

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E  
APLICAÇÃO DE XILANASES DE *Aspergillus hortae*

JULIANA MONTESINO DE FREITAS NASCIMENTO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Abril - 2017

JULIANA MONTESINO DE FREITAS NASCIMENTO

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS  
E APLICAÇÃO DE XILANASES DE *Aspergillus hortae*

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia do Câmpus de Rio  
Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor  
em Ciências Biológicas  
(Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona

RIO CLARO  
2017

547.758 Nascimento, Juliana Montesino de Freitas  
N244p       Produção, purificação, propriedades bioquímicas e  
aplicação de xilanases de *Aspergillus hortae* / Juliana  
Montesino de Freitas Nascimento. - Rio Claro, 2017  
120 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Eleonora Cano Carmona

1. Enzimas. 2. Produção de xilanases. 3. *Aspergillus  
hortae*. 4. Aplicação na panificação. 5. Purificação e  
caracterização. 6. Enzimas halotolerantes. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

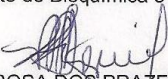
TÍTULO DA TESE: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E APLICAÇÃO DE XILANASES DE *Aspergillus hortae*

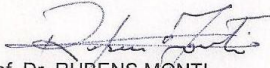
**AUTORA: JULIANA MONTESINO DE FREITAS NASCIMENTO**

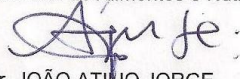
**ORIENTADORA: ELEONORA CANO CARMONA**

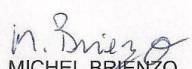
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

  
Profa. Dra. ROSA DOS PRAZERES MELO FURRIEL  
Departamento de Química / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

  
Prof. Dr. RUBENS MONTI  
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. JOÃO ATÍLIO JORGE  
Departamento de Biologia / Universidade de São Paulo

  
Prof. Dr. MICHEL BRIENZO  
Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia - IPBEN

Rio Claro, 10 de abril de 2017

*Dedico este trabalho a minha mãe Ana e  
ao meu pai Marcos, amor e gratidão eternos!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona, pela orientação deste trabalho, por tudo que tem me ensinado, pelo carinho, confiança e amizade.

À amiga Cárol Cabral Terrone por todos os ensinamentos no laboratório, pela paciência e ajuda nos experimentos, porém mais do que isso por ter tantas vezes me emprestado os ouvidos, pela cumplicidade, bondade e prontidão.

À Daniela Turati, Gabriela Vieira e Marina Turini por estarem sempre prontas a ajudar, pelo auxílio profissional e pessoal e pela amizade.

Aos amigos do laboratório Michel e Carol por toda a ajuda.

À Carmen Silvia Casonato de Souza, pela amizade, pelo apoio técnico e paciência.

À Profa. Dra. Caroline Joy Steel e a doutoranda Amanda Nogueira pela orientação e auxílio na aplicação da enzima.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues e o aluno e amigo Danilo Polezel pela identificação da linhagem do fungo e pelo apoio prestado.

À Maria Antonia pela realização das análises de toxinas.

A todo corpo docente, técnicos e colegas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e demais setores da UNESP – Rio Claro.

A CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos da EJNS: Flávia e Alexandre por todo carinho e aconselhamento, ao Juninho e família por terem sido tão acolhedores e amigos, ao Sérgio pelas piadas e por ter me apresentado o Thiago, a Renata, Denise, Flavinha, Christopher, Silvania, Andreia, pelo acolhimento, confiança, amizade e pelos momentos de descontração.

Ao Thiago, por todo apoio e companheirismo e por tornar mais completa esta fase final.

Aos meus pais, Marcos e Ana por não medirem esforços e renunciarem tantas coisas para que eu chegasse até aqui.

E principalmente a Deus que me envolveu em sua Divina Misericórdia me dando forças para realizar e contemplar tantas coisas que aos olhos humanos pareciam impossíveis.

“Jesus eu confio em Vós”  
(Santa Faustina Kowalska)

## RESUMO

Xilanases são enzimas que possuem uma gama de aplicações biotecnológicas, como hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica para produção de etanol, branqueamento de polpa de papel Kraft, na ração animal, na indústria de alimentos como aditivo para melhorar a qualidade de pães, na clarificação de sucos, entre outras. Essa variedade de aplicações deve-se a atuação das xilanases sobre os resíduos de xilose da cadeia principal do xilano, o segundo principal componente da parede celular vegetal, liberando xilooligossacarídeos. A amplitude de aplicações confere às xilanases posição de destaque econômico e grande exploração científica, principalmente na busca por xilanases estáveis ou tolerantes a condições físico-químicas mais extremas de temperatura, pH e salinidade. Este estudo mostra, pela primeira vez, a produção, purificação e aplicação de xilanases de *Aspergillus hortae*, um fungo isolado de lagoas salinas da região do Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. A produção de xilanases foi realizada utilizando sabugo de milho como substrato. Após a realização de um planejamento experimental, as condições ótimas de cultura foram pH 5,36 e 35 °C. As xilanases caracterizadas no filtrado de cultura apresentaram pH e temperatura ótimos de 6,5 e 55 °C bem como estabilidade em pH 3,0 a 8,0 e cerca de 70% da atividade ainda estava presente após 5 h de incubação do filtrado a 50 °C. A aplicação do filtrado de cultura na produção de pães, resultou na redução da firmeza do miolo, provocando um efeito anti-endurecimento, o que é um fator positivo quando se considera a vida de prateleira do pão. O filtrado de cultura foi submetido aos testes de purificação em trocador catiônico e aniônico bem como cromatografias de exclusão molecular, resultando na purificação de três xilanases, Xyl I, Xyl II e Xyl III, com massas moleculares de 33, 25 e 29 kDa, respectivamente. O pH ótimo das enzimas purificadas foi em torno de 6,0 a 6,5 e a temperatura ótima 55 °C, exceto para Xyl III que foi a 65 °C. As três enzimas apresentaram interessante tolerância e estabilidade ao NaCl, com destaque para Xyl I que foi ativada, especialmente a 4 M de NaCl, bem como permaneceram estáveis em 177%, 75% e 58%, respectivamente, quando incubadas a 2 M de NaCl por 3 h a 25 °C. Os resultados deste trabalho indicam o potencial de aplicação destas enzimas em processos industriais como na panificação e também processos que requerem estabilidade em faixas de pH e salinidade mais extremas, como branqueamento de polpa de papel Kraft e preparação de alimentos derivados de frutos do mar, respectivamente.

**Palavras chave:** *Aspergillus hortae*. Produção de xilanases. Aplicação na panificação. Purificação e caracterização. Enzimas halotolerantes.

## ABSTRACT

Xylanases are enzymes that have a range of biotechnological applications, such as enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for ethanol production, bleaching of Kraft paper pulp, in animal feed, in the food industry as an additive to improve the quality of breads, clarification of juices, among others. This variety of applications is due to the action of xylanases on the xylose residues of the xylan main chain, the second main component of the plant cell wall, releasing xylooligosaccharides. The range of applications gives xylanases an outstanding economic position and great scientific exploration, mainly in the search for stable or tolerant xylanases to extreme physicochemical conditions, such as high temperature, pH or salinity. This study shows, for the first time, the production, purification and application of xylanases of *Aspergillus hortae*, a fungus isolated from saline lagoons in the Pantanal region of Mato Grosso do Sul, Brazil. The xylanases production was carried out using corn cobs as a substrate. After an experimental design, optimum culture conditions were pH 5.36 and 35 °C. The xylanases characterized in the culture filtrate presented optimum pH and temperature of 6.5 and 55 °C as well as stability at pH 3.0 to 8.0 and almost 70% of the activity was still present after 5 h incubation of the filtrate at 50 °C. The application of the culture filtrate in the bread production resulted in a reduction of the firmness of the crumb, causing an anti-stalling effect, which is a positive factor when considering the shelf life of the bread. The culture filtrate produced under the conditions described above was subjected to purification tests, which included chromatographic steps in cationic and anionic exchangers as well as exclusion chromatography, resulting in the purification of three xylanases, Xyl I, Xyl II and Xyl III, with molecular mass of 33, 25 and 29 kDa, respectively. The optimum pH of the purified enzymes was around 6.0-6.5 and the optimum temperature 55 °C, except for Xyl III which was at 65 °C. The three enzymes presented interesting tolerance and stability to NaCl, especially Xyl I, which was activated mainly at 4 M NaCl, as well as remained stable at 177%, 75% and 58%, respectively, when incubated at 2 M NaCl for 3 h at 25 °C. The results of this work indicate the potential application of these enzymes in industrial processes such as baking and also processes that require stability in more extreme pH and salinity ranges, such as bleaching of Kraft paper pulp and preparation of foods derived from seafood, respectively.

**Keywords:** *Aspergillus hortae*. Production of xylanases. Application in baking. Purification and Characterization. Halotolerant enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

Figura 1: Estrutura da parede celular vegetal dos resíduos agroindustriais.....	21
Figura 2: Estrutura geral do xilano mostrando as possíveis ligações encontradas na parede celular de plantas.....	23
Figura 3: Estrutura dos xilanos de dicotiledôneas e gramíneas.....	24
Figura 4: Perfil de degradação do xilano e pontos onde as enzimas atuam.....	27
Figura 5: Mecanismo de reação das xilanases.....	39
Figura 6: Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico envolvendo endoxilanase e $\beta$ -xilosidase.....	30
Figura 7: Funcionalidades de endoxilanase na produção de pão.....	37
Figura 8: Classificação do arabinoxilano da farinha de trigo de acordo com a solubilidade em água.....	38
Figura 9: <i>Aspergillus hortae</i> . Colônias incubadas a 25 °C por 7 dias em meio CYA.....	47
Figura 10: Mapa de localização da região da Nhecolândia.....	48

### Capítulo 01

Figura 1: Time-course of xylanase production by <i>A. hortae</i> .....	59
Figura 2. Response surface curve (a) and contour plot (b) of the combined effects of pH and temperature on the xylanase activity by <i>A. hortae</i> .....	62
Figura 3: Influence of pH (a) and temperature (b) on the xylanase activity and pH (c) stability and thermoestability (d) of crude filtrate from <i>Aspergillus hortae</i> . ....	64
Figura 4: Control bread (a) and bread added xylanase (b).....	69

### Capítulo 02

Figura 1: Macro and micro morphological characteristics of <i>Aspergillus hortae</i> isolated from saline lakes of Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brazil.....	80
Figura 2: Phylogenetic tree of <i>Aspergillus</i> species and the fungus under study denoted in the bold clade.....	81
Figure 3: Elution profile of <i>A. hortae</i> xylanases from CM Sephadex C-50 column.....	82
Figura 4: Elution profile of <i>A. hortae</i> Xyl I xylanase from DEAE Sephadex A-50 column chromatography.....	83
Figure 5: Gel filtration on Sephadex G-75 of the Xyl I from <i>A. hortae</i> .....	83
Figure 6: Gel filtration on Sephadex G-75 of the Xyl II from <i>A. hortae</i> .....	84
Figure 7: Gel filtration on Sephadex G-75 of the Xyl III from <i>A. hortae</i> .....	85
Figure 8: SDS PAGE of purified xylanases from <i>Aspergillus hortae</i> .....	86

Figure 9: Influence of pH and temperature on the activity of xylanases from <i>A. hortae</i> ...	88
Figure 10: Stability on different pH of xylanases from <i>A. hortae</i> .....	89
Figure 11: Thermostability of xylanases from <i>A. hortae</i> .....	90
Figure 12: Thin-layer chromatography of the hydrolysis products of oat spelts xylan by xylanases from <i>A. hortae</i> .....	95

## LISTA DE TABELAS

### Revisão Bibliográfica

Tabela 1: Composição lignocelulósica de alguns resíduos e subprodutos agroindustriais..	20
Tabela 2: Recentes pesquisas na aplicação de xilanases.....	34
Tabela 3: Influência da adição de xilanase nos parâmetros de qualidade do pão.....	41

### Capítulo 01

Table 1. Effect of different carbon source on xylanase production by <i>A. hortae</i> .....	57
Table 2: Experimental design and results of the 2 <sup>2</sup> factorial design.....	60
Table 3: Regression analysis of the 2 <sup>2</sup> factorial design.....	61
Table 4: Analysis of variance (ANOVA) for the second order polynomial models.....	61
Table 5: Farinographic and alveographic parameters and pasting properties of the control formulation (wheat flour) and of the xylanase added formulation (xylanase + wheat flour).....	67
Table 6: Technological parameters of the loaves.....	68

### Capítulo 02

Table 1: Purification steps of xylanases from <i>A. hortae</i> .....	82
Table 2: Substrate specificity of xylanases from <i>A. hortae</i> .....	89
Table 3: Kinect parameters of xylanases from <i>A. hortae</i> .....	91
Table 4: Effect on ions and substances on Xyl II and Xyl III activity.....	92
Table 5: Xylanases activities and stability on NaCl of xylanases from <i>A. hortae</i> .....	94

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	16
<b>2.2 Objetivos específicos:</b> .....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>3.1 Biomassa lignocelulósica</b> .....	17
3.1.1 <i>Estimativa da geração de resíduos provenientes das principais atividades agrícolas e agroindustriais do Brasil e benefícios do reaproveitamento desta biomassa</i> .....	17
3.1.3 <i>Aspectos estruturais e moleculares da biomassa lignocelulósica</i> .....	19
3.1.4 <i>Hidrólise da biomassa lignocelulósica</i> .....	24
<b>3.2 Xilanases</b> .....	25
3.2.1 <i>Complexo xilanolítico</i> .....	25
3.2.2 <i>Estrutura, classificação e modo de ação</i> .....	26
3.2.3 <i>Regulação da produção de xilanases</i> .....	30
3.2.4 <i>Multiplicidades de xilanases em microrganismos</i> .....	31
3.2.5 <i>Recentes abordagens na aplicação de xilanases</i> .....	34
3.2.6 <i>Aplicação de xilanases na produção de pão</i> .....	36
<b>3.3 Planejamento Experimental como ferramenta na otimização da produção de xilanases</b> ..	42
<b>3.4 Fungos produtores de xilanases, condições de cultivo e propriedades destas enzimas</b> .....	43
<b>3.5 Microrganismo de estudo: <i>Aspergillus hortae</i>, primeiro relato da espécie como produtora de xilanases</b> .....	46
<b>4 CAPÍTULO 1: Production, physical-chemical properties and breadmaking application of <i>Aspergillus hortae</i> xylanases</b> .....	49
<b>4.1 ABSTRACT</b> .....	50
<b>4.2 INTRODUCTION</b> .....	51
<b>4.3 MATERIAL AND METHODS</b> .....	52
4.3.1 <b>Microorganism</b> .....	52
4.3.2 <b>Culture conditions and preparation of crude extracts</b> .....	52
4.3.3 <b>Effect of carbon source</b> .....	53
4.3.4 <b>Xylanase assay</b> .....	53
4.3.5 <b>Protein determination</b> .....	53
4.3.6 <b>Effect of culture time and agitation on xylanase production</b> .....	53
4.3.7 <b>Effect of pH and temperature on xylanase production</b> .....	54
4.3.8 <b>Optimum pH and temperature and stability of crude filtrate from <i>A. hortae</i></b> .....	54
4.3.9 <b>Breadmaking application</b> .....	55
4.3.9.1 <i>Ingredients</i> .....	55

