification of juices, among others. The goal of this work was to select and optimize the culture conditions of the microorganism with the greatest potential for the production of xylanase, characterizing the same biochemically, and to partially purify the one of interest. Eleven fungi, with growth at 30°C, isolated in Cerrado areas, in the state of Mato Grosso do Sul, were reactivated for the production of the xylanase. The majority of isolates produced xylanase by solid-state cultivation, initially using wheat bran as substrate, highlighting three species identified as IPS8.2, IPS14.3F and IPS 9.3. The fungus IPS8.2 was selected for further study and identified as *Gongronella butleri*, based on rDNA sequencing by ITSs. In addition to the initial cultivation with wheat bran, this species was submitted to the effect of different sources of carbon with other substrates, such as passion fruit peel, sawdust, cardboard, soybean hull, crushed cob, sugar cane bagasse, corn cob and xylan, in the solid state cultivation (SSC) and submerged cultivation (SC). The obtained results at this stage did not overlap with the initial use of wheat bran at SSC. Based on these results, was tried to verify the effect of the concentration of salts, humidity and time in the solid state cultivation. Among the tested conditions, *Gongronella butleri* IPS8.2 obtained its best xylanase production at 72 hours of culture with distilled water and 70% of humidity. The crude enzymatic solution, was subjected to partial purification by ion exchange in Hitrap Q-Sepharose FF. The activities of crude and partially purified xylanase were favored at 45 °C and pH 5.5. The partially purified enzyme had a temperature stability and pH stability range lower than the crude sample. The majority of the ions used didn't inhibit the crude and partially purified xylanase. For both conditions tested, the Ag⁺ ion provided the greatest decrease in the activity of the enzyme under study.

Keywords: Fungi, agroindustrial residues, xylanases, enzymatic characterization and purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da fibra vegetal.	19
Figura 2 - Estrutura dos principais componentes da biomassa lignocelulósica.	21
Figura 3 - Representação da estrutura de celulose ilustrando a extremidade redutora e não redutora da celulose e a celobiose formada pela união de duas moléculas de glicose.	23
Figura 4 - Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal	23
Figura 5 - Estrutura representativa da miofibrila de celulose.	24
Figura 6 - três principais precursores de lignina (monolignóis) e suas estruturas correspondentes em polímeros de lignina.	25
Figura 7 - Fragmento de Lignina, mostrando importantes ligações intramoleculares.	26
Figura 8 - Estrutura molecular dos carboidratos constituintes da hemicelulose.	27
Figura 9 - Estrutura da xilana, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.	30
Figura 10 - Mecanismo de retenção para hidrólise de uma ligação covalente O-glicosídica por uma xilanase.	33
Figura 11 - À esquerda, vista lateral e à direita, vista superior da representação esquemática da proteína tridimensional (3D) da xilanase GH 10 produzida por <i>Streptomyces halstedii</i> , PDB 1NQ6. As hélices α e as cadeias β da estrutura de barril (α/β) ₈ , são coloridas em laranja e verde, respectivamente.	34
Figura 12 - Representação esquemática da proteína tridimensional (3D) da xilanase GH 11 produzida <i>Thermomyces lanuginosus</i> , PDB1YNA.	35
Figura 13 - Atividades xilanase de fungos isolados em áreas de Cerrado, no município de Inocência MS. Cultivo em estado sólido em 72 horas, à 30 °C.	65
Figura 14 - Isolados fúngicos a partir de solo de Cerrado.	66
Figura 15 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% do DNA total extraído de alguns isolados, as linhas 03 e 17 correspondem ao DNA do isolado IPS 8.2.	67
Figura 16 - Alinhamento entre as sequências disponíveis no GenBank e a sequência do isolado IPS8.2.	68

Figura 17 - Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase por <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 sob cultivo em estado sólido em 72 horas, à 30°C.	69
Figura 18 - Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase para <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 sob cultivo em estado submerso à 30 °C em 72 horas de cultivo.	70
Figura 19 - Produção de xilanase em cultivo sólido, dados referente ao planejamento fatorial 2 ⁴ com dois ensaios no ponto central.	72
Figura 20 - Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2 ⁴ com dois ensaios no ponto central, baseado no teste t “Student” para $t_{(44; 0,95)} = 2,15$	74
Figura 21 - Distribuição dos valores observados e dos valores preditos pelo modelo linear com base no planejamento fatorial 2 ⁴ com quatro ensaios no ponto central. ...	75
Figura 22 - Perfil de produção de xilanase do fungo <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 cultivado em estado sólido, utilizando farelo de trigo a 30°C.	80
Figura 23 - À esquerda temos o Perfil Gel de SDS-PAGE. À direita temos o Zimograma específico para detecção de atividade de xilanase.	84
Figura 24 - Gel zimograma à 10% coluna 1 e 3 corresponde a amostra concentradas por liofilização, coluna 2 solução enzimática bruta sem concentrar.	84
Figura 25 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização, e aplicada em coluna de filtração em gel "Sephacryl™ S-100" Vo de aproximadamente 150 mL e fluxo de 0,7 mL min ⁻¹	85
Figura 26 - Gel SDS-PAGE a 10% das frações coletadas na gel filtração S100. Na coluna 1 encontra se o marcador, já a coluna 2 corresponde as junções dos tubos 98 ao 113, já na coluna 3 é possível visualizar a agrupamentos do tubos do 114 ao 128 e na 4 observa-se as frações do 82 ao 96.	86
Figura 27 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização, e aplicada em coluna de troca iônica HiTrap SP XL (<i>Fast Flow</i>).	87
Figura 28 - Gel SDS-PAGE 10% coluna 3 corresponde as junção da amostras 7 e 8 com atividade xílanolítica concentradas com TCA, coletadas na cromatografia de troca iônica HiTrap SP XL (<i>Fast Flow</i>).	88
Figura 29 - Gel SDS-PAGE 10% das frações eluídas coletadas na gel filtração G 50. Coluna 1 corresponde as frações agrupadas do tubos 27 ao 37, a coluna 2 corresponde 38 ao 60 e a coluna 3 corresponde 61 ao 76.	89