4.3.9.2 Rheological properties .....	55
4.3.9.3 Xylanases extract preparation.....	55
4.3.9.4 Bread formulation .....	55
4.3.9.5 Preparation of breads .....	56
4.3.9.6 Evaluation of the breads .....	56
4.3.9.7 Statistical analysis.....	56
<b>4.4 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.1 Influence of the carbon source on xylanase production.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.2 Optimization of culture conditions .....</b>	<b>58</b>
4.4.2.1 Time course of xylanase production by <i>A. hortae</i> in static and shaking conditions .....	58
4.4.2.2 Response surface methodology (RSM) for optimizing xylanase production .....	60
<b>4.4.3 Properties of the xylanases present in crude extract.....</b>	<b>63</b>
4.4.3.1 Optimum pH and temperature.....	63
4.4.3.2 pH and temperature stability.....	65
<b>4.4.4 Breadmaking application .....</b>	<b>66</b>
4.4.4.1 Rheological properties .....	66
4.4.4.1 Evaluation of the breads .....	67
<b>4.5 CONCLUSION.....</b>	<b>70</b>
<b>5 CAPÍTULO 2: Halotolerant xylanases of <i>Aspergillus hortae</i> isolated from saline environment: purification and partial characterization.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1 ABSTRACT .....</b>	<b>72</b>
<b>5.2 INTRODUCTION.....</b>	<b>73</b>
<b>5.3 MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3.1 Fungal identification .....</b>	<b>74</b>
<b>5.3.2 Culture conditions and filtrate obtention.....</b>	<b>75</b>
<b>5.3.3 Enzyme assay .....</b>	<b>76</b>
<b>5.3.4 Protein and carbohydrate determination.....</b>	<b>76</b>
<b>5.3.5 Purification .....</b>	<b>76</b>
5.3.5.1 General procedures.....	76
5.3.5.2 Chromatography steps .....	77
<b>5.3.6 Biochemical characterization of purified xylanases .....</b>	<b>77</b>
5.3.6.1 Molecular mass determination.....	77
5.3.6.2 Electrophoresis.....	77
5.3.6.3 Optima pH and temperature, thermal and pH stability .....	78
5.3.6.4 Effect of ions and substances on xylanase activity.....	78
5.3.6.5 Effect of NaCl on xylanases activity and stability.....	78

5.3.6.6 Substrate specificity and kinetic parameters .....	79
5.3.6.7 Hydrolysis products.....	79
<b>5.4 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>79</b>
<b>5.4.1 Fungal identification and phylogenetic analysis.....</b>	<b>79</b>
<b>5.4.2 Purification of <i>Aspergillus hortae</i> xylanases.....</b>	<b>81</b>
<b>5.4.3 Physico-chemical characterization of xylanases from <i>A. hortae</i> .....</b>	<b>86</b>
5.4.3.1 Molecular mass .....	86
5.4.3.2 Effect of pH and temperature .....	87
5.4.3.3 Substrate specificity and kinetic parameters .....	89
5.4.3.4 Effect of metallic ions and substances.....	91
5.4.3.5 Effect of NaCl on xylanases activities and stability .....	93
5.4.3.6 Hydrolysis products.....	95
<b>5.5 CONCLUSION.....</b>	<b>96</b>
<b>5.6 SUPPLEMENTARY MATERIAL .....</b>	<b>96</b>
<b>6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente necessidade de tornar os processos industriais mais vantajosos quanto aos aspectos de rendimento, operacionalidade e, conseqüentemente, competitividade encontra, principalmente nos últimos anos, desafios perante a coerência com o que é ecologicamente correto. Sob esta perspectiva, cada vez mais as indústrias se interessam não apenas por métodos e substâncias com implicação direta nos parâmetros que determinarão a produtividade e lucratividade, mas também pelos métodos de reaproveitamento de resíduos ou subprodutos, principalmente os de origem agroindustriais, oriundos da biomassa lignocelulósica.

Neste contexto, as enzimas microbianas como ferramentas da biotecnologia têm exibido aplicações no atendimento dos interesses conjuntos de aprimoramento dos processos industriais, reaproveitamento de resíduos, minimização dos impactos causados pela liberação dos mesmos no ambiente e conseqüente cumprimento das exigências de fiscalização ambiental.

Devido à intensa exploração e a gama de aplicações dessas enzimas, este mercado tem apresentado crescimento progressivo. O segmento movimentou em 2014, valores da ordem de 4,2 bilhões de dólares e espera-se que se desenvolva a uma taxa composta de crescimento anual de 7% no período de 2015 a 2020 para chegar a aproximadamente 6,2 bilhões de dólares (SINGH et al., 2016). O Brasil, por outro lado, apesar da diversidade ambiental e do grande potencial de bioprospecção e descoberta de microrganismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico, tem contribuído com pequena fatia desse mercado (DE GODOY DAIHA et al., 2016). Segundo BON e colaboradores (2008), o país contribuiu com apenas 3,7% do mercado internacional em 2005. A pequena participação brasileira e a predominância das importações indicam uma situação de desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso destes biocatalisadores no país (BON et al., 2008; DE GODOY DAIHA et al., 2016). Tal contexto necessita ser revertido, principalmente devido ao grande potencial de bioprospecção e desenvolvimento de patentes através da aplicação de enzimas microbianas em processos industriais. Isso torna de extrema importância iniciativas governamentais de apoio ao desenvolvimento dessas tecnologias, como a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, que considera em suas diretrizes as enzimas industriais como áreas prioritárias (BRASIL, 2007).

As xilanases ou 4- $\beta$ -D-xylan xylohydrolases (EC 3.2.1.8) são amplamente estudadas pela diversidade de aplicações industriais graças à capacidade de hidrolisar o xilano, o segundo

principal componente da biomassa vegetal. Dentre as aplicações das xilanases, uma delas é na panificação a fim de melhorar os aspectos reológicos da massa, volume do pão.

Apesar das inúmeras pesquisas com xilanases obtidas a partir do cultivo de microrganismos em resíduos ou subprodutos agroindustriais bem como sua aplicação em diferentes processos industriais, ainda é importante a descoberta de enzimas que sejam tolerantes a determinadas condições de temperatura, pH, salinidade e outras inúmeras propriedades requeridas por uma gama de processos industriais nos quais elas são empregadas. Assim, a produção, purificação e caracterização de xilanases termotolerantes, halotolerantes ou alcalinotolerantes merece destaque, evidenciado pelas inúmeras pesquisas e prospecção de microrganismos em ambientes extremófilos. Desta forma, o presente trabalho mostrou, pela primeira vez, a produção, purificação, caracterização e aplicação de xilanases de *Aspergillus hortae* isolado de lagoas salinas do Pantanal Mato-Grossense.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a produção de enzimas xilanolíticas de *Aspergillus hortae* utilizando meios de cultivo alternativos e estudar a aplicação do filtrado na produção de pão, purifica-las e caracteriza-las bioquimicamente.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Avaliar as melhores condições de cultivo para produção de xilanases extracelulares por *Aspergillus hortae*;
- Avaliar a aplicação do filtrado contendo xilanases na produção de pão em relação às características reológicas, volume e efeito anti-endurecimento.
- Purificar e caracterizar parcialmente as principais xilanases produzidas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biomassa lignocelulósica

##### 3.1.1 *Estimativa da geração de resíduos provenientes das principais atividades agrícolas e agroindustriais do Brasil e benefícios do reaproveitamento desta biomassa*

A intensa atividade agrícola do Brasil, representada especialmente pelos cultivos da cana-de-açúcar, café e milho, gera anualmente toneladas de resíduos sólidos como bagaço de cana, casca de café, palha e sabugo de milho.

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais representativas do Brasil, correspondendo a 14,76% do total da área plantada no país, perdendo apenas para a soja e para o milho (IPEA, 2012). A intensa produção agrícola também acompanha a intensa geração de resíduos, sendo que para cada tonelada de cana-de-açúcar esmagada e consequente obtenção de produtos, são produzidos cerca de 100 a 400 kg de torta de filtro, 800 a 1 mil litros de vinhaça e 260 a 280 kg de bagaço de cana moída (SILVA; GOMES; ALCINA, 2007; IPEA, 2012).

Considerando os dados do relatório apresentado pelo IPEA, “Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas”, pode-se observar que a produção total de cana-de-açúcar foi de 671.394.957 toneladas e que o montante estimado de resíduos gerados, bagaço e torta de filtro, pelo processamento da cana-de-açúcar, foi de 201.418.487 toneladas em 2009 (IPEA, 2012), ou seja, aproximadamente 30% do total de produção. Assim, conforme a porcentagem residual citada anteriormente, a produção total de 694,54 milhões de toneladas de cana-de-açúcar destinada à indústria estimada para a safra 2016/2017 pode gerar em torno de 222 milhões de toneladas de resíduo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016).

Com relação a geração de resíduos provenientes da cultura do café, pode-se assumir uma porcentagem de 50% de resíduos sólidos (casca e polpa) sobre a parcela total de café processado (IPEA, 2012). Desta forma, considerando que o Brasil teve em 2016 uma produção total de café em grão da ordem de 2.937.034 toneladas (IBGE, 2016), isso representa uma estimativa de 1.468.517 toneladas de resíduo sólido de café gerados neste ano. A quantidade de casca de café gerada anualmente no Brasil justifica o emprego dessa biomassa, tanto para fins energéticos, como para extração de compostos químicos de alto valor comercial, devendo ser melhor explorado em pesquisas.

Por fim, o Brasil ocupa a terceira posição na produção mundial de milho, sendo esta uma das principais culturas geradoras de resíduos no país. A maior parte da produção é

destinada à ração animal, mas o milho também pode ser transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais. Entretanto, algumas partes da planta, como palha e sabugo, não apresentam utilização economicamente viável, constituindo-se muitas vezes em resíduos, totalizando um fator residual de 58%, segundo a Associação Brasileira de Indústrias da Biomassa (ABIB, 2011). A produção total de milho no Brasil em 2016 foi em torno de 63 milhões de toneladas de grãos de milho e, empregando-se o fator residual da ABIB, pode-se também estimar um montante em torno de 36 milhões de toneladas de resíduos provenientes desta cultura. Ainda, sabendo-se que para cada 100 kg de grãos de milho processados são gerados aproximadamente 18 kg de sabugo de milho (BAGBY; WIDSTROM, 1987), um total de aproximadamente 11 milhões de toneladas de sabugo de milho foram gerados nesse período.

Embora os excedentes da indústria de processamento do milho sejam, geralmente, utilizados como combustível em caldeiras, ração ou adubo, nem sempre esta utilização é economicamente viável e pode muitas vezes constituir um problema. A utilização desses resíduos, além de possibilitar a redução do custo de conversão em produtos de valor agregado, também vai ao encontro com a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) implementada pela lei nº 12.305, de 02 de Agosto de 2010, que salienta a destinação final ambientalmente adequada para resíduos sólidos, incluindo a reutilização e o aproveitamento energético (BRASIL, 2010; INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA, 2012).

Sob esta perspectiva, soluções para aplicação destes resíduos e subprodutos são necessárias e, dentre as possíveis resoluções, está a utilização do sabugo de milho e outros resíduos para cultivo de microrganismos e extração de enzimas ou sua conversão em produtos químicos de valor agregado como ácidos lático e cítrico, açúcares e etanol (ASHOUR et al., 2013). O foco das pesquisas é encontrar formas de aumentar a eficácia no processo de conversão da biomassa lignocelulósica oriunda de resíduos agroindustriais em produtos de valor agregado através da otimização da hidrólise química ou enzimática deste material (ARORA; BEHERA; KUMAR, 2015; LIMAYEM; RICKE, 2012; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Este contexto de conversão da biomassa lignocelulósica oriunda de resíduos agroindustriais em produtos de valor agregado encontra-se além das pesquisas, manifestando-se através do conceito de biorefinaria que abrange a transformação desta biomassa em produtos com maior valor agregado, principalmente biocombustíveis. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), o conceito de biorefinaria, embora dinâmico, compreende instalações que integram processos de conversão da biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, rações e especialmente energia, através de rotas de conversão

bioquímicas, microbianas, químicas e termoquímicas, com a finalidade de melhorar o aproveitamento da biomassa lignocelulósica e da energia nela contida, minimizar os efluentes, maximizando os benefícios e o lucro (EMBRAPA AGROENERGIA, 2011). No Brasil, a instalação de biorefinarias já é uma realidade, atualmente o país conta com três plantas de etanol 2G em operação, sendo duas em escala comercial: Granbio (no Estado do Alagoas) e Raízen (no Estado de São Paulo) e uma planta demonstrativa (Centro de Tecnologia Canavieira – CTC) (POPP et al., 2016).

Considerando a existência das biorefinarias, a utilização de subprodutos ou resíduos agroindustriais ricos em celulose, hemicelulose e lignina para produção de bioetanol e outros produtos, ou ainda, como substratos para cultivo de microrganismos e produção de enzimas com potencial de utilização na etapa de pré-tratamento, hidrólise enzimática, indústria de alimentos, polpa de papel e detergentes, apresenta benefícios tanto do ponto de vista tecnológico, uma vez que reduz o custo de produção dessas enzimas e permite a viabilização de sua aplicação em diversos processos industriais, como também ambiental e energético devido a minimização de resíduos e possibilidade de produção de energia renovável a partir deste material (ARORA; BEHERA; KUMAR, 2015; IQBAL; KYAZZE; KESHAVARZ, 2013; LIMAYEM; RICKE, 2012).