Figura 30 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização e aplicada em coluna Q Sepharose <i>Fast Flow</i>	90
Figura 31 - Gel a 10% SDS-PAGE das frações coletadas na cromatografia de troca aniônica Q Sepharose FF, colunas 4,5 e 6 correspondem as amostras com atividade xilanolítica, coluna 1 corresponde ao extrato bruto.	91
Figura 32 - Gráfico do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a <i>r_f</i> em gel de poliacrilamida.	91
Figura 33 - Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade xilanolítica em extrato bruto e parcialmente purificado de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2.	93
Figura 34 - Efeito da estabilidade de temperatura na atividade xilanolítica em extrato bruto e parcialmente purificado de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2, à 45 °C e pH 5,5.	94
Figura 35 - Efeito do pH na atividade da xilanase bruta e parcialmente purificada obtida da espécie <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 cultivado em farelo de trigo sob cultivo sólido.	95
Figura 36 - Efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase bruta e parcialmente purificada obtida da espécie <i>Gongronella butleri</i> IPS 8.2 cultivado em farelo de trigo sob cultivo estado sólido.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina de diferentes materias lignocelulósicos.....	22
Tabela 2 - Produção de enzimas xilanolíticas por fungos sob cultivo em estado sólido e submerso.....	38
Tabela 3 - Exemplos de técnicas de purificação de xilanases fúngicas.....	40
Tabela 4 - Origem dos substratos utilizados para o cultivo microrganismo selecionado.....	48
Tabela 5 - Fatores e valores dos níveis analisados no planejamento fatorial 2^4 com quatro ensaios no ponto central.....	52
Tabela 6 - Matriz planejamento fatorial 2^4 completo com dois pontos centrais.....	53
Tabela 7 - Produção de xilanase em cultivo sólido, dados referente ao planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central.....	72
Tabela 8 - Estimativa de efeitos e análise de regressão calculada para o planejamento fatorial 2^4 com dois pontos centrais (simplificada).....	73
Tabela 9 - Análise de variância, para o ajuste do modelo linear aos resultados do planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central.....	75
Tabela 10 - Matriz com os pontos em direção a máxima inclinação ascendente “steepest ascent”.....	77
Tabela 11 - Umidades, atividade da xilanase e proteína para espécie <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2, sob cultivo em estado sólido em diferentes umidades, à 30°C.....	78
Tabela 12 - Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade relativa (%) de xilanases presente em extrato bruto produzido pelo fungo <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2.....	81
Tabela 13 - Produção enzimática pela espécie <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2, em 72 horas de cultivo sólido, em farelo de trigo.....	83
Tabela 14 - Resumo da purificação parcial da xilanase produzida por <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2.....	92
Tabela 15 - Efeito dos íons e reagentes na atividade da xilanase bruta obtida de <i>Gongronella butleri</i> IPS 8.2.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B	Braquiária
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BDA	Batata-dextrose-ágar
BMS	Biomassa dos microrganismos do solo
CES	Cultivo em estado sólido
CM	Casca de maracujá
CMC	Carboximetil celulose
CSm	Cultivo submerso
CS	Casca de soja
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DTT	Dithiothreitol
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FEPE	Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), da UNESP Câmpus de Ilha Solteira
FT	Farelo de trigo
GH	Glicosil Hidrolase
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
ITS	"Internal transcribed spacer" / espaçador interno transcrito
KDa	Kilo em dalton
mL	Mililitro
P	Papelão
PAGE	Eletroforese em gel de policrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Palha Milho
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
pNPβG	p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPM	Rotações por minuto
S	Serragem

SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SM	Sabugo de milho
SMT	Sabugo de milho triturado
UI	Unidade Internacional
μmol	Micromol
μL	Microlitro
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
UV	Radiação ultravioleta
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
XB	Xilana beechwood
XOS	Xilooligossacarídeos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL.....	19
2.1.1 Biomassa lignocelulósica	20
2.1.2 Celulose	22
2.1.3 Lignina	24
2.1.4 Hemicelulose	26
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS XILANASES	31
2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS	36
2.3.1 Fungos filamentosos	36
2.4 PRODUÇÃO DE XILANASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E CULTIVO SUBMERSO.....	37
2.4.1 Otimização das condições de cultivo	38
2.5 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	39
2.6 APLICAÇÃO DE XILANASES	41
2.6.1 Aplicação de xilanase na fabricação de pão, alimentos e bebidas	41
2.6.2 Aplicação xilanase na ração animal	43
2.6.3 Aplicação da xilanase no biobranqueamento	44
2.6.4 Aplicação de xilanase na produção de Bioetanol	45
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 MICRORGANISMOS.....	48
4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	48
4.2.1 Preparo dos substratos agrícolas e agroindustrias	48
4.2.2 Cultivo em estado sólido (CES)	49
4.2.3 Cultivo submerso (CSm)	49
4.2.4 Efeito da fonte de carbono	50
4.3 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO	50
4.3.1 Cultivo do isolado para extração do DNA	50
4.3.2 Extração de DNA	50
4.3.3 Reação de PCR	51

4.3.4 Análise computacional das sequências	51
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE XILANASE	52
4.4.1 Planejamento experimental	52
4.4.2 Análises estatísticas	53
4.5 TEOR DE UMIDADE DO SUBSTRATO E ANÁLISE DA PRODUÇÃO XILANOLÍTICA	54
4.6 ESTUDO DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE XILANASE	54
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CMCASE, AVICELASE E XILANASE.....	55
4.8 ATIVIDADE DE AMILASE	56
4.9 ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE.....	56
4.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	57
4.11 EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE XILANOLÍTICA	57
4.12 PURIFICAÇÃO	58
4.12.1 Etapa da Concentração	58
4.12.2 Protocolo para cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-100)	58
4.12.3 Protocolo para cromatografia de troca iônica HiTrap SP XL	59
4.12.4 Protocolo cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-50)	60
4.12.5 Protocolo para cromatografia de troca iônica Q-sepharose® Fast Flow	61
4.13 ANÁLISES ELETROFORÉTICAS	61
4.13.1 Gel poliacrilamida SDS-PAGE	61
4.13.2 Zimograma	61
4.14 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA XILANASE BRUTA E DA PARCIALMENTE PURIFICADA.....	62
4.14.2 Efeito do pH na atividade enzimática da xilanase bruta e parcialmente purificada	62
4.14.3 Estabilidade térmica da xilanase bruta e parcialmente purificada	63
4.14.4 Estabilidade em relação ao pH das xilanases brutas e parcialmente purificada	63
4.15 EFEITO DE SAIS E REAGENTES SOBRE A ATIVIDADE XILANOLÍTICA BRUTA E PARCIALMENTE PURIFICADA PELA CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA Q-SEPHAROSE FAST FLOW	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	65