O conhecimento da composição estrutural dos resíduos agroindustriais é extremamente importante para os processos de conversão em produtos de valor agregado. Materiais lignocelulósicos como palhas, cascas, caules, talos vegetais e subprodutos do processamento industrial como bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de malte, sabugo de milho, entre outros, por serem constituídos de componentes da parede celular vegetal, são ricos em celulose, hemicelulose e lignina em porcentagens variadas, dependendo da espécie vegetal e do tipo de processamento. A Tabela 1 mostra a composição de alguns materiais lignocelulósicos.

### *3.1.3 Aspectos estruturais e moleculares da biomassa lignocelulósica*

A biomassa lignocelulósica compreende o termo utilizado para a biomassa derivada da parede celular de vegetais, as quais correspondem às paredes primária, secundária, terciária e lamela média (KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016). Como pode ser observado na Figura 1, este material possui estrutura complexa e heterogênea caracterizada por polissacarídeos como celulose, hemicelulose e lignina, proteínas estruturais e compostos fenólicos que podem variar em composição, dependendo do tipo de planta (GÍRIO et al., 2010; GUERRIERO et al., 2016).

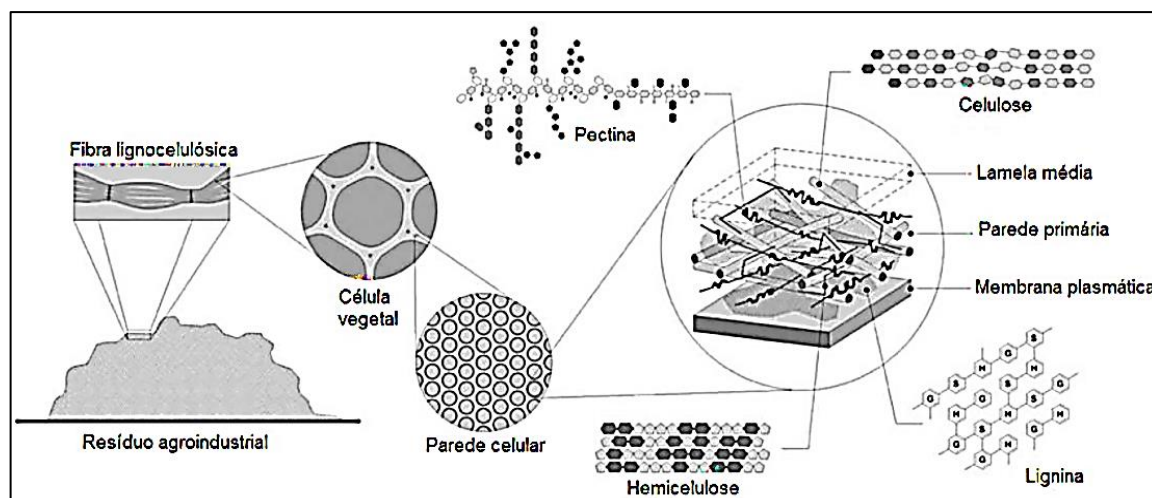
**Tabela 1-** Composição lignocelulósica de alguns resíduos e subprodutos agroindustriais

Composição (% de peso seco)				
Tipo de biomassa	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referências
Palha de banana	53	29	15	SILVEIRA et al., 2008
Palha de cevada	23	21	21	ADAPA et al., 2011
Palha de canola	22	17	20	ADAPA et al., 2011
Fibra de coco	36-43	15-25	41-45	GRAMINHA et al., 2008
Casca de café	18	13	-	MUSSATTO et al., 2011b
Grãos de café	9	37	-	MUSSATTO et al., 2011a
Sabugo de milho	45	35	15	LIMAYEAMA; 2012
Palha de milho	33	25	8	GRAMINHA et al., 2008
Silagem de milho	38-40	28	7-21	GRAMINHA et al., 2008
Talos de algodão	58	14	22	NIGAM et al., 2009
Semente de uva	7	31	44	GRAMINHA et al., 2008
Casca de nozes	25-30	25-30	30-40	HOWARD et al., 2003
Palha de algodão	40	27	18	NIGAM et al., 2009
Casca de arroz	22	23	15	MEGAWATI et al., 2011
Palha de arroz	32	24	18	LIMAYEMA; Ricke, 2012
Palha de centeio	38	31	19	NIGAM et al., 2009
Bagaçõ de sorgo	40	36	4	DOGARIS et al., 2009
Talos de sorgo	27	25	11	GRAMINHA et al., 2008
Palha de sorgo	35	24	-	TÉLLEZ-LUIS, 2002
Talos de soja	35	25	20	NIGAM et al., 2009
Resíduo de açúcar de beterraba	26	19	3	EL-TAYEB et al., 2012
Bagaçõ de cana	35-45	26-36	11-25	ZHAO et al., 2009
Palha de cana	36	21	16	SAAD et al., 2008
Caulões de girassol	34	20	17	RUIZ et al., 2008
Palha de trigo	27	21	23	ADAPA et al., 2011

Fonte: Adaptado de KNOB et al., 2014.

Plantas lenhosas como madeiras possuem em torno de 50% de celulose, 25% de lignina e 25% de hemicelulose. Constituem a maior fonte de carbono dos ecossistemas terrestres e, conseqüentemente, uma das mais importantes *commodities* devido ao potencial biotecnológico de geração de energia. Dessa forma, a biomassa lignocelulósica é extensivamente estudada do ponto de vista de composição estrutural, tanto *in natura* quanto sob a forma de resíduos ou subprodutos agroindustriais, a fim de encontrar melhores formas de hidrólise, degradação da lignina e produção de etanol a partir da celulose e hemicelulose (BRIENZO et al., 2015; VAN KUIJK et al., 2015).

**Figura 1** - Estrutura da parede celular vegetal.



Fonte: DE SIQUEIRA et al., 2010.

A lignina é encontrada na parede celular de plantas vasculares associada por ligação covalente a heteropolissacarídeos de forma que preenche e une firmemente a lacuna entre e em torno da celulose e hemicelulose, conferindo rigidez, impermeabilidade e proteção a ataques microbianos (RAGAUSKAS et al., 2014). Trata-se de um heteropolímero amorfo e aromático composto por unidades de fenil propano. Sua biossíntese ocorre a partir do acoplamento de radicais álcoois como coniferil, sinapil e p-coumaril, dando origem no polímero a subunidades guaiacil, siringil e hidroxifenil, respectivamente (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012; KUMAR; RAHIKAINEN et al., 2013; GAUTAM; DUTT, 2016).

A celulose consiste de uma cadeia linear de unidades de D-glicose unidas por ligação glicosídica do tipo  $\beta$ -1,4, sendo portanto um homopolímero. Tal configuração confere estabilidade e permite que as cadeias longas se unam paralelamente por ligações de hidrogênio, dando origem às microfibrilas e essas, por sua vez, às fibrilas de celulose (JARVIS, 2003; GUERRIERO et al., 2016; WANG; HONG; 2016). Dessa forma, a celulose organiza-se, a partir de uma única unidade anidroglicopiranosose, em uma estrutura complexa na qual um grande número de ligações de hidrogênio intra e inter moleculares são a base da coesão entre as moléculas, conferindo rigidez, sendo referidas como regiões cristalinas da celulose (MEDRONO; LINDMAN, 2015; GUERRIERO et al., 2016). A celulose também apresenta regiões amorfas no espaço entre as microfibrilas em paredes primárias e secundárias que são mais facilmente degradadas (KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016). Alguns estudos têm abordado a questão da estrutura anisotrópica, ou natureza anfifílica da celulose, ou seja, a presença de regiões na longa cadeia com clara diferença de polaridade. Estes estudos estão

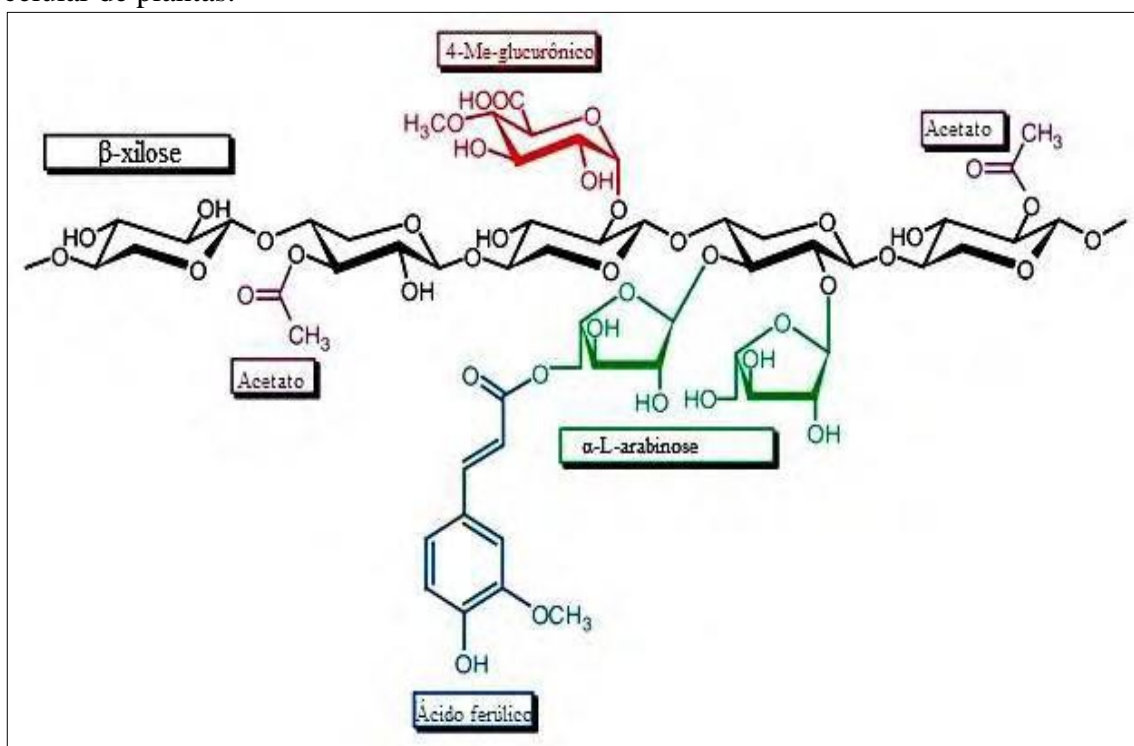
baseados na presença de três grupos hidroxil na posição equatorial do anel de glucopiranosose, conferindo hidrofiliabilidade, e ligações de átomos de carbono e hidrogênio na posição axial do anel, conferindo hidrofobicidade (YAMANE et al., 2006; MEDRONHO; LINDMAN, 2015).

Hemiceluloses são heteropolímeros muito representativos da parede celular vegetal, constituindo 20 a 35% do seu peso em massa, dependendo da fonte vegetal. Encontram-se associadas à celulose por ligações de hidrogênio no espaço entre as microfibrilas, e ainda podem formar ligações covalentes com a lignina, favorecendo adesão e coesão das fibras e proteção da celulose contra celulasas (VAN DYK; PLETSCHE, 2012; SHARMA; KUMAR, 2013; KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016;). As hemiceluloses são polímeros complexos de carboidratos que apresentam grande variabilidade química e molecular. Apresentam uma cadeia principal composta principalmente por D-xilose, podendo apresentar também outras pentoses como L-arabinose e também hexoses como D-manose, D-glicose e D-galactose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000; KUMAR; SINGH, S; SINGH, O, 2008; KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016). A cadeia principal pode apresentar ramificações contendo ácido urônico, ácido ferúlico e pequenas porções de outros açúcares como arabinose, galactose,  $\alpha$ -L-ramnose,  $\alpha$ -L-fucose e grupos hidroxilas de monossacarídeos parcialmente substituídos por grupos acetil (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). As hemiceluloses normalmente são designadas de acordo com o principal monossacarídeo presente como xiloglucanos (D-xilose e D-glicose), glucomananas (D-glicose e D-manose), galactoglucomananas (D-galactose, D-glicose e D-manose), arabinogalactanos (D-galactose e arabinose) e, os mais comumente encontrados, os xilanos (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; KIEMLE et al., 2014).

O xilano está presente na interface entre a lignina e a celulose em plantas como madeira, gramíneas, cereais e ervas como um dos principais constituintes da hemicelulose da parede celular vegetal, podendo corresponder a aproximadamente 35% da sua composição (MOREIRA; FILHO, 2016). É o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose, representando um terço do carbono orgânico renovável na terra (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; DE SIQUEIRA; FERREIRA; XIMENES, 2010; KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016;). Além disso, o xilano também pode ser encontrado em algas marinhas, como *Caulerpa*, *Bryopsis*, *Bangia*, *Porphyra*, e *Palmaria* spp., entre outras; nas algas, os resíduos de xilose na cadeia principal do xilano estão unidos por ligações  $\beta$ -1,3, diferentemente da estrutura comumente encontrada em plantas terrestres (EBRINGEROVA, 2000; MAEDA et al., 2012; UMEMOTO; SHIBATA; ARAKI, 2012).

Conforme evidenciado na Figura 2, a estrutura geral do xilano em plantas apresenta uma cadeia principal composta por resíduos de D-xilose unidos por ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 e uma diversidade de substituintes como glucuronopiranosil, 4-O-metil-D-glucuronopiranosil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil, acetil, feruloil ou grupos laterais de p-coumaroil (DODD; CAN, 2009; PATEL; SAVANTH, 2015; MOREIRA; FILHO, 2016). O xilano de sabugo de milho, por exemplo, apresenta estrutura constituída por ácido 4-O-metil-D-glucurônico, L-arabinose e D-xilose nas proporções de 2:7:19, respectivamente (SILVA et al., 1998; GARCIA; GANTER; CAVALHO, 2000).

**Figura 2** - Estrutura geral do xilano mostrando as possíveis ligações encontradas na parede celular de plantas.

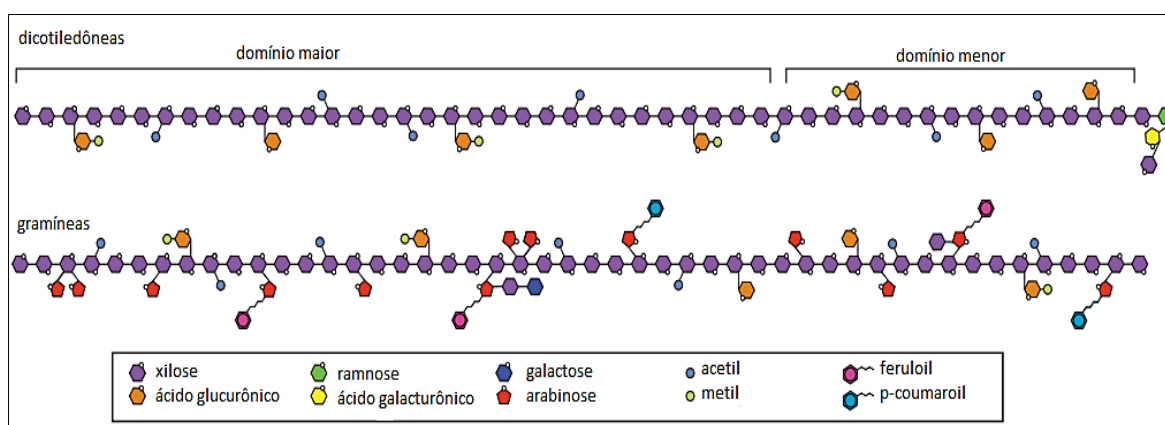


Fonte: DODD; CANN, 2010.

A estrutura do xilano também pode variar em relação a diversidade de substituintes dependendo do tipo de planta, como mostra a Figura 3. O xilano de dicotiledôneas é substituído com ácidos glucurônico, metil-glucurônico e acetato; podem apresentar substituições de arabinose e ramnose e ácido galacturônico nas extremidades redutoras; em gramíneas, o xilano pode estar substituído com arabinose, xilose, galactose, e ácidos ferúlico e cumárico (RENNIE; SCHELLER, 2014). Os xilanos podem ser caracterizados como arabinoxilanos, presentes em

cereais como o trigo, com grupamentos  $\alpha$ -L-arabinofuranosil; glucuronoxilanos que ocorrem em madeira de folhosas como a faia ou *beechwood* e a bétula ou *birchwood*, que apresentam o ácido  $\alpha$ -D-glucurônico ou seu derivado 4-O-metil-glucurônico como substituintes; e os arabinoglucuroxilanos de gramíneas, cereais e madeira de coníferas, que contém ácido  $\alpha$ -D-glucurônico e  $\alpha$ -L-arabinose (BIELY, 2012; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). A estrutura do xilano varia também quanto ao grau de polimerização, entre 50 e 185 unidades em gramíneas, cereais e madeiras de coníferas, e de 150 a 200 em xilanos de folhosas (GÍRIO et al., 2010; KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016).

**Figura 3** - Estrutura dos xilanos de dicotiledôneas e gramíneas



Fonte: RENNIE; SCHELLER, 2014.

A diversidade no padrão de distribuição destes substituintes encontrados na biomassa lignocelulósica oriunda de diferentes fontes vegetais determina uma gama de propriedades como solubilidade, interações com outras substâncias poliméricas da parede celular, degradabilidade por enzimas e comportamento em solução (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000). Tais características são fundamentais e devem ser consideradas pois interferem nas etapas de hidrólise do material lignocelulósico a açúcares fermentescíveis (BIELY, 2012; GUERRIERO et al., 2016).

### 3.1.4 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

No contexto das biorefinarias, metodologias que elucidem formas eficientes de hidrólise da biomassa lignocelulósica oriunda de resíduos agroindustriais são extremamente necessárias a fim de aumentar o rendimento e reduzir o custo para produção de uma gama de

compostos químicos (ULLAH et al., 2015; YANG et al., 2015). A conversão de celulose e hemicelulose biologicamente, usando enzimas e microrganismos, requer cinco principais processos que iniciam com procedimentos físicos como o corte e a moagem e prosseguem com uma etapa fundamental da qual dependerá o sucesso da hidrólise, que é o pré-tratamento. Embora existam diversos tipos de pré-tratamento, esta etapa, no geral, consiste do tratamento químico da biomassa, principalmente para remoção da lignina, realizado por ácido ou álcali para facilitar a reação enzimática no processo de hidrólise enzimática ou sacarificação. Posteriormente, segue-se à sacarificação enzimática a fim de hidrolisar a celulose e hemicelulose em açúcares monoméricos (açúcares fermentáveis), que devem ser fermentados e convertidos em combustíveis ou outros produtos químicos até finalmente a recuperação do produto e purificação (LIMAYEM; RICKE 2012; BRIENZO et al., 2015; KIM, S.; LEE; KIM, T., 2016; KUMAR; GAUTA; DUTT, 2016).

Diversos trabalhos têm apresentado propostas variadas para resolução das problemáticas que envolvem as etapas de pré-tratamento e hidrólise (LIMAYEM; RICKE, 2012; KIM, S.; LEE; KIM, T., 2016; KOBAYASHI et al., 2016; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Tais propostas, vão desde o estudo de formas de pré-tratamento que proporcione modificações estruturais mais interessantes para expor os polissacarídeos do material vegetal a ação da hidrólise enzimática até a otimização do rendimento na fermentação de pentoses e hexoses por microrganismos geneticamente modificados (COLABARDINI et al., 2014). Atualmente não apenas a celulose tem sido o foco destas pesquisas, mas também a hidrólise das hemiceluloses e o reaproveitamento da lignina (MORALES et al., 2015; KIM, S.; LEE; KIM, T., 2016; KOBAYASHI et al., 2016). Brienzo e colaboradores (2017) evidenciaram que a modificação da lignina desempenhou fator importante para melhorar a acessibilidade da celulose do bagaço de cana-de-açúcar.

## **3.2 Xilanases**

### *3.2.1 Complexo xilanolítico*

Para hidrólise enzimática eficiente do material lignocelulósico são necessárias uma série de enzimas com diferentes mecanismos de ação que agem cooperativamente. Quando se trata da hidrólise do xilano, devido à complexidade química e estrutural decorrente da heterogeneidade dos substituintes da cadeia principal que dificultam a quebra, é necessário um sistema enzimático conhecido como complexo xilanolítico para que ocorra a hidrólise completa. Este complexo enzimático pode ser encontrado naturalmente como parte do ciclo do

carbono em microrganismos que secretam uma multiplicidade de enzimas hidrolíticas com diferentes especificidades, responsáveis por diminuir o grau de polimerização do xilano com formação de oligossacarídeos solúveis e hidrólise dos substituintes nas cadeias laterais. Dessa forma, os componentes da parede celular vegetal não se acumulam no planeta, mas são degradados e reciclados (SHARMA; KUMAR, 2013; GONÇALVES et al., 2015; MOREIRA, et al., 2016). As enzimas que compõe o complexo xilanolítico agem cooperativamente e com diferentes especificidades por substratos, conforme mostra a Figura 4, para a degradação do xilano em pequenos fragmentos como xilose, xilobiose, xilooligosacarídeos e heterossacarídeos que contém xilose (KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016; MOREIRA; FILHO, 2016; TERRASAN; GUIBAN; CARMONA, 2016).

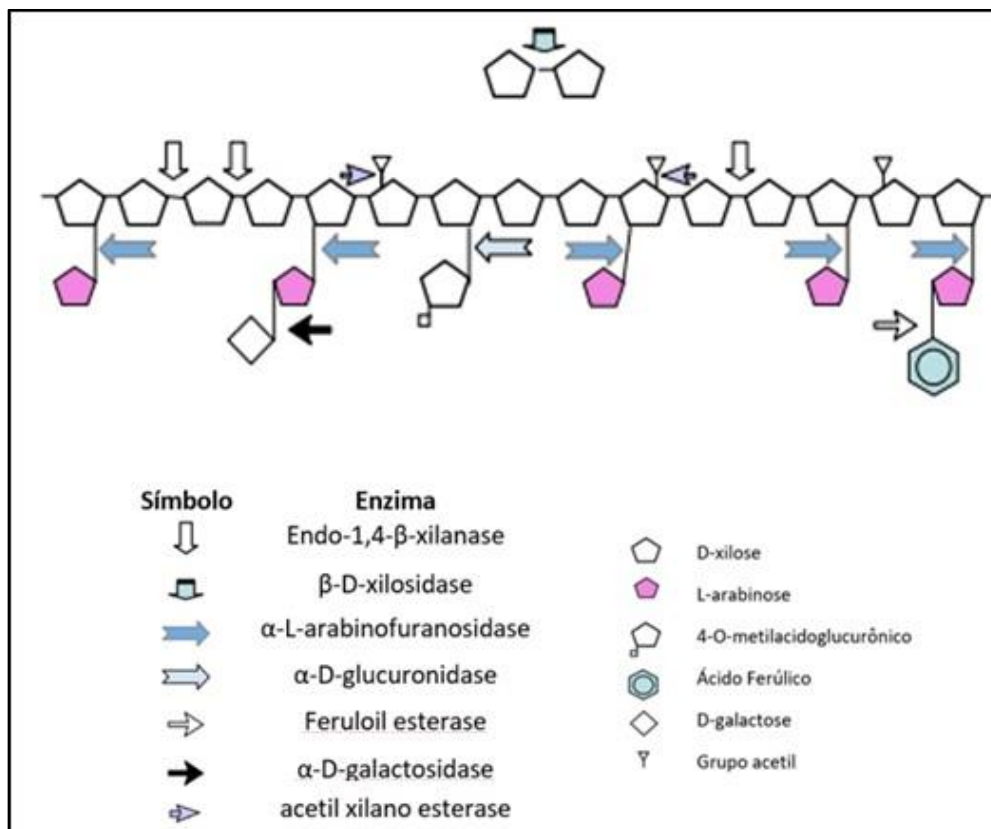
Fazem parte do complexo xilanolítico as endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (E.C.3.2.1.8), que catalisam a hidrólise da cadeia principal do xilano à xilooligosacarídeos; as 1,4- $\beta$ -xilosidasas (E.C.3.2.1.37), que hidrolisam xilooligosacarídeos liberando resíduos de xilose a partir das extremidades não redutoras; as  $\alpha$ -glucosiduronases (E.C.3.2.1.139), que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,2 do ácido glucurônico com os resíduos de xilose; as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (E.C.3.2.1.55), que removem os substituintes de L-arabinoses; as acetil xilano esterases (E.C.3.1.1.72), que removem substituintes O-acetil dos resíduos de xilose e as esterases dos ácidos ferúlico (3.1.1.73) e p-cumárico (3.1.1.\_\_), que hidrolisam as ligações ésteres destes componentes ligados nas cadeias laterais do xilano (DODD; CAN, 2009; JUTURU; WU, 2013; SHARMA; KUMAR, 2013; MOREIRA; FILHO, 2016) (Figura 4). A taxa de hidrólise do xilano depende do comprimento da cadeia e do grau ou tipo de substituição (GÍRIO et al., 2010; SHARMA; KUMAR, 2013).

### 3.2.2 Estrutura, classificação e modo de ação

As xilanasas são consideradas as principais enzimas do complexo xilanolítico que atuam na hidrólise e despolimerização do xilano. Estas enzimas agem na cadeia principal deste polímero e são responsáveis por clivar as ligações  $\beta$ -1,4 que unem as unidades de xilopiranosose, liberando xilooligosacarídeos (SHARMA; KUMAR, 2013; MOREIRA; FILHO, 2016). De acordo com a base de dados de enzimas com ação sobre carboidratos ou *carbohydrate-active enzyme* (CAZy), as xilanasas pertencem à classe de enzimas com função na degradação de carboidratos, as glicosil hidrolases (GHs), ou seja, enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre uma porção carboidrato - não carboidrato. As GHs são

representadas pelo código EC 3.2.1.x, onde x representa o substrato específico, mecanismo molecular ou o tipo de ligação (HENRISSAT; DAVIES, 1997; UDAY et al., 2016).

**Figura 4** - Perfil de degradação do xilano e pontos onde as enzimas atuam.



Fonte: ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005.

A diversidade de xilanases existente, proveniente de diferentes fontes como bactérias, fungos, plantas e insetos, permite classificá-las em diferentes famílias, como GH 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62 que apresentam uma variedade de mecanismos de ação, especificidade ao substrato, atividades hidrolíticas e características físico-químicas (MOREIRA; FILHO, 2016; UDAY et al., 2016). Esta diversidade pode ser salientada pelo fato de que algumas destas famílias compreendem enzimas bifuncionais, por conter dois domínios catalíticos de diferentes famílias; outras famílias, como 9, 12, 26, 30 e 44, possuem atividade xilanase apenas secundária ou residual; e nas famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 encontram-se xilanases com domínios catalíticos com evidente atividade endo-1,4-β-xilanase (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005; MOREIRA; FILHO, 2016).

Uma classificação baseada na análise do grupamento hidrofóbico do domínio catalítico e da similaridade da sequência de aminoácidos tem colocado xilanases primariamente nas famílias 10 e 11, sendo estas também as GHs mais frequentemente produzidas por fungos (VERMA; SATYANARAYANA, 2012; IMJONGJAIRAK et al., 2015). Xilanases das famílias 10 e 11 diferem em diversos aspectos. Com relação a estrutura, xilanases da família 10 exibem domínio catalítico cilíndrico com configuração do tipo barril  $\alpha/\beta$  com arquitetura octopregueada, enquanto as xilanases da família 11, exibem estrutura globular assemelhando-se a uma mão direita parcialmente fechada. (SEGATO et al., 2014). Diferenças nas propriedades físico-químicas como massa molecular e ponto isoelétrico (pI) também podem ser observadas entre estas famílias; xilanases da família 10 apresentam massa molecular maior que 30 kDa e pI menor e xilanases da família 11, massa molecular menor que 30 kDa e pI maior (SEGATO et al., 2014; MOREIRA; FILHO, 2016).

Xilanases das famílias 10 e 11 apresentam diferenças na especificidade por xilanos; algumas xilanases da família 10 são menos específicas, apresentando portanto maior versalidade, sendo capazes de hidrolisar formas substituídas da cadeia do xilano, produzindo oligossacarídeos que carregam substituintes na extremidade não redutora do resíduo de xilanopiranoose, enquanto que xilanases da família 11 são menos versáteis por serem mais específicas e atuarem sobre regiões não substituídas do xilano, exclusivamente em substratos que contém resíduos de D-xilose (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005; IMJONGJAIRAK, 2015).