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO	66
5.3 EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DA ENZIMA: CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO	68
5.4 OTIMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA DO MEIO CULTIVO SÓLIDO	71
5.5 INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DA XILANASE.....	78
5.6 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DA XILANASE.....	79
5.7 EFEITOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA XILANASE.....	80
5.8 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	83
5.9 PURIFICAÇÃO.....	83
5.9 TEMPERATURA ÓTIMA E DE ESTABILIDADE	92
5.10 pH ÓTIMO E DE ESTABILIDADE	94
5.11 EFEITO DE ÍONS E OUTROS COMPOSTOS NA ATIVIDADE DA XILANASE BRUTA E PARCIALMENTE PURIFICADA	96
6 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios na conservação do Cerrado é demonstrar a importância que a biodiversidade desempenha no funcionamento dos ecossistemas (KLINK; MACHADO, 2005). Dentro dessa diversidade encontram-se os microrganismos, responsáveis pela ciclagem de nutrientes no solo. O monitoramento da quantidade e atividade dos microrganismos permite compreensão das mudanças nos fluxos de carbono, de energia e de gases de efeito estufa em áreas que foram modificadas por atividades agrícolas (MENDES et al., 2012). Além disso, a biomassa dos microrganismos do solo (BMS) é considerada indicador ecológico sensível da degradação do solo, por ser a principal responsável pela transformação da matéria orgânica e pelo fluxo de energia no solo. O carbono presente na BMS representa a quantidade desse elemento que a biomassa microbiana do solo imobiliza em suas células, por meio de sua avaliação é possível realizar comparações entre solos e mudanças de manejo, avaliando possíveis impactos ambientais (ALVES et al., 2011; MENDES et al., 2012).

Dentre os microrganismos presentes no solo com potencial para aplicações biotecnológicas os fungos têm despertado grande interesse, devido à vasta diversidade de enzimas que secretam no ambiente. A secreção extracelular de enzimas reduz custos nos sistemas de produção, como dispensar etapas de rompimento celular, que poderiam ocorrer em fungos leveduriformes e bactérias (GUIMARÃES et al., 2006; ANDRADE-LINARES et al., 2015). O cultivo de fungos filamentosos em substratos lignocelulósicos, nos quais se incluem os resíduos agroindustriais, tais como palhas de milho, arroz e trigo, bem como, o bagaço de cana-de-açúcar, fornecem elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais. Além disso, esses resíduos vêm sendo utilizados como substratos e/ou fontes de carbono para induzir a produção de diversas enzimas como celulases, amilases, proteases e xilanases (SINGH; KAPOOR; KUMAR, 2012).

As xilanases são enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, importante componente da hemicelulose contida na parede celular vegetal. A sua hidrólise é realizada pela ação de várias enzimas, principalmente endo- β -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8), que hidrolisam as ligações β -1,4 na cadeia principal do polissacarídeo (CARVALHO et al., 2017).

As enzimas xilanolíticas apresentam uma gama de aplicações, tais como: a hidrólise de materiais lignocelulósicos para produção de etanol, na ração animal, no processo de branqueamento da polpa de papel Kraft, nas indústrias de alimentos, como aditivo para melhorar a qualidade de pães, na clarificação de sucos, entre outras (POLIZELI et al., 2005; PAL; KHANUM, 2011).

O uso de resíduos agroindustriais no cultivo de microrganismos, além de economicamente viável, pode ajudar a resolver problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALVIRA et al., 2010; STROPARO et al., 2012; CARVALHO et al., 2017). Estes resíduos podem ser utilizados no cultivo de fungos em estado sólido assim como no submerso, para bactérias ou fungos, tais como, *Achromobacter xylosoxidans* (MAHALAKSHMI; JAYALAKSHMI, 2016) *Aspergillus niger* e *Aspergillus Flavus* (GUIMARÃES et al., 2013), *Ceriporiopsis subvermispora* (CHMELOVÁ; ONDREJOVIC, 2012), *Bacillus pumilus* SV-85S MTCC 9861 (NAGAR et al., 2014), *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 (CHAPLA et al., 2010) *Holomonas meridiana* (PALAVESAM, 2015).

O conhecimento do conjunto de enzimas que um microrganismo produz, em um determinado substrato, permite avaliar seu potencial enzimático. A caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheçam suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento dessas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos industriais. O custo da enzima é um dos principais fatores que influenciam na onerosidade dos processos. A redução no custo, pode ser alcançado pela otimização dos processos de produção (SHAH; MADAMWAR, 2005).

O processo de purificação enzimática pode ser total ou parcial, em comparação com o extrato bruto, este processo potencializa a eficiência de sua ação e rendimento. Após cada etapa de purificação o grau de pureza de proteína deve ser verificado. Nem sempre é necessário purificação total, uma vez que a purificação da enzima é um processo caro e demorado. Portanto, é necessário ter conhecimento da aplicabilidade da enzima alvo (DUTRA-MOLINO et al., 2014).

Nesse contexto, o presente trabalho visa contribuir para o descobrimento de uma espécie com potencial para produção de xilanase. Na primeira etapa, os isolados fúngicos foram reativados e cultivados sob estado sólido, utilizando farelo

de trigo como substrato, a seguir foi realizada a seleção do isolado de maior potencial de xilanase. Na segunda etapa, com o microrganismo selecionado, avaliou-se a produção em diferentes substratos lignocelulósicos como fonte de carbono, através dos cultivos em estado sólido e submerso. Na terceira etapa, foram avaliadas as melhores condições para a umidade, o tempo de cultivo e a solução salina, a fim de serem utilizadas para produção de xilanase pelo fungo *Gongronella butleri* IPS8.2 no cultivo em estado sólido. Por fim, foram estudadas as características dessa enzima, pH e temperatura ótima, e a mesma foi submetida a purificação parcial, visando a caracterização e um maior detalhamento da enzima para futuras aplicações biotecnológicas.

6 CONCLUSÕES

Os isolados em estudo apresentam resultados promissores, nas condições estabelecidas, sendo possível destacar alguns e selecionar o isolado IPS 8.2 para identificação pela análise da sequência do rDNA por ITSs.

Em relação ao fungo *Gongronella butleri* IPS8.2, espécie estudada neste trabalho, pode-se verificar que o cultivo em estado sólido se mostrou mais eficaz na produção de xilanases. A utilização de diferentes substratos lignocelulósicos, a fim de avaliar o efeito na produção de xilanase, não sobrepõe-se à utilização primordial do farelo de trigo como substrato. Com a otimização do meio foi possível melhorar a produção xilanolítica. As xilanases bruta e parcialmente purificada se mostraram moderadamente termoresistentes (faixa ótima à 45 °C), não sendo indicadas para processos biotecnológicos que demandam altas temperaturas. O pH ótimo ficou dentro da faixa esperada para espécies fúngicas, entre 5,0-5,5. Dentre os compostos fenólicos, o ácido tânico apresentou maior efeito de inibição sobre a atividade da xilanase bruta. A enzima parcialmente purificada apresentou uma estabilidade de temperatura e uma faixa de estabilidade pH inferiores à amostra bruta, nas condições analisadas. A maioria dos íons testados não inibiram a xilanase bruta e a parcialmente purificada. Para ambas as condições testadas, o Ag^+ foi o que proporcionou maior diminuição na atividade xilanolítica. Dentre os agentes modificadores testados, foi observado influências positivas na xilanase bruta e na parcialmente purificada. O único agente que proporcionou leve inibição foi o SDS, contudo, o mesmo ativou a xilanase parcialmente purificada na concentração de 5 mmol L^{-1} .

Para trabalhos futuros sugere-se avaliar o aumento da umidade inicial no CES de outros substratos, uma vez que se verificou aumento da produção de xilanases quando a umidade inicial passou de 54% para 70% no CES de *Gongronella butleri* IPS8.2 em farelo de trigo, e esse aumento da umidade não foi testado para os outros substratos analisados. Em farelo de trigo avaliar uma umidade superior a 70%, pois não houve queda na produção da xilanase. Analisar o CSm e a otimização do CES com inóculo em esporo. Com relação à purificação o ideal seria explorar outras técnicas além das utilizadas, uma vez que os dados apresentados nesse trabalho, sugerem que o fungo *Gongronella butleri* IPS8.2 produz

multiplicidade de formas de xilanases, não podendo se afirmar que são isoformas. Podendo, inclusive, se tratar de diferentes graus ou tipos de glicosilação, o que dificultou o processo de purificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDELA, I. R. et al. Production and optimization of xylanase from *Penicillium* species in solid-state fermentation. **International Journal of Recent Biotechnology**, [S.1.], v. 3, p. 15-21, 2015.

AHMAD, Z et al. Effect of wheat bran concentration on xylanase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **International Journal of Agriculture Biology**, Faisalabad, v. 11, p. 571-576, 2009. Disponível em < http://www.fsublishers.org/PUBLISHED_PAPERS/11644_..PDF>. Acesso em: 15 abr. 2018.

AHMAD, Z. et al. Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 51, p. 2445-2453, 2014.

AHMED, S.; IMDAD S.S.; JAMIL, A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 15, p. 1-8, 2012.

AJIJOLAKEWU, A. K. Optimization of production conditions for xylanase production by newly isolated strain *Aspergillus niger* through solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 11, p. 239-247, 2017.

ALMEIDA, M. C. O. **Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos**. 2012. 149 f. Dissertação mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico.

ÁLVAREZ-CERVANTES, J. et al. Phylogenetic analysis of β -xylanase SRXL1 of *Sporisorium reilianum* and its relationship with families (GH10 and GH11) of Ascomycetes and Basidiomycetes. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 24010, 2016.

ALVES, E. D. et al. Estudo do processo de obtenção celulose kraft com ênfase no forno de cal. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 16, n. 26, p. 101-220, 2015.

ALVES, T. S. et al. Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 33, p. 341-347, 2011.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ANDERSEN, N. **Enzymatic hydrolysis of cellulose**: Experimental and modeling studies. Ph.D thesis, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Copenhagen, 2007.

ANDRADE-LINARES, D. R.; VERESOGLOU, S.D.; RILLIG, M.C. Temperature priming and memory in soil filamentous fungi. **Fungal Ecology**, London, v. 21, p. 10-15, 2015.

ANGA, S. K. et al. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 48 p. 1293–1302, 2013.

ANWAR, Z.; GULFRAZB,M.; IRSHADA, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Amsterdam, v. 7, p. 163-173, 2014.

AMARO-REYES, A et al. Homologue expression of a fungal endo-1,4- β -xylanase using submerged and solid substrate fermentations. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, p. 1760-1767, 2011.

ARAKI, T.; HASHIKAWA, S.; MORISHITA, T. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the new gene encoding β -1,3-xylanase from a *Marine bacterium*, *Vibrio sp.* strain XY-214. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1741-1743, 2000.

BABU, A. G. et al. New record of *Gongronella butleri* Isolated in Korea. **Microbiology**, Seoul, v. 43, p. 166-169, 2015.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification, characterization, gene cloning and expression of GH-10 xylanase (*Penicillium citrinum* isolate HZN13). **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 169, 2016.

BAJAJ, B. K.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* p11(c) with potential for fruit juice and bakery industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 1, p. 330-337, 2012.

BAJPAI, P. **Xylanolytic Enzymes**, 1ed. EUA: Academic express, 2014.

BARRIOS-GONZALEZ J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, London, v. 47, p. 175–85, 2012.

BEDADE, D. et al. Extracellular xylanase production from a new xylanase producer *Tuber maculatum* mycelium under submerged fermentation and its characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 11, p. 288-293, 2017.

BEDFORD, M. R. Factors affecting response of wheat based diets to enzyme supplementation. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, Brisbane, v. 11, p. 1-7, 1997.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications. **Microbiology Biotechnology**, Berlim, v. 56, p. 326–338, 2001.

BERG, J. M. ; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. New York: W H Freeman, 2002.

BETINI, J. H. A. et al. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 32, p. 819-824, 2009.

BIELY P. et al. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 57, p.151–166, 1997.

BIELY P. et al. *Trichoderma reesei* XYN VI-a novel appendage-dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 281, p. 3894–3903, 2014.

BOERJAN, W.; RALPH, J.;BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519–46, 2003.

BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

BOONCHUAY, P. An integrated process for xylooligosaccharide and bioethanol production from corncob. **Bioresource Technology**, Essex, v. 256, p. 399–407, 2018.

BOONRUNG, S. et al. Purification and characterization of low molecular weight extreme alkaline xylanase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* BF1-7. **Mycoscience**, Tokio, v. 57 p. 408-416, 2016.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A.M. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, n. 162, v. 1195-205, 2010.

BUTARDO, V. M.; SREENIVASULU, N. Tailoring grain storage reserves for a healthier rice diet and its Comparative Status with Other Cereals. **International Review of Cell and MolecularBiology**, New York, v. 323, p. 42-43, 2016.

BUTT, M. S. et al. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 46, p. 22–31, 2008.

CARVALHO, E. A. et al. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides **Food Chemistry**, London, v. 221, p. 1499–1506, 2017.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D.M.G. Multivariate optimization and supplementation strategies for the simultaneous production of amylases, cellulases, xylanases, and proteases by *Aspergillus awamori* under solid-state fermentation conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 175, p. 1588-1602, 2015.