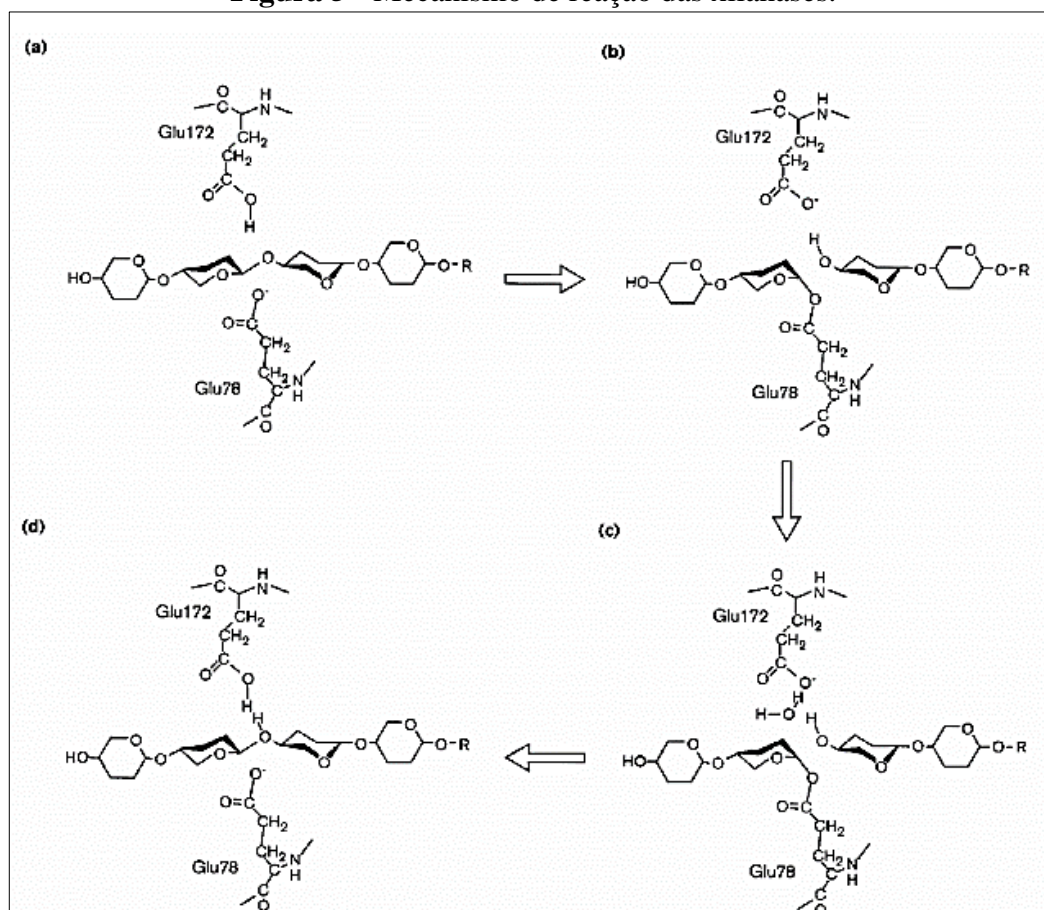
As glicosidases podem atuar, no geral, por dois mecanismos catalíticos diferentes: aquelas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas, com inversão da configuração do centro anomérico, e aquelas que catalisam a hidrólise com retenção da configuração do centro anomérico, como é o caso das xilanases (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; SEGATO et al., 2014). No mecanismo de retenção ocorre a formação de um intermediário (enzima-carboidrato) via duplo deslocamento (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; SEGATO et al., 2014; MOREIRA; FILHO, 2016).

Xilanases das famílias 10 e 11 compreendem enzimas com hidrólise estereoseletiva do xilano, através do mecanismo de duplo deslocamento, envolvendo um intermediário covalente glicosil - enzima, o qual é formado e hidrolisado, normalmente com auxílio catalítico ácido/base, envolvendo o aminoácido glutamato (Figura 5). Dois resíduos do ácido carboxílico do glutamato, convenientemente localizados no sítio ativo, estão envolvidos na formação do intermediário: o Glu 172 age como catalisador ácido-base, por protonação do oxigênio glicosídico do substrato, e o Glu 78 realiza ataque nucleofílico, o que resulta na quebra da

ligação glicosídica e formação do intermediário (inversão  $\beta$  para  $\alpha$ ). O primeiro grupo carboxilato agora funciona como base, aceitando um próton de uma molécula de água nucleofílica, o qual ataca o carbono anomérico; isto leva a uma segunda substituição, na qual o carbono anomérico novamente passa por um estado de transição, para originar um produto com configuração  $\beta$  (inversão  $\alpha$  para  $\beta$ ) (HENRISSAT, 1995; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013; SEGATO et al., 2014).

Muitas enzimas que degradam o xilano agem via mecanismo de duplo deslocamento e são geralmente descritas como endo-enzimas, ou seja, enzimas que clivam ligações glicosídicas internas em posições aleatórias ou específicas, e exo-enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas terminais e liberam resíduos de açúcar (SEGATO et al., 2014; MOREIRA; FILHO, 2016).

**Figura 5 - Mecanismo de reação das xilanases.**

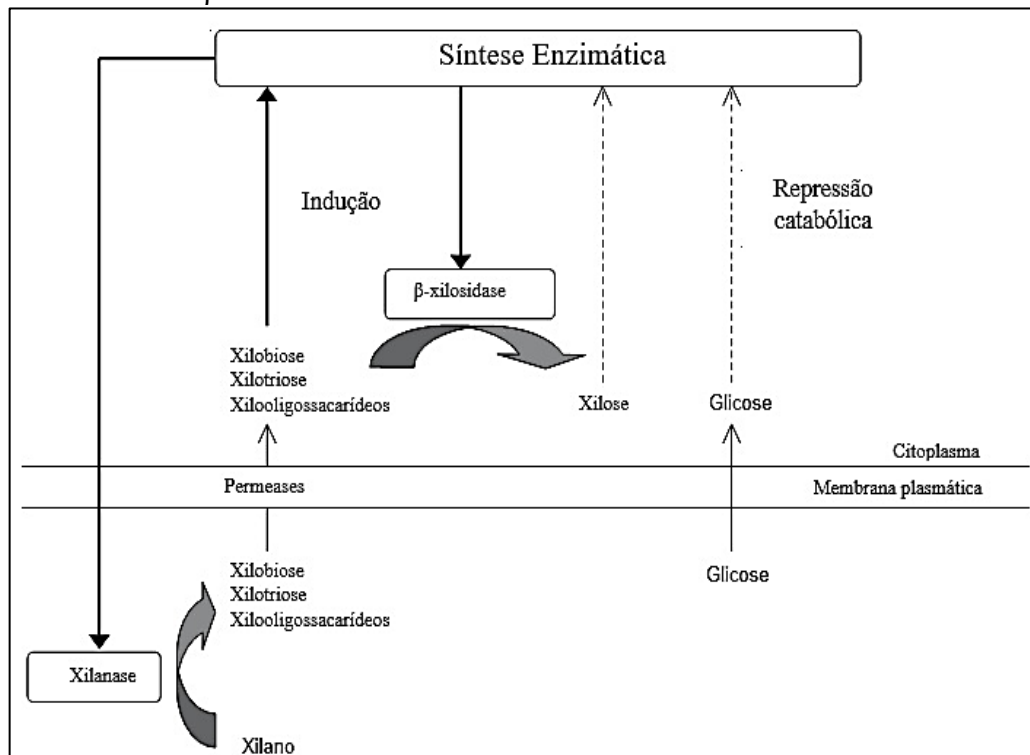


(a) estrutura em hélice do xilano é posicionada no sítio ativo da enzima entre o Glu172 (catalisador ácido-base) e o Glu78 (nucleófilo); (b) a xilobiose se liga no Glu78, sendo que este intermediário permanece no sítio ativo da enzima durante a reação de transglicosilação; (c) a água desloca o nucleofílico; (d) ocorre dissociação da xilobiose do sítio ativo, permitindo um movimento enzimático para uma nova posição do substrato. Fonte: JEFFRIES, 1996.

### 3.2.3 Regulação da produção de xilanases

Microrganismos sobrevivem selecionando a fonte de carbono mais favorável energeticamente a fim de suportar rápido crescimento e desenvolvimento para colonização de diversos habitats. A indução da produção de enzimas xilanolíticas por microrganismos depende das condições metabólicas da célula que são influenciadas por aspectos nutricionais e condições de cultivo como substrato, umidade, aeração, pH e temperatura, podendo resultar em maior ou menor expressão destas enzimas (BEG et al., 2001; RAVICHANDRA et al., 2016; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). No geral, a produção de xilanases é induzida quando os microrganismos são cultivados em substratos contendo hemicelulose, como xilano (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). Este mecanismo de indução inicia-se quando o microrganismo em contato com o substrato polimérico que, por ser muito grande, é incapaz de penetrar na célula microbiana, secreta no meio pequenas proporções de xilanases constitutivas. Estas enzimas constitutivas degradam a estrutura polimérica do xilano, liberando no meio pequenas moléculas como xilooligossacarídeos e xilobiose que uma vez absorvidas pela célula funcionam como indutores (Figura 6). Esses sinais provocam a ativação de genes da transcrição

**Figura 6** - Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico envolvendo endoxilanase e  $\beta$ -xilosidase.



Fonte: POLIZELI et al., 2005.

de xilanases extracelulares, como *xlnA*, *xlnD* e *XlnR* (HRMOVÁ, PETRÁKOVÁ; BIELY, 1991; POLIZELLI et al., 2005; JUTURU; WU, 2014; RIES et al., 2016), possibilitando a produção de xilanases em maior quantidade bem como melhor degradação do substrato polimérico. No entanto, a medida que a hidrólise vai ocorrendo, esses produtos se acumulam e podem atuar como repressores da produção da enzima, por repressão catabólica (COLABARDINI et al., 2012; KOBAKHIDZE et al., 2016).

A repressão catabólica pode ocorrer quando o microrganismo esta em contato com fontes de carbono facilmente assimiláveis pela célula, como a glicose, a fim de economizar energia e tempo para rápida colonização do meio, através da seleção da fonte de carbono mais simples (HRMOVÁ, PETRÁKOVÁ; BIELY, 1991; RUIJTER; VISSER 1997; COLABARDINI et al., 2012; KOBAKHIDZE et al., 2016). Em fungos filamentosos, como *Aspergillus*, por exemplo, a repressão é mediada a nível transcricional, pela proteína regulatória CreA. Esta proteína atua na repressão catabólica pela ligação específica às sequencias do promotor de muitos genes alvo, inibindo a transcrição (TAMAYO et al., 2008; RIES et al., 2016).

Um fator que também pode estar relacionado a produção de diferentes xilanases, bem como quantidades variadas das mesmas por um mesmo fungo, é a menor necessidade da enzima que exerce hidrólise de ligações não frequentes na fonte de carbono empregada no cultivo.

### 3.2.4 Multiplicidades de xilanases em microrganismos

A expressão de múltiplas xilanases pode ser observada em diversos microrganismos, sendo reportados de 3 a 30 xilanases em bactérias e fungos (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002). Em fungos, a multiplicidade é observada em diversos gêneros: Silva e colaboradores (2015) purificaram duas xilanases a partir do filtrado de cultura de *Trichoderma inhamatum*, Michelin et al. (2014) encontraram três xilanases em *Aspergillus ochraceus*; Seis xilanases foram purificadas do filtrado de *Jonesia denitrificans* BN-13 (BOUCHERBA et al., 2014) e de *Simplicillium obclavatum* (ROY et al., 2013) e 10 xilanases foram produzidas por *Myceliophthora* sp. (BADHAN et al., 2004). Em bactérias, a multiplicidade também ocorre em várias espécies; a análise de zimograma do filtrado de *Providencia* sp. mostrou a presença de sete xilanases quando cultivado em farelo de trigo (RAJ et al., 2013). Múltiplas xilanases são raramente encontradas em leveduras (WONG; TAN; SADDLER, 1988) e raras exceções são exibidas na literatura, como ADSUL e colaboradores (2009) que purificaram duas xilanases de

*Pseudozyma hubeiensis* NCIM 3574 totalmente distintas quanto ao modo de ação, o pH, a temperatura ótima, estruturas secundárias, e outros parâmetros cinéticos.

Muitos questionamentos já foram feitos a respeito da real funcionalidade da ocorrência de múltiplas xilanases em um único microrganismo bem como da sua origem. Wong (1988) apontou algumas funções para essa multiplicidade: a ocorrência de várias xilanases seria devido a necessidade de hidrólise de ligações específicas do substrato e inacessíveis por uma única xilanase; ou ainda, a multiplicidade seria uma adaptação de microrganismos saprofiticos, para a utilização de uma gama maior de substratos lignocelulósicos.

Os estudos de caracterização de múltiplas xilanases bem como dos produtos de hidrólise de diferentes substratos por estas enzimas permitiram a elucidação de alguns destes questionamentos. É consenso que, devido à natureza complexa e heterogênea do xilano, a acessibilidade das xilanases às ligações xilosídicas é dificultada, havendo a necessidade de múltiplas xilanases com funções especializadas e propriedades bioquímicas diversas, para hidrólise efetiva do heteropolímero (WONG; TAN; SADDLER, 1988; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; LIAO et al., 2015).

No geral, um único gene codifica várias xilanases e, na realidade, a multiplicidade pode surgir a partir das modificações pós-tradução, tais como glicosilação, auto-agregação e/ou digestão proteolítica reguladas por propriedades do cultivo como tipo de substrato, sua concentração e disponibilidade (JUTURU; WU, 2012; ROY et al., 2013; RAVICHANDRA et al., 2016). A glicosilação contribui com diversas funções da proteína, como estabilidade, multiplicidade e, em poucos casos, atividade enzimática (JUTURU; WU, 2014; SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015).

A multiplicidade de xilanases em microrganismos também pode ser causada pela redundância na expressão do gene ou processamento diferencial do mRNA, resultando em uma gama diversificada de xilanases, que diferem nas suas propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade pelo substrato (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; ADSUL; BASTAWDE; GOKHALE, 2009). Várias endo-xilanases também podem ser expressas por alelos diferentes de um mesmo gene ou por genes completamente diferentes. Se múltiplas xilanases dentro de cada categoria são produtos de genes distintos, também é possível que elas tenham funções relativamente similares ou tenham derivado de genes relacionados (WONG; TAN; SADDLER, 1988). Dentro dessa multiplicidade, em relação aos seus níveis de expressão, existem xilanases que são secretadas em quantidades maiores e aquelas que são produzidas em menores quantidades, sendo estas últimas de difícil caracterização, devido ao baixo rendimento na purificação. Xilanases presentes em menores quantidades podem ter

funções que não são necessárias em grandes quantidades, como a hidrólise das ligações que ocorrem com pouca frequência no substrato (WONG; TAN; SADDLER, 1988). Além disso, em muitos casos, observa-se que algumas espécies de microrganismos produzem múltiplas formas de xilanases, no geral, uma ácida e outra básica, com maior e menor peso molecular, respectivamente.