CANALS, A. et al. Structure of xylanase Xys1 from *Streptomyces halstedii*. **Acta Crystallographica**: section D, Copenhagen, v. 59, p. 1447-1453, 2003.

CASTRO, A. M.; PEREIRA J. R, Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CAVALHEIRO, G. F. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by *Gongronella butleri* using agroindustrial residues on solid-state fermentation. **Biomed Research International**, [S. l.], v. 2017, p. 1-8, 2017.

CHAKDAR, H. et al. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 6, p. 2-15, 2016.

CHANWICHA, N. et al. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid state fermentation. **Mycoscience**, Tokyo, v. 56, n. 3, p. 309-318, 2015.

CHAPLA, D. et al. Utilization of agroindustrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 49, p. 361–369, 2010.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, Essex, v. 115, p. 215-221, 2012.

CHAVEZ, R.; BULL, P. e EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

CHEN, Y. W. et al. Easy fabrication of highly thermal-stable cellulose nanocrystals using $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ catalytic hydrolysis system: a feasibility study from macro to nano-dimensions. **Materials**, Basel, v. 10, p. 2-24, 2017.

CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIC, M. Determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during pretreatment of different biomass sources. **Biotechnology and Food Sciences**, Lodz, v. 1, n. 4, p. 1168-1178, 2012.

CHUTANI, P.; SHARMA, K. K. Biochemical evaluation of xylanases from various filamentous fungi and their application for the deinking of ozone treated newspaper pulp. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 127, p. 54-63, 2015.

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

CONTE, A. J. et al. Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1147-1156, 2003.

CORREIA, M. A. S. et al. Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 286, p. 22510–22520, 2011.

CUNHA, L. et al. Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* in soybean residue. **Enzyme Research**, London, v. 2018, p. 1-7, 2018.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 9, p. 23-31, 2008.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, Philadelphia, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995.

DENISENKO, Y. A. Site-directed mutagenesis of GH10 xylanase a from *Penicillium canescens* for determining factors affecting the enzyme thermostability. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 104, p. 665-671, 2017.

DENNISON, C. **A guide to protein isolation**. Amesterdan: Springer, 2003.

DEUTSCHMANN, R. DEKKER, R. F. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, p. 1627-1640, 2012.

DOBREV, G.; ZHEKOVA, B. Purification and characterization of endoxylanase xln-2 from *Aspergillus niger* B03. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 36, p. 7-12, 2012.

DRISS, D. et al. Purification and properties of a thermostable xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 168, p. 851–863, 2012.

DUARTE, G. C. et al. Use of residual biomass from the textile industry as carbon source for production of a low molecular weight xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, Basel, v. 2, n. 4, p. 754-772, 2012.

DUODU, K. G. et al. Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of cereal science**, London, v. 38, p. 117-131, 2003.

DUTRA-MOLINO, J. V. et al. Biomolecules extracted by atps: practical examples. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, cidade do México, v. 13, p. 359-377, 2014.

EBRINGEROVÁ, A. structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular symposia**, Heidelberg, v. 232, p. 1-12, 2005.

ELEGBEDE, J. A.; LATEEF. A. Valorization of corn-cob by fungal isolates for production of xylanase in submerged and solid state fermentation media and potential biotechnological applications. **Waste and Biomass Valorization**, Dordrecht, v. 175, n. 3, p. 1-15, 2017.

ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of agrarian science**, Amsterdam, v. 15, p. 273-277, 2017.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: 2010.

FAN, G. et al. Characterization of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from *Malbranchea cinnamomea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 70, p. 482-489, 2014.

FANG, U. Y. et al. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, London, v. 43, p. 49-55, 2008.

FANG, W. Characterization of a novel β -glucosidase from *Gongronella sp.* w5 and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 62, n. 48, p. 11688–11695, 2014.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 52, p. 179-188, 2015.

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

FENGXIA, L. et al. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 5938–5941, 2008.

FERREIRA, J. A et al. Zygomycetes-based biorefinery: present status and future prospects. **Bioresource Technology**, Essex, v. 135 p. 523–532, 2013.

FESTUCCI-BUSELLI et al., Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, p. 1-13, 2007.

FORTKAMP, D.; KNOB, A. High xylanase production by *Trichoderma viride* using pineapple peel as substrate and its application in pulp biobleaching. **Africa Journal Biotechnology**, Nairobi, v. 13, n. 22, p. 2248-2259, 2014.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biociência**: ciência e desenvolvimento, v. 14, p. 12-16, 2000.

FUWA, H. A. new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 41, p. 583-603, 1954.

GAAVILIGHI, H. A. et al. Effect of selected hydrocolloids on bread staling as evaluated by DSC and XRD. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 185–188, 2006.

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

GANGWAR, A. K.; PRAKASH, N.T.; PRAKASH, R. Applicability of microbial xylanases in paper pulp bleaching: A review. **BioResources**, Raleigh, v. 9, n. 2, p. 3733-3754, 2014.

GARCIA-KIRCHNER, O. et al. Submerged fermentation with two filamentous fungi for cellulolytic and xylanolytic enzyme production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98, p. 1105-1114, 2002.

GHOSHAL, G.; SHIVARE, U. S.; BANERJEE, U. C. Thermo-mechanical and microstructural properties of xylanase containing whole wheat bread. **Food Science and Human Wellness**, Amsterdam, v. 5, p. 219-229, 2016.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GREEN A.A; HUGHES WL. Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, New York, v. 1, p. 67–90, 1955.

GRUBER, K. et al. Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high resolution x-ray structure and modeling studies. **Biochemistry**, Easton, v. 37, p. 13475-13485, 1998

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUIMARÃES, N. C. A et al. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. **Springer Plus**, Cham, v. 2, p. 380, 2013.

GULERIA, S. et al. Mutagenesis of *Cellulosimicrobium sp.* CKMX1 for hyperproduction of xylanase in solid state fermentation of apple pomace. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, Bangalore, v. 85, p. 241–252, 2015.

GULERIA, S. et al. Optimization of cultural conditions for cellulase-free xylanase production by mutant strain of alkalophilic *Cellulosimicrobium sp.* CKMX1 in submerged fermentation. **Applied Biology Research**, New Delhi, v. 15, p. 137-144, 2013.

GUPTA G.; VIKRAM, S.; RAJINDER K. G. Thermal stability and thermodynamics of xylanase from *Melanocarpus albomyces* in presence of polyols and salts. **BioResources**, Raleigh, v. 9, n. 4, p. 5801-5816, 2014.

GUPTA, P.; SAMANT, K.; SAHU, A. Isolation of cellulose degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. **International Journal of Microbiology**, Cairo, v. 2012, p. 1-5, 2012.