Silva e colaboradores (2015) purificaram duas xilanases do filtrado de *Trichoderma inhamatum* e concluíram que provavelmente seriam produtos diferenciados do mesmo gene devido a similaridade das propriedades hidrolíticas e físico-químicas e que a glicosilação pode explicar, em parte, as diferenças na massa molecular, na capacidade de aderir a DEAE e na estabilidade térmica. ROY e colaboradores (2013) observaram seis isoformas de xilanases com diferentes valores de pI e pH ótimo produzidas durante cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato e apenas uma xilanase sob fermentação submersa. RAJ e colaboradores (2013) encontraram sete xilanases produzidas por *Providencia* sp. cultivado em farelo de trigo e apenas duas xilanases de 33 kDa e 44 kDa quando cultivadas em xilano de *birchwood*. Por outro lado, enquanto a análise de zimograma mostrou que diferentes fontes de carbono causaram expressão diferencial de múltiplas isoformas de xilanase em *Scytalidium thermophilum*, as mesmas isoformas foram expressas por *Sporotrichum thermophile*, independentemente da fonte de carbono utilizada (JOSHI; KHARE, 2012).

Apesar de existirem muitos microrganismos que expressam uma diversidade de xilanases, poucos estudos se dedicaram a aprofundar sobre as propriedades ecofisiológicas e a origem desta multiplicidade (LIAO et al., 2015). Recentemente LIAO (2015) investigou a diversidade funcional e propriedades de oito xilanases produzidas por *Penicillium oxalicum* e verificou seis xilanases geneticamente diferentes pertencentes às famílias das glicosil hidrolases 10, 11 e 30 e duas xilanases com o mesmo genótipo e peso molecular diferente (LIAO et al., 2015). É interessante observar a ocorrência de xilanases com massa molecular mais elevada, intermediária e baixa, podendo indicar uma adaptação para melhor degradação do xilano, especialmente a necessidade de xilanases de menor peso molecular para melhor penetração no substrato.

Além disso, LIAO (2015) observou diferentes temperaturas e pH ótimos para as 4 xilanases caracterizadas, bem como mostrou que as enzimas possuíam diferentes especificidades por xilano, propriedades e parâmetros cinéticos, demonstrando que a produção de múltiplas xilanases pelo microrganismo em questão pode ser atribuída a redundância genética e modificações pós-traducionais, fornecendo informações sobre a multiplicidade de xilanases com alta complementaridade das atividades enzimáticas e especificidade para a

degradação eficiente da complexa estrutura do xilano (LIAO et al., 2015), confirmando o sugerido há quase 30 anos atrás por Wong e colaboradores (1988).

### 3.2.5 Recentes abordagens na aplicação de xilanases

Dentre as principais enzimas microbianas comerciais que tem contribuído para as soluções dos processos industriais estão amilase, lipase, protease, fitase, celulase e xilanase, sendo que esta última tem assumido lugar de destaque. Este fato pode ser comprovado pela existência, em 2005, de 468 patentes e pelo fato de ocupar 20% do mercado mundial de enzimas (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005; POLIZELI et al., 2005). A amplitude de aplicações (Tabela 2) bem como o sucesso dos resultados confere às xilanases posição de destaque econômico e grande exploração científica.

**Tabela 2** - Recentes pesquisas na aplicação de xilanases.

<b>Microrganismo</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>Potencial energético</i>		
<i>Aspergillus terreus</i>	Biorefinaria	KAMAT et al., 2012
<i>Aspergillus sp.</i>	Bioetanol	THOMAS et al., 2016
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Sacarificação	ZIMBARDI et al., 2013
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Sacarificação	ZHANG; SANG, 2015
<i>Bacillus licheniformis</i>	Sacarificação	ZAFAR et al., 2016
<i>Indústria de Papel</i>		
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Despigmentação de resíduo de papel	CHUTANI et al., 2016
<i>Aspergillus niger</i>	Despigmentação de jornal velho	DESAI; IYER, 2016
<i>Penicillium meleagrinum var. viridiflavum</i>	Branqueamento de polpa de bambu	BORUAH et al., 2016
<i>Indústria de Alimentos</i>		
<i>Aspergillus niger</i>	Clarificação de sucos e melhora do rendimento	PAL; KHANUM, 2011
<i>Bacillus pumilus</i>		NAGAR; MITTAL; GUPTA, 2012
<i>Aspergillus terreus</i>	Produção de xilooligossacarídeos	AHMED et al., 2016
<i>Streptomyces halstedii</i>		ARAGON et al., 2013
<i>Trichoderma</i>		CHEN; WANG, 2016
<i>Fusarium verticilloide,</i> <i>Aspergillus Clavatas</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Melhoramento da absorção de nutrientes da ração	NDOU et al., 2015

Fonte: autor

As aplicações mais estudadas das xilanases são na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica derivada de resíduos ou subprodutos agroindustriais, especialmente cana-de-açúcar para produção de etanol (ZIMBARDI et al., 2013; GARG, 2016; KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016; THOMAS; PARAMESWATAN; PANDEY, 2016; WOOD, 2016), no branqueamento de polpa de papel Kraft, a fim de minimizar a utilização de produtos químicos (MURTHY; NAIDU, 2012; BUZALA et al., 2016; KAUR; BHARDWAJ; SHARMA et al., 2016), na alimentação animal (SWIATKIEWICZ et al., 2016) e como aditivos na indústria de alimentos com vistas a melhoria das propriedades tecnológicas e organolépticas de alguns produtos (KUMAR et al., 2014; ELGHARBI et al., 2015).

A hidrólise da biomassa lignocelulósica à açúcares redutores bem como fermentação destes açúcares à bioetanol, certamente é o principal foco das pesquisas com aplicação de enzimas lignocelulolíticas na atualidade. O conteúdo de lignina e hemicelulose da biomassa afeta a hidrólise da celulose, e produção do etanol, pois dificulta o acesso de celulasas e consequentemente reduz a eficácia da hidrólise. Processos de pré-tratamento com ligninases e hemicelulasas auxiliam nesta problemática e melhoram o rendimento da hidrólise (McMILLAN, 1994). Nesse contexto, as xilanases apresentam bom potencial para pré-tratamento da biomassa visando posterior produção de etanol (SUN et al., 2002; AMORE et al., 2015; GASPAROTTO et al., 2015).

A atuação da xilanase adicionada no processo de branqueamento da polpa de papel ocorre pela quebra da cadeia de xilano e das ligações entre a lignina e a celulose da polpa de papel, promovendo ou facilitando a remoção da lignina nos estágios químicos de branqueamento subsequentes e reduzindo a percentagem de dióxido de cloro necessário para este mesmo fim. Dessa forma, este segmento industrial evita o tratamento com dióxido de cloro utilizado no branqueamento e a formação de compostos organoclorados, que em muitos países são liberados como efluentes em corpos d'água, criando uma série de problemas ambientais (SHARMA et al., 2014; BUZALA et al., 2016).

Xilanases também são utilizadas na ração animal, como aditivo alimentar para promover redução da viscosidade dos derivados de xilano que compõe a ração e consequente melhoria na absorção intestinal dos nutrientes pela microflora intestinal do animal, como redução de *E. coli* e aumento do nível de bactérias do ácido láctico no íleo (BELOVA et al., 2014; CHEN; LI; WANG, 2016).

Alguns parâmetros da qualidade de bebidas também podem ser melhorados pela adição de xilanases. Na clarificação de sucos de frutas, estas enzimas auxiliam na estabilização da polpa e nos parâmetros de viscosidade (NAGAR; MITTAL; GUPTA, 2012; KUMAR et al.,

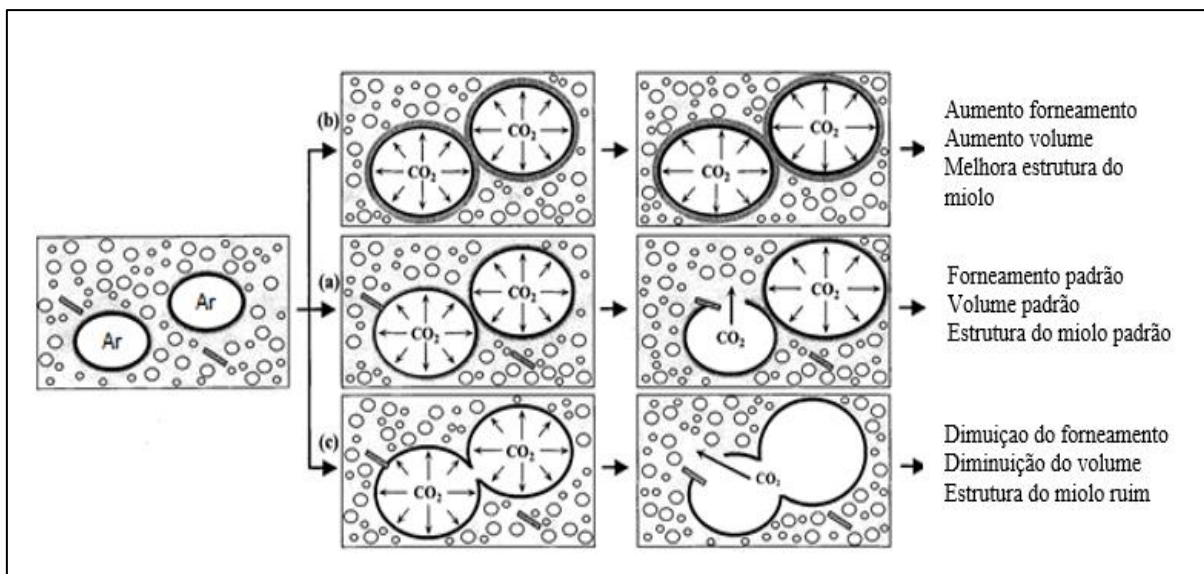
2014). Também podem atuar na diminuição da viscosidade da cerveja e melhoramento de seu aspecto, devido a hidrólise de arabinosilanos à oligossacarídeos (DERVILLY et al., 2002). Também são utilizadas na produção de probióticos (DAMEN et al., 2012; REDDY; KRISHAN, 2016) e na indústria da panificação a fim de melhorar as características reológicas da massa, aumento do volume e maciez do miolo do pão (AHMAD et al., 2012; McPHILLIPS et al., 2014; ELGHARBI et al., 2015; CARVALHO et al., 2017).

### *3.2.6 Aplicação de xilanases na produção de pão*

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria (ABIP), o setor de Panificação no Brasil está entre os maiores segmentos industriais do país com uma participação de 36,2% na indústria de produtos alimentares (ABIP, 2009). Devido a esta significância e também a demanda pelo melhoramento tecnológico de produtos de panificação frente aos apelos do consumidor por produtos com maior vida de prateleira, melhor aparência e textura e menor uso de químicos como bromato, a adição de enzimas, em especial, xilanases a este produto se faz necessária no atendimento a esses apelos bem como eficaz em sua resolução (BUTT et al., 2008). Existem diversas xilanases comerciais utilizadas na produção de pão que contribuem no melhoramento dos aspectos reológicos da massa, aumento do volume específico, redução da firmeza do miolo (HARRIS; RAMALINGAM, 2010) e no aumento da vida de prateleira.

Um dos aspectos mais importantes da panificação é o resultado de um balanceamento positivo entre produção de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e a sua perda para a atmosfera. O glúten é capaz de formar uma ampla rede visco-elástica ao longo da massa que retarda a taxa de difusão do  $\text{CO}_2$  para fora dela. Ele sustenta o filme líquido que cerca as bolhas de  $\text{CO}_2$  na massa que esta crescendo, e é capaz de expandir sem ruptura, quando a pressão dentro das bolhas de gás aumenta. Quando há ruptura, ocorre coalescência e a retenção de gás é diminuída. Dessa forma, é evidente que as características da farinha em geral, e a qualidade do glúten em particular, influenciam na qualidade da massa e conseqüentemente na qualidade do pão. O desenvolvimento do glúten inicia-se no processo da mistura, quando as proteínas são umedecidas e interagem, formando a rede do gluten. Dessa forma, o emprego de aditivos como as endoxilanases exercem influência nos parâmetros da massa ou da pasta como elasticidade, extensibilidade, viscosidade, tendência a retrogradação, entre outros, que podem culminar na produção de pães com maior volume, maciez e menor tendência ao envelhecimento (COURTIN; DELCOURT, 2002).

**Figura 7** - Funcionalidades de endoxilanase na produção de pão



(a) controle, sem adição da enzima. (b) quando é adicionada endoxilanase com seletividade para WU-AX. (c) quando endoxilanase com seletividade para WE-AX é adicionada.

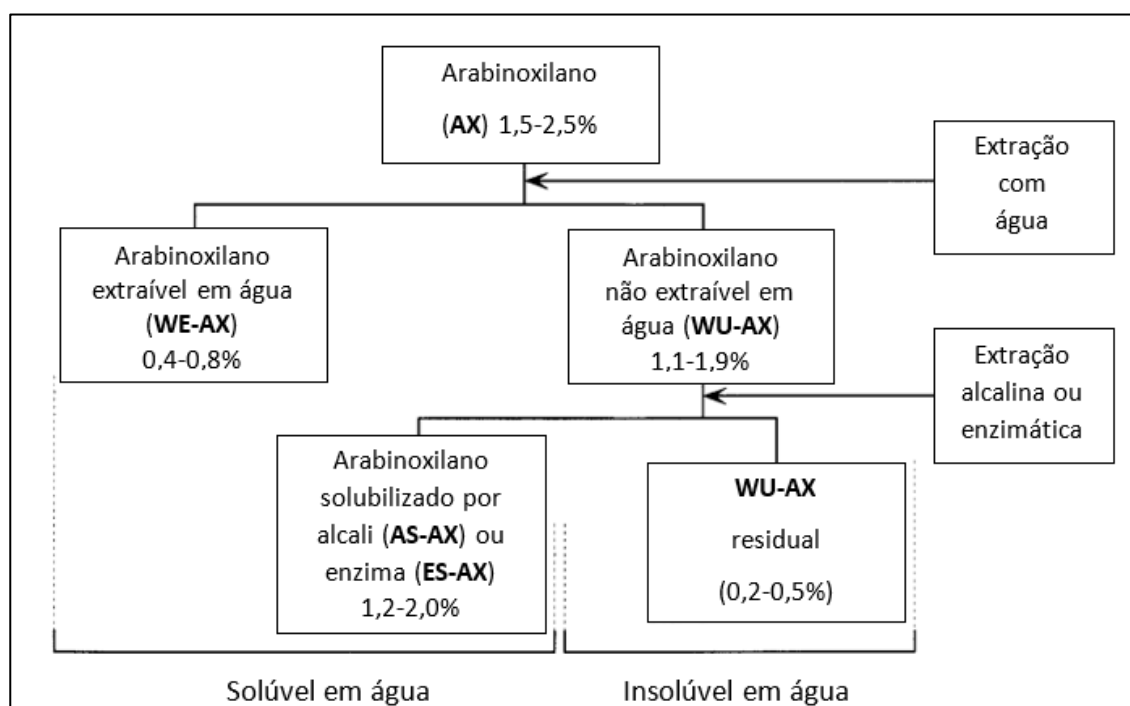
Fonte: COURTIN; DELCOURT, 2002.

A farinha de trigo utilizada para a produção de pães é composta principalmente por proteínas (12%), amido (60%), lipídeos (2%), minerais (2%) e carboidratos não amiláceos (10%) (GOESAERT et al., 2005). Os grânulos de amido são estruturas semicristalinas formadas pelo arranjo da amilose e amilopectina. Nas temperaturas entre 54 °C e 63 °C, os grânulos de amido tem sua estrutura rompida como consequência da gelatinização e a amilose é lixiviada. Esse processo exerce grande influência no envelhecimento do pão, pois após o forneamento, algumas moléculas de amido agregam-se novamente e retornam a forma cristalina, resultando no endurecimento do miolo (SLUIMER et al., 2005).

Com relação aos carboidratos não amiláceos que compõe a farinha de trigo, esta fração é constituída por celulose, lignina e hemicelulose. A porção hemicelulósica é composta principalmente por arabinosilanos que se originam das paredes celulares do endosperma e farelo do trigo e estão presentes na forma solúvel em água, conhecida como *water extrable arabinosilanol* (WE-AX) ou na forma insolúvel *water unextrable arabinosilanol* (WU-AX) (COURTIN; DELCOURT, 2002). A porcentagem tanto dos componentes da farinha de modo geral como da fração solúvel e insolúvel dos arabinosilanos varia dependendo do cultivar do trigo e da região. Na Europa, por exemplo, as farinhas são mais fracas do que na América, pois apresentam maior conteúdo de WU-AX do que WE-AX, dando origem a massas mais viscosas

e elásticas e que conseqüentemente podem apresentar melhores resultados na panificação quando adicionadas de xilanases (COURTIN; DELCOUR, 2002).

**Figura 8** - Classificação do arabinoxilano da farinha de trigo de acordo com a solubilidade em água.



Indicativo % refere-se a porcentagem sobre o peso da farinha  
 Fonte: Adaptado de COURTIN e DELCOUR, 2002.

O sucesso da atuação destas enzimas no melhoramento dos aspectos tecnológicos da fabricação do pão se deve, além de outros aspectos de estabilidade da enzima, ao fato das xilanases atuarem como pentosanases, um grupo de enzimas que decompõem os componentes da matriz da parede celular vegetal, como os arabinoxilanos WE-AX e WU-AX do trigo que compõe a farinha. Alguns estudos reportam uma correlação negativa entre as características gerais da massa e a porcentagem de WU-AX no total de AX na massa. As xilanases auxiliam nessa problemática, pois propiciam a solubilização do WU-AX com conseqüente redistribuição da água ligada para outros componentes da farinha como o glúten, aumentando sua extensibilidade (COURTIN; DELCOUR, 2002; McPHILLIPS et al., 2014).

Estas enzimas atuam na clivagem da cadeia de WU-AX, diminuindo seu grau de polimerização e com isso permitem que este componente da parede celular, antes insolúvel, absorva água, transformando-se em fragmentos de arabinoxilano solubilizado pela enzima ou

*enzyme solubilized arabinoxylan* (ES-AX), aumentando a viscosidade da fase aquosa da massa do pão (GRUPPEN; KORMELINK; VORAGEN, 1993; ROUAU; EL-HAYEK; MOREAU, 1994), bem como a estabilidade da massa. A medida que estes fragmentos também são degradados e que o WU-AX vai perdendo a capacidade de retenção de água, ocorre novamente diminuição da viscosidade e enfraquecimento da massa. Os WE-AX nativos também são hidrolisados, levando à redução da sua massa molecular e também diminuição da viscosidade (ROUAU, EL-HAYEK, MOREAU, 1994). A extensiva hidrólise dos arabinoxilanos (AX), proporciona a redistribuição da água do AX para o glúten e para a fase de amido. Isso deixa a massa do pão mais macia e fácil de bater, bem como atrasa a formação do miolo, permitindo o crescimento da massa e aumento de volume (ROUAU, EL-HAYEK, MOREAU, 1994; CAMACHO; AGUILAR, 2003; BUTT et al., 2008). Além disso, os produtos liberados na massa como arabinoxilooligosacarídeos (AXOS) podem ter efeitos benéficos à saúde (POLIZELI et al., 2005).

O sucesso ou não da aplicação de xilanases no melhoramento das propriedades que determinam a qualidade dos produtos de panificação como volume, textura e firmeza do miolo pode depender, além das características bioquímicas da enzima, do conteúdo de pentosanas da farinha. Sabe-se que o conteúdo de pentosanas totais, WE-AX e WU-AX, em trigo depende do genótipo do vegetal e do ambiente (LEMPEREUR, ROUAU, ABECASSIS, 1997; LI, MORRIS, BETTGE, 2009). Apesar da farinha de trigo refinada possuir baixo teor de pentosanas, estas são determinantes para as propriedades de panificação a absorção de água e formação de glúten (COURTIN; DELCOURT, 2002; WANG et al., 2002; WANG, VAN VLIET, HAMER, 2005). Por outro lado, a habilidade que diferentes tipos de xilanases ou xilanases produzidas por diferentes microrganismos, podem apresentar na especificidade e capacidade de solubilizar WU-AX e degradar WE-AX também é determinante. Por exemplo, xilanases de *Bacillus subtilis* clivam preferencialmente a cadeia principal do arabinoxilano em regiões sem substituições, enquanto xilanases de *Aspergillus niger* podem agir em regiões de ramificações, produzindo unidades menores do que xilanases de *B. subtilis* (BIELY et al., 1997).

Se a endoxilanase possuir especificidade por WU-AX, ela contribuirá para a estabilidade da massa pela hidrólise do WU-AX à ES-AX, que possui elevada massa molecular (Figura 7b). Além disso, se esta enzima possuir tal especificidade a ponto de deixar WE-AX e ES-AX ilesos, efeitos benéficos sobre o volume do pão poderão ser observados (COURTIN; GELDERS; DELCOURT, 2001). Porém, se a degradação do WU-AX for excessiva ocorre diminuição da capacidade de retenção de água da massa, efeito que, a uma baixa concentração

de enzima, é resultado da maior viscosidade proporcionada pelo ES-AX, e altas doses de enzima forma massas frouxas e pegajosas após a mistura, sendo um parâmetro limitante da qualidade dos pães (McPHILLIPS, 2014).

Quando endoxilanasas com seletividade para WE-AX e ES-AX são utilizadas na panificação, a solubilização do WU-AX é precedida pela intensa degradação do WE-AX nativo e do ES-AX à moléculas de menor peso molecular, que podem ocasionar efeitos negativos no volume do pão quando em baixa concentração de enzima (Figura 7c). Isso é superado com altas doses da enzima devido a degradação mínima do WU-AX, porém tem pouco efeito e não forma massas tão boas, quando comparado a endoxilanasas com seletividade à WU-AX. Assim, endoxilanasas ótimas para panificação são aquelas que liberam seletivamente ES-AX do WU-AX, numa taxa de hidrólise mínima, e que tem pouca ou nenhuma afinidade por WE-AX e ES-AX, bem como são resistentes a inibidores dessas xilanases (COURTIN, GELDERS, DELCOUR, 2001). Além disso, a dosagem da enzima também pode influenciar nos aspectos da qualidade da massa e do pão. Quando alta dose de xilanase é adicionada para a produção do pão, pode ocorrer excessiva liberação de água e a massa formada pode se tornar frouxa e pegajosa. Isto está relacionado a uma significativa solubilização do WU-AX, e degradação do ES-AX e WE-AX. Tal efeito também pode ser neutralizado pela diminuição do conteúdo de água da massa (ROUAU, EL-HAYEK, MOREAU, 1994; COURTIN, GELDERS, DELCOUR, 2001).

Diversos estudos mostram os efeitos da adição de xilanases na fabricação do pão (Tab. 3), melhorias nas características reológicas da massa, aumento do volume e maciez do miolo do pão puderam ser observadas. Para o sucesso da adição da enzima na promoção das qualidades da massa e do pão, é necessário, além dos aspectos de especificidade e dosagem já discutidos, que a enzima também seja estável a altas temperaturas. Uma das vantagens do uso de xilanase termoestável consiste em sua ação continuada, mesmo após a temperatura de gelatinização do amido.

Tabela 3: Influência da adição de xilanase nos parâmetros de qualidade do pão

Micro-organismo	Dosagem de xilanase	Parâmetros de qualidade do pão			Referência
		Aumento do volume específico (%)	Redução da firmeza do miolo (%)	Efeito anti staling (%)	
<i>Aspergillus foetidus</i>	12 U/g farinha	56	77	ni	SHAH et al., 2006
<i>Aspergillus niger</i>	600 IU / Kg farinha	18	ni	ni	AHMAD et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i>	0,75 U / g farinha	22,4	ni	ni	ELGHARBI et al., 2015
<i>Remersonia Thermophila</i>	0,297 XU / g farinha	8	19,6	20,4% (4 dia)	McPHILLIPS et al., 2014
<i>Thermotoga maritima</i> (160U/mL)	120 ppm (mg / Kg farinha) 100 ppm	60,3 ~50	~47 58	ni 36,5% (6 dia)	JIANG et al., 2005
<i>Thermotoga maritima</i>	100 ppm (mg / kg farinha)	32,5	40	Observado	JIANG et al., 2008
<i>Thermococcus aurantiacus</i> cocktail	35 U / 100 g farinha	22	~20	25% (10 dia)	OLIVEIRA et al., 2014
<i>Chaetomium</i>	2,5-5,0 ppm (mg / kg farinha)	20-24,5	8,9-24,2	ni	JIANG et al., 2010
BsXyn <i>B. subtilis</i>	3720 U / Kg	11,9			
AnXyn <i>A. niger</i>	2040 U / Kg	11			DAMEN et al., 2012
HjXynA <i>H. Jecorina termofilic</i>	6800 U / Kg	13,6			
HjXynC <i>H. Jecorina termofilic</i>	4250 U / kg	7,4			
<i>Pseudalteromonas haloplanktis</i> Puratos Group NV	0,01-0,5 ppm	28			
<i>Flavobacterium</i> sp rXFH AA Y98787 (genbank)	0,03-1,0 ppm	18			
<i>unknown bacterial origin</i> (rXyn8) ABB7189	0,03-0,4 ppm	18		ni	
<i>B. subtilis</i> Grindamy! H640 Danisco A/S (Copenhagen, Denmark)	0,5-2,5 ppm	23			DORNEZ et al., 2011
<i>Aspergillus aculeatus</i> purificada de <i>Shearzyme</i>	0,25-6,0 ppm	12			
<i>Aureobasidium Pullulans</i> BAB69655 (genbank)	5,2 ppm	~25			
XBS: purificada de Grindamy! H640, P18429	2,5 ppm	~23			VERJANS et al., 2010
<i>B. subtilis</i> Puratos NV (Groot-Bijgaarden)	~1 nKat / g de farinha	~20 (farinha A) ~25 (farinha B)	~26 (24 h) ~51	~16 (72 h) ~37,5 (72 h)	
<i>A. aculeatus</i> Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark)	~6 nKat / g de farinha	~6 (farinha A) ~18 (farinha B)	~20 (24 h) 27 (24 h)	~21 (72 h) 21 (72 h)	COURTIN et al., 2001
Pentopan Mono BG Novozymes	6 mg / 100 g farinha	12	30	~32 (12° dia)	CABALLERO et al., 2007
Pentomax 2000 U.g <sup>-1</sup> (Prozyn)	4 g /100 kg farinha branca 8 g /100 kg farinha integral	17	~28	ni	JAEKEL et al., 2012
		21	~26		

ni: não informado

### 3.3 Planejamento Experimental como ferramenta na otimização da produção de xilanases

Para que exista possibilidade de aplicação de enzimas microbianas em processos industriais, um bom rendimento deve ser obtido. Diversos fatores relacionados às condições de cultivo influenciam o rendimento da produção enzimática como pH, salinidade, fontes de carbono e nitrogênio, agitação entre outros. O procedimento experimental em que se realiza variações em um desses parâmetros de cultivo, fixando-se as demais variáveis envolvidas no processo é denominado *one-at-a-time*, ou seja, envolve o estudo de uma variável por vez. Embora tenha sido muito utilizado para otimização da produção de enzimas com a finalidade de caracterização de enzimas microbianas, há alguns anos este método tem sido substituído por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos baseados em testes estatísticos e matemáticos que possibilitam a avaliação das interações e dos efeitos sinérgicos entre as variáveis estudadas. Trata-se da metodologia de planejamento fatorial e superfície de resposta, com o para planejamento composto central rotacional (DCCR), uma técnica introduzida na década de 50 para a modelagem de diversos processos industriais, que permite o estudo das interações das variáveis dependentes com diversos fatores ou variáveis independentes. Assim, é possível determinar a influência das variáveis sobre as respostas, quantificar os efeitos e até prever, por inferência estatística e validação experimental, os parâmetros que se encontram na faixa de maior rendimento enzimático (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Em termos práticos, a execução do DCCR pode partir de variáveis sobre as quais o pesquisador tenha alguma informação experimental ou bibliográfica acerca do seu efeito na resposta desejada ou mesmo nenhuma informação. Independente de qual for o caso, o DCCR utiliza pelo menos dois níveis (valores) para cada um dos fatores. Primeiramente é realizada a montagem da matriz de experimentos que, em um DCCR  $2^2$  com dois fatores, por exemplo pH e temperatura, pode possuir 4 níveis, sendo os valores codificados: -1,41, -1, +1, +1,41 e um ponto central, para o qual se realizam repetições (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Em um fatorial completo,  $\alpha$  representa a distância do ponto central ao ponto axial e é calculado de acordo com a Eq. 1, na qual k representa o número de fatores estudados, por exemplo pH e temperatura, então  $\alpha=1,41$ . Para calcular os valores reais para cada fator, segue-se como mostra a Eq. 2, substituindo-se os valores (RODRIGUES; IEMMA, 2005). A montagem das matrizes fatoriais, bem como os tratamentos estatísticos e preditivos, geralmente são realizadas em softwares específicos como STATISTICA e MINITAB. A partir disso, um modelo é gerado (Eq. 3) e pode ser testado quanto à sua eficácia e predição da resposta, no qual

Y é a variável resposta (atividade de xilanase);  $x_1$  e  $x_2$  representam as variáveis independentes em valores codificados.  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{12}$  são constantes e coeficientes de regressão do modelo.

$$\alpha = [2^{k/4}] \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\frac{\Delta \text{valor codificado}}{\Delta \text{valor real}} = \frac{\Delta \text{valor codificado}}{\Delta \text{valor real}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_1 x_1^2 + \beta_2 x_2^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Assim, metodologias de DCCR e superfície de resposta são muito eficientes não apenas na determinação das condições ótimas de cultivo para obtenção de melhor rendimento de enzimas microbianas, mas também na caracterização destas enzimas, para verificação da possibilidade de aplicação em diversos processos industriais, principalmente no que se refere a parâmetros de pH e temperatura, visto que nesses processos existe uma interação entre os níveis de tais parâmetros o que, na metodologia de “um fator por vez” isso poderia não ser identificado, e a ação deles sob a atividade da enzima poderia estar longe do seu nível ótimo ou de melhor estabilidade (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

### 3.4 Fungos produtores de xilanases, condições de cultivo e propriedades destas enzimas

Os microrganismos possuem um aparato enzimático complexo e diversificado que possibilita a reciclagem do carbono na natureza a partir da degradação de materiais lignocelulósicos, corroborando com a manutenção dos ciclos biogeoquímicos e ecossistemas. Entre estas fontes microbianas, os fungos filamentosos sejam os fitopatogênicos, micorrízicos ou saprofíticos são especialmente interessantes por produzirem níveis de xilanase mais elevados do que bactérias e leveduras e serem capazes de secretar as enzimas produzidas para o meio extracelular, o que facilita sua extração para fins biotecnológicos (KÜES, 2015; MIYAUCHI, et al., 2016).

A degradação da hemicelulose ocorre essencialmente de forma extracelular, uma vez que os componentes deste material como, por exemplo, o xilano devem primeiramente ser hidrolisados até compostos menores, como xilose, xilobiase e xilooligossacarídeos,

possibilitando o transporte pela membrana celular fúngica e o metabolismo intracelular (BEG et al., 2001, SHALLOM; SHOHAM, 2003; SINDHU, BINOD; PANDEY, 2016).

Estudos de caracterização de xilanases mostram que suas propriedades físico-químicas podem diferir substancialmente. No geral, xilanases de origem fúngica apresentam massa molecular variável, entre 8 e 145 kDa, pH ótimo em torno de 4,5 a 7 e estabilidade em pH entre 3 e 10 e temperatura ótima entre 45 e 60 °C (SHARMA; KUMAR, 2013; SHAHI et al., 2016). No entanto, tanto a linhagem fúngica como o procedimento de cultivo utilizados para produção de enzimas podem influenciar os níveis e o perfil bioquímico das proteínas produzidas. Diversos fatores de cultivo como tipo de substrato, pH, temperatura, umidade, entre outros influenciam na expressão e produção de xilanases.

A biosíntese de xilanase pode ser induzida pelo tipo de substrato, especialmente aqueles que possuem elevado conteúdo de xilano, como sabugo de milho e farelo de trigo. Coelho (2003) verificou que a maior produção de xilanases de *Aspergillus giganteus* ocorreu em substratos como xilano, xilose, bagaço de cana de açúcar e sabugo de milho, respectivamente. Mukherjee e colaboradores (2015) testaram diferentes fontes de carbono para produção de xilanase e encontraram maiores quantidades da enzima quando foi cultivado em farelo de trigo, pó de semente de tamarindo e sabugo de milho.

Dentre os tipos de cultivos mais conhecidos estão a fermentação em estado sólido (FES), onde o cultivo é realizado em substrato sólido e com umidade controlada, e a fermentação submersa (FSm) que é realizada na presença de água (IRFAN et al., 2016). Ambos processos apresentam vantagens e desvantagem do ponto de vista de produção em larga escala e rendimento. A FES é considerada como sendo mais econômica e de maior rendimento do que a fermentação submersa, que, por sua vez, possibilita maior facilidade na recuperação de enzimas extracelulares e também no controle de variáveis do processo como pH e temperatura. (TERRASAN; CARMONA, 2015; MANSOUR et al., 2016).

A umidade do cultivo influencia na produção de xilanases inclusive por uma mesma linhagem de fungo ou até pelo mesmo microrganismo. Um estudo fez uma análise do secretoma de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* e comparou as proteínas secretadas quando cultivados em fermentação sólida e sequencial. A análise dos resultados, especialmente para *Aspergillus niger*, permitiu observar que, em alguns casos, para o mesmo microrganismo diferentes genes para xilanase são expressos quando se considera os dois tipos de fermentação analisados e que muitas xilanases são expressas somente em fermentação submersa e outras apenas em fermentação sequencial (FLORENCIO et al., 2016).

Com relação ao efeito do pH na produção de xilanases, Carmona (2005) verificou que em diferentes faixas de, pH 5.8 e 6.5, as duas xilanases expressas, xilanase 1 e 2, eram produzidas em quantidades diferentes. Em pH 5,8, xilanase II é produzida em menor quantidade do que em pH 6,5, o contrário do observado para xilanase I (CARMONA et al., 2005). Maior produção de xilanase também foi observada em pH 6,5 para *Penicillium janczewskii* (TERRASAN et al., 2013). XIONG e colaboradores (2004) também observou a dependência do perfil das xilanases purificadas pelo pH de cultivo, sendo que em pH de cultivo baixo, pH 4, o fungo produziu um tipo de xilanase, xilanase I mais ativa em pH baixo (4-4,5), e em pH de cultivo mais elevado, pH 6,0, outra xilanase foi secretada, xilanase III, ativa em pH mais elevado (6-6,5) bem como massa molecular (XIONG et al., 2004).

A temperatura também influencia na produção e até perfil de expressão de xilanases. Um estudo realizado com uma espécie de *Aspergillus niger* verificou que uma temperatura de incubação mais elevada favoreceu o crescimento da biomassa e temperatura mais baixa favoreceu a biossíntese de xilanase, obtendo-se maior rendimento (YUAN et al., 2005). Além disso, na maioria dos casos observa-se que fungos capazes de crescer em temperatura mais altas, produzem enzimas mais termoestáveis (LASA; BERENQUER, 1993; RIZZATI et al., 2004). Rizzati e colaboradores (2004) observaram que à temperatura de cultivo de 42°C, xilanases de *Aspergillus phoenicis* exibiram aumento na termoestabilidade de 50 para 55°C quando comparada com a enzima produzida a 25°C e também um aumento na atividade específica em até 5 vezes quando produzida a maior temperatura, sugerindo que diferentes temperaturas de cultivo, induziram a produção de xilanases distintas.

Considerando o acima exposto, a bioprospecção de fungos em ambientes extremófilos é estimulada pela possibilidade de encontrar microrganismos que, adaptados a tais ambientes, produzam enzimas mais estáveis em condições extremas de pH, temperatura, salinidade, entre outros, que é a realidade de muitos processos industriais nos quais estas enzimas são empregadas (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; WANG; CEN; ZHAO, 2015; ZHOU et al., 2016). A estabilidade em altas temperaturas é muito interessante do ponto de vista industrial (SHARMA; KUMAR, 2013; KUMAR; MARÍN-NAVARRO; SHUKLA, 2016), fungos termofílicos podem ser bons produtores de xilanases termoestável e tem ganhado destaque na literatura científica nos últimos anos (SINGH; KAPOOR; KUMAR, 2012; TAIBI et al., 2012). Uma variedade de xilanases tolerantes as altas temperaturas têm sido encontradas em diversos fungos, incluindo *Aspergillus* (HE et al., 2015; MATSUZAWA; KANEKO; YAOI, 2016). A natureza termofílica ou termoestável das xilanases pode ser explicada por uma série de fatores que estabilizam a estrutura da molécula, como a existência de pontes dissulfeto,

anéis aromáticos, glicosilação (FONSECA-MALDONADO et al., 2013; ZHOU et al., 2016), núcleo hidrofóbico bem embalado, interações favoráveis de cadeias laterais carregadas com dipolos hélice e a presença de prolinas no N-terminal de hélices que diminuiu a liberdade conformacional da molécula de proteína (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; WANG; CEN; ZHAO, 2015).

Atualmente diversos estudos tem investigado a sequência e estrutura de xilanases termoestáveis para melhor entendimento do seu aspecto funcional bem como trabalhado estes achados na engenharia de proteínas para melhorar as propriedades de enzimas mesofílicas (SONG; TSANG; SYLVESTRE, 2015; IRFAN et al., 2016), como realizado por Zhou e colaboradores (2016) que introduziram por mutagênese dirigida pontes dissulfeto no domínio N-terminal de xilanase de *Aspergillus niger* e obtiveram melhoria considerável na termoestabilidade em comparação com a enzima nativa.

### **3.5 Microrganismo de estudo: *Aspergillus hortae*, primeiro relato da espécie como produtora de xilanases**

O gênero *Aspergillus* é conhecido como bom produtor de xilanases. Um estudo testou 21 espécies de fungos e observou que os mais elevados níveis destas enzimas foram produzidos por *Aspergillus terreus* em meio contendo resíduos agroindustriais como fonte de carbono (DE SIQUEIRA; FERREIRA; XIMENES, 2010).

*Aspergillus* são fungos filamentosos imperfeitos pertencentes à classe dos Deuteromicetos ou dos Ascomicetos quando se trata de formas perfeitas (sexuais). Cerca de 200 espécies de *Aspergillus* são conhecidos, dos quais vinte estão envolvidos em patologias humanas, como *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, entre outros. Algumas espécies do gênero produzem muitas micotoxinas e podem estar envolvidas em doenças conhecidas como aspergiloses. Outras espécies, porém, são amplamente utilizadas para produção de enzimas de interesse industrial utilizadas na indústria de alimentos e bebidas, de detergentes, polpa e papel e biorefinarias. As colônias deste gênero crescem rapidamente, apresentam aspecto de pó ou felpudo e geralmente exibem cores brilhantes. O talo hialino tem um micélio compartimentado, tendo vários conidióforos eretos com uma extremidade vesicular chamado de "cabeça do *Aspergillus*", capaz de produzir até 104 esporos. Os conídios

globulares, geralmente 2 a 3, são produzidos a partir das fiálides que estão agrupadas no topo ou ao redor das vesículas, com ou sem metula intermediária.

*Aspergillus hortae* foi descrito pela primeira vez em 1922 por Langeron a partir de amostras de orelha humana, no Rio de Janeiro. Em 1935, Dodge notou semelhança do fungo de Langeron com *Aspergillus* e em 1965 Raper e Fennell consideraram como sinônimo de *Aspergillus terreus*, porém análises filogenéticas multilocus mostraram que *A. hortae* deve ser considerado uma espécie distinta de *A. terreus* (SAMSON et al., 2011). As duas espécies apresentam uma semelhança morfológica forte como cabeças conidiais colunares e de tonalidade castanho a marrom (Figura 9), bem como perfil distinto de metabólitos secundários. Ambos são fungos cosmopolitas, frequentemente isolados de regiões tropicais e subtropicais, de solos de florestas, desertos, planícies, pilhas de compostagem sendo que *A. hortae* também é isolado de contaminantes de produtos como milho, cevada e amendoim (SAMSON et al., 2011).

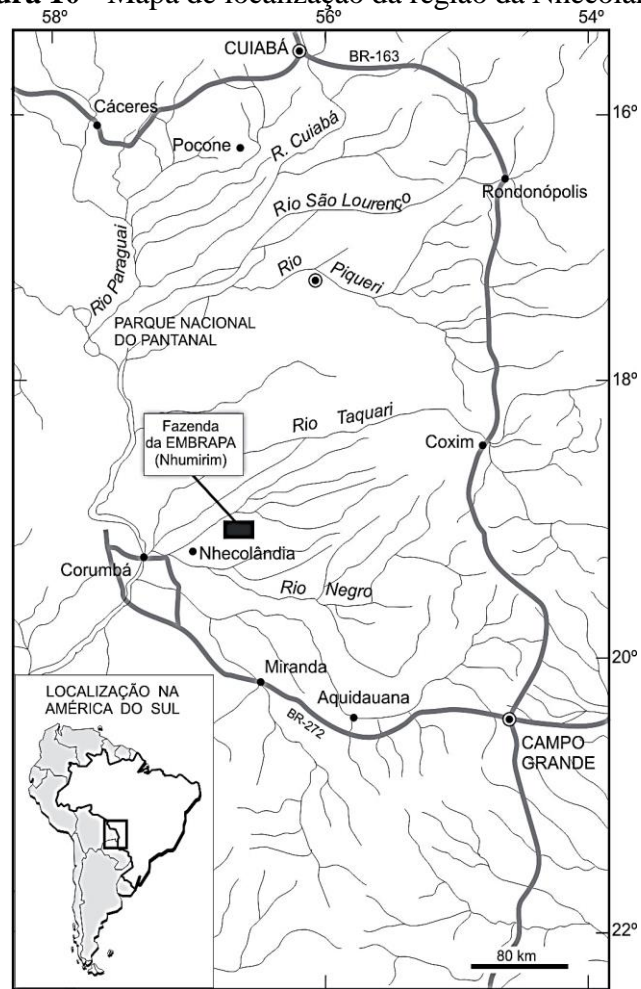
**Figura 9** - *Aspergillus hortae*. Da esquerda para a direita: Colônias incubadas a 25 °C por 7 dias em meio CYA, conidióforos, conídios (Adaptado de SAMSON et al., 2011) e conidióforos e conídios do microrganismo de estudo



Fonte: Adaptado de SAMSON et al., 2011

Existem poucos estudos com *A. hortae* em comparação a espécie anteriormente citada, mas sabe-se que é conhecido pela produção de uma variedade de metabólitos secundários, alguns dos quais têm propriedades valiosas que podem ser utilizadas em drogas redutoras de colesterol e antitumorais. Embora não existam trabalhos relacionados, nossos estudos mostraram pela primeira vez que uma linhagem termotolerante de *A. hortae* isolada de solo de lagoas salinas de uma região do Pantanal Mato Grossense conhecida como Nhecolância (Figura 10) apresenta propriedades promissoras na produção