GUPTA, V. Production of thermo-alkali-stable laccase and xylanase by co-culturing of *Bacillus* sp. and *B. halodurans* for biobleaching of kraft pulp and deinking of waste paper. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 38, p. 947-956, 2015.

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Essex, v. 58, p. 137-161, 1996.

HAQUE, M. A.; SHAMS-UD-DIN, M.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. **Internacional Journal of Food Science Technology**, v. 37, p. 453–462, 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, p. 422-427, 1972.

HASLAM, E. Vegetable tannins: lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 68, p. 2713-2721, 2007.

HASUNUMA, T. et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 135, p. 513–522, 2012.

HEINEN, P. R et al. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 13, n. 9, p. 1047-1055, 2014.

HEINEN, P. R. GH11 xylanase from *Aspergillus tamaritii* kito: purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 108, p. 291-299, 2018.

HO, L. H. *Aspergillus* xylanases. **Journal of Advances in Microbiology**, [S. 1.], v. 5, p. 1-12, 2017.

HO, L. H. Batch submerged fermentation in shake flask culture and bioreactor: influence of different agricultural residuals as the substrate on the optimization of xylanase production by *Bacillus subtilis* and *Aspergillus brasiliensis*. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, [S. 1.], v. 1, p. 2-9, 2016.

HO, L. H.; LAU, L.Y. Bioprocessing of agricultural wastes as optimised carbon source and optimisation of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus brasiliensis* in agitated solid state fermentation (Ssf). **Biodiversity, Bioprospecting and Development**, [S. 1.], v. 1, p. 125, 2014.

HORN, S. V. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, p. 1-12, 2012.

IBARRA, D. et al. Combination of alkaline and enzymatic treatments as a process for upgrading sisal paper-grade pulp to dissolving-grade pulp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 7416-7423, 2010.

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

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q., One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Amsterdam, v. 7, p. 317-326, 2014.

IZIDORO, S. C.; KNOB, A. Production of xylanases by an *Aspergillus niger* strain in wastes grain. **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 313-319, 2014.

IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERI, C. G. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 28, p. 33-48, 1995.

JAIN, I.; KUMAR, I.; SATYANARAYANA, I. Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 53, p. 131-142, 2015.

JAIN, K. K. et al. Production of thermostable hydrolases (cellulases and xylanase) from *Thermoascus aurantiacus* RCKK: a potential fungus. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 38, p. 787-796, 2015.

JIANG, Z. et al. Improvement of the bread making quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase from *Thermotoga maritima*. **Food Research International**, Barking, v. 38, p. 37-43, 2005.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, p. 1219-1227, 2012.

KALIM, B.; BÖHRINGER, N.; ALI, N.; SCHÄBERLE, F. T. Xylanases—from microbial origin to industrial application. **British Biotechnology Journal**, Gurgaon, v. 7 p. 1-20, 2015.

KAPILAN, R.; ARASARATNAM, V. Industrial applications of bacterial xylanases: a review. **Middle-East Journal of Scientific Research**, Deira, v. 25, p. 79-89, 2017.

KAR, S. et al. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 36, p. 57-68, 2013.

KAUSHIK P.; MISHRA, A.; MALIK, A. Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation international. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 96 p. 1-8, 2014.

KAWAMOTO, H.; MIZUTANI, K.; NAKATSUBO, F.; Binding nature and desnaturation of protein during interaction with galloylglucose. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 46, p. 473-478, 1997.

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 80, p. 241-247, 2000.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 803-807, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A Conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-154, 2005.

KNOB, A. et al. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResource**, Raleigh, v. 9, p. 5738-5773, 2014.

KNOB, A. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **Biomed Research International**, [S. I.], v. 2013, p. 1-8, 2013.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 2, p. 429-443, 2010.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. β -xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, p. 389-407, 2010.

KOMIYA, D. Crystal structure and substrate specificity modification of acetyl xylan esterase from *Aspergillus luchuensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 83 p. 1-13, 2017.

KOZLOVA, L. V.; MIKSHINA, P. V.; GORSHKOVA, T. A. Glucuronoarabinoxylan extracted by treatment with endoxylanase from different zones of growing maize root. **Biochemistry**, Easton, v. 77, p. 395-403, 2012.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

LAFOND, M. et al. Four GH11 xylanases from the xylanolytic fungus *Talaromyces versatilis* act differently on (arabino)xylans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, p. 6339-6352, 2014.

LAFOND, M. et al. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, p. 4-8, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 39, p. 1266–1290, 2014.

LEE, J.-W. et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009.

LEE, K. C. et al. Purification and characterization of a xylanase from the newly isolated *Penicillium rolsii* c3-2(1) IBRL. **BioResources**, Raleigh, v. 10, p. 1627-1643, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 3.ed. São Paulo: SARVIER, 2000.

LI, H. et al. The hydrolytic efficiency and synergistic action of recombinant xylan-degrading enzymes on xylan isolated from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 175, p. 199–206, 2017.

LI, K. et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 1/2, p. 89-94, 2000.

LIAO, H. et al. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, Essex, v. 123, p. 117-124, 2012.

LIAO, H. et al. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 12631, 2015.

LIAO, H. et al. A new acidophilic endo- β -1,4-xylanase from *Penicillium oxalicum*: cloning, purification, and insights into the influence of metal ions on xylanase activity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 41, p. 1071–1083, 2014.

LINARES-PASTÉN, J. A.; ARONSSON, A.; KARLSSON, E. V. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. **Current Protein and Peptide Science**, [S. l.], v. 19, p. 48-67, 2018.

LÓPEZ, A. M. Q.; SILVA, A. L. S. S.; SANTOS, E. C. L. The fungal ability for biobleaching/biopulping/bioremediation of lignin-like compounds of agro-industrial raw material. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, p. 916-931, 2017.

LUCENA-NETO, S. A.; FERREIRA-FILHO, E. G. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 86-90, 2004.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506–557, 2002.

MAHALAKSHMI, M.; JAYALAKSHMI, S. Amylase, cellulase and xylanase production from a novel bacterial isolate *Achromobacter xylosoxidans* isolated from marine environment. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, Namakkal, v. 1, p. 230-233, 2016.

MAITAN-ALFENAS, G. P. et al. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 91, p. 60–67, 2016.

MARTINS, A. S. et al. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia= Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 2118-2124, 2006.

MASUI, D. C. et al. Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *Thermoidea* under solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, p. 2689–2701, 2012.

MEDEIROS, R. G. et al. Application of xylanases from amazon forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 231-238, 2007.

MENDES, I. C. et al. Biological functioning of brazilian cerrado soils under different vegetation types. **Plant and Soil**, The Hague, v. 359, p. 183–195, 2012.

MENEZES, B. S.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 33, n. 3, p. 58, 2017.

MERALI, Z. et al. Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, p. 2-13, 2015.

MICHELIN, M. et al. Purification and biochemical properties of multiple xylanases from *Aspergillus ochraceus* tolerant to Hg^{2+} ion and a wide range of pH. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 174, p. 206–220, 2014.

MILANEZI, N. V. G. et al. Isolation and characterization of a xylan-degrading enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with potential for industrial applications. **BioEnergy Research**, New York, v. 5, p. 363–371, 2012.

MILLATIA, R. et al. 2nd generation ethanol by Zygomycetes fungi at elevated temperature. **Energy Procedia**, Amsterdam, v. 52, p. 104–109, 2014.

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

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, L. R. S. M. et al. Two β xylanases from *Aspergillus terreus*: characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 60, p. 46-52, 2013.

MORETTI, M. M. S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.

MORISSON, D.; VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. The effect of alcohols, lignin and phenolic compounds on the enzyme activity of *Clostridium cellulovorans* XynA. **Bioresources**, Raleigh, v. 6, n. 3, p. 3132–3141, 2011.

MOUKOULI, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning and optimized expression of a GH-11 xylanase from *Fusarium oxysporum* in *Pichia pastoris*. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, p. 369-374, 2011.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bio-process Technology**, New York, v. 5, p. 657-664, 2012.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V. K. Two way strategy for utilizing agricultural waste 'wheat bran' for production and immobilization of xylanase. **Journal of Innovative Biology**, [S. I.], v. 1, p. 035-044, 2014.

NAIDU, D. S. et al. Bio-based products from xylan: a review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 179, p. 28–41, 2018.

NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal of Microbiology Research**, [S. I.], v. 2, p. 082-086, 2008.

NORGREN, M.; EDLUND, K. Lignin: recent advances and emerging applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, v. 19, p. 409-416, 2014.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta: - parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, p. 3, 2017.

OGEDA, T. L.; E PETRI, D. F. S Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OKAZAKI, F. Expression, crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of thermostable b-1,3-xylanase from *Thermotoga neapolitana* strain DSM 4359. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. 67, p. 779–781, 2011.

OLIVEIRA, D. S. et al. Production of crude xylanase from *Thermoascus Aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 75, n. 7, p. C588-C594, 2010.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substrato**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande de Norte, Natal, Rio Grande de Norte, 2014.

PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND. J. A GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, p. 564–592, 2012.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process Biochemistry**, London, v. 46, p. 879-887, 2011.

PALAVESAM, A. Investigation on lignocellulosic saccharification and characterization of haloalkaline solvent tolerant endo-1,4 β -D-xylanase from *Halomonas meridiana* APCMST-KS4. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 4, p. 761–766, 2015.

PANDEY, A. K.; EDGARD, G. NEGI, S. Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* sn5 through evop-factorial design technique and application in sorghum stover based bioethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 98, p. 51-56, 2016.

PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, p. 879–903, 2012.

PEREIRA, H.; GRAÇA, J.; RODRIGUES, J. C. Wood chemistry in relation to quality. In: **Wood quality and its biological basis**. Oxford: Ed. Barnett J. R.; Jeronimidis G. CRC Press, 2003. p. 53-86.

POINTNER, M. et al. Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. **Agronomy Research**, Tartu, v. 12, p. 391–396, 2014.

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

POLIZELI, M. L. T. M.; NOGUEIRA-PEIXOTO, S. C., SILVA, T. M. et al. Gel electrophoresis. In: **Gel electrophoresis for investigating enzymes with biotechnological application**. EUA: Sameh Magdeldin, 2012. p. 98-109.

POLLET, A. et al. Functional analysis of glycoside hydrolase family 8 xylanases shows narrow but distinct substrate specificities and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, p. 2125–2135, 2010.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and indentification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987.

PU, Y. P. et al. Challenges of the utilization of wood polymers: how can they be overcome? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, p. 1525–1536, 2011.

QUERIDO, A. L. S. **Purificação parcial e caracterização da xilanase produzida por *Penicillium expansum***. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

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. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

RAGAUSKAS, A. J. et al. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, Washington, v. 16, n. 344, p. 6185, 2014.

RAMIRES, E. C. **Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e glixal reforçadas com fibra naturais**. 2010. 277 f. Tese (Doutorado Engenharia Química) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. New York: Worth Publ., 2001.

RETORE, M. et al. Efeito da fibra de coprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia= Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1232-1240, 2010.

RIBEIRO, L. F. C. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 7, p. 115, 2014.

ROY, S. et al. Novel xylanases from *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604: comparative analysis of production, purification and characterization of enzyme from submerged and solid state fermentation. **Springer plus**, Cham, v. 2, p. 382, 2013.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, London, v. 454, p. 841–845, 2008.

SAHA, S. P.; GHOSH, S. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, p. 188-196, 2014.

SAINZ-POLO, M. A. et al. Structural analysis of glucuronoxylan-specific xyn30D and its attached CBM35 domain gives insights into the role of modularity in specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 31088-31101, 2014.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANDRIM, V. C. et al. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 1823–1828, 2005.

SANTOS, F. R. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SANTOS, F. R. S. et al. Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, p. 633-641, 2016.

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

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 30, n. 12. p. 3875-3883, 1991.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010

SEEMAKRAM, W. et al. Purification and characterization of low molecular weight alkaline xylanase from *Neosartorya tatenoi* kku-clb-3-2-4-1. **Mycoscience**, Tokyo, v. 57, p. 326-333, 2016.

SENNA, S. N. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulasas utilizando resíduos agroindústrias**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

SHAH, A. R.; AND MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 1763-1771, 2005.

SHAHRESTANI, H. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 109, p. 51-58, 2016.

SHARMA, A. et al. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study. **Bioresource Technology**, Essex, v. 169, p. 96-102, 2014.

SHARMA, H. P.; PATEL, H.; SHARMA, S. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits:-a review. **Trends in Post Harvest Technology**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 01-14, 2014.

SHIMIZU, K., 2001. Chemistry of hemicelluloses. In: **Wood and cellulosic chemistry**. New York: 2 ed. D.N.-S. Hon, N. Shiraishi, Marcel Dekker Inc, 2001. p. 177-214.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

SHRIVASTAVA, S.; SHUKLA, P.; MUKHOPADHYAY, K. Purification and preliminary characterization of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* strain SS-8. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 1, p. 255–259, 2011.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 18 p. 307-313, 2015.

SILVA, C. O. G. et al. GH11 xylanase from *Emericella nidulans* with low sensitivity to inhibition by ethanol and lignocellulose-derived phenolic compounds. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 362, p. 1-8, 2015.

SILVA, N. F. S et al. Improvement in the bleaching of kraft pulp with xylanase from *Penicillium crustosum* FP 11 isolated from the atlantic forest. **Biocatalysis and Biotransformation**, Amsterdam, v. 34, p. 119-127, 2016.

SILVA, D. F. Evaluation of different biological and chemical treatments in agroindustrial residues for the production of fungal glucanases and xylanases. **Process Biochemistry**, London, v. 67, p. 29-37, 2018.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, S. S. et al. R.B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros: ciência e tecnologia**, São Carlos, v. 98, p. 25-33, 1998..

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass: – an overview. **Bioresource Technology**, Essex, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGH, R.; KAPOOR, V.; KUMAR, V. Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic Actinomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, p. 1545-1552, 2012.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 174, 2016.

SINGHANIAA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13-18, 2009.

SIQUEIRA, F. G.; E.X.FERREIRA. FILHO, E. X. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, [S. l.], v. 7, p. 54-60, 2010.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: a review of preparation, properties and applications. **Polymers**, [S. l.], v. 2, p. 728-765, 2010.

SISSI, C.; PALUMBO, M. Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. 702-711, 2009.

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, Amsterdam, v. 2. p. 1-20, 2017.

SOOCH, B. S; KAULDHAR, B. S. Influence of multiple bioprocess parameters on production of lipase from *Pseudomonas sp.* BWS-5. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, p. 711-721, 2013.

SOREK, N. et al. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. **BioScience**, Washington, v. 64, p. 192-201, 2014.

SORGATTO, M. et al. Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, p. 8076-8084, 2012.

SRIDEVI. A. Biocatalytic activity of *Aspergillus niger* xylanase in paper pulp biobleaching. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 3-7, 2016.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 33, p. 2267-2278, 2012.

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

- SULEMAN, M. Production and characterization of xylanase from *Aspergillus niger* using wheat bran, corn cobs, and sugar cane bagasse as carbon sources with different concentrations. **Journal of Bioresource Management**, Dayton, v. 3, p. 1-10, 2016. DOI 1
- SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, Essex, v. 199, p. 49–58, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- TAKAHASHI, Y.; KAWABATA, H.; MURAKAMI, S. Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. **SpringerPlus**, Cham, v. 2, p. 447, 2013.
- TAN, S. C. et al. The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 30 p. 239-242, 1996.
- TAVERNARI, F. C. et al. Polissacarídeo não-amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 5, p. 673–689, 2008.
- TERRASAN, C. R. F.; GUIBAN, J. M.; CARMONA, E. C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: purification, characterization and hydrolysis of substrates. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 54-62, 2016.
- TERRONE, C. C. et al., Agroindustrial biomass for xylanase production by *Penicillium chrysogenum*: purification, biochemical properties and hydrolysis of hemicelluloses. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 33, p. 39-45, 2018.
- THAKUR, V. K; THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 72, p. 834–847, 2015.
- TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.
- UDAY, U. S. P et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 82 p. 1041–1054, 2016.
- URBANIKOVA, L. et al. Structural basis for substrate recognition by *Erwinia chrysanthemi* GH30 glucuronoxylanase. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 278, p. 2105-2116, 2011.
- VALENZUELA, S. V. et al. The glycoside hydrolase family 8 reducing-end xylose releasing exo-oligoxylanase rex8A from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 is active on branched xylooligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, p. 5116-5124, 2016.

VENTORIM, R. Z. Impact of the removal of N-terminal non-structured amino acids on activity and stability of xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 106, p. 312–319, 2018.

VIIKARI, L. et al. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 108, p. 121–145, 2007.

VITCOSQUE, G. L. et al. The functional properties of a xyloglucanase (GH12) of *Aspergillus terreus* expressed in *Aspergillus nidulans* may increase performance of biomass degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, p. 9133-9144, 2016.

WALIA, A. et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotechnology**, Heidelberg, v. 7, p. 2-12, 2017.

WALIA, A. et al. Improvement for enhanced xylanase production by *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 using central composite design of response surface methodology and its application in biobleaching. **3 Biotechnology**, Heidelberg, v. 5, p. 1053–1066, 2015a.

WALIA, A. et al. Modification in the properties of paper by using cellulase-free xylanase produced from alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 in biobleaching of wheat straw pulp. **Canadian Journal of Microbiology= Revue canadienne de microbiologie**, Ottawa, v. 61, p. 1-11, 2015b.

WAN, Q. et al. Direct determination of protonation states and visualization of hydrogen bonding in a glycoside hydrolase with neutron crystallography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 112, p. 12384–12389, 2015.

WINGFIELD, P. T. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, New York, v. 3 p. 2-10, 2016.

WONG, D. W. S.; CHAN, V. J.; BATT, S. B. Cloning and characterization of a novel exo- α -1,5-L-arabinanase gene and the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 79, p. 941–949, 2008.

WONG, K. K. Y. ; TAN, L. U. L.; SADDLER J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 52 n. 3 p. 305-317, 1988.

XIMENES, E. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 48, p. 54-60, 2011.

YANG, Q. et al. Identification of three important amino acid residues of xylanase AfxynA from *Aspergillus fumigatus* for enzyme activity and formation of xylobiose as the major product. **Process Biochemistry**, London, v. 50, p. 571-581, 2015.

YANG, X et al. Two xylose-tolerant gh43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one gh11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. **Food Chemistry**, London, v. 148, p. 381-387, 2014.

YANG, Y. et al. Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. *African Journal of Microbiology Research*, [S. I.], v. 4, p. 2249-2256, 2010.

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* nr1 y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, London, v. 221, p. 67-75, 2017.

YEOMAN, C. J. et al. Chapter 1. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 70, p. 1-55, 2010.

ZANGH, P.; LYND, R. L. Toward and aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplex cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 8, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZANUNCIO, A. J.V. ; COLODETTE, J. L. Teores de lignina e ácidos urônicos na madeira e polpa celulósica de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 341-347, 2011.

ZHANG, G. M. et al. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 339–346, 2007.

ZHANG, H; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 97, p. 101-110, 2015.

ZHANG, Y. et al. Structure features of GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii*: implication for its thermophilic adaption and substrate binding preference. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 48, n. 10, p. 948–957, 2016.

ZHOU, X. et al. A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, Stockholm, v. 5, p. 52–79, 2016.

ZIMBARDI, A. L. R. L. et al. Optimization of β -glucosidase, β -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, p. 2875-2902, 2013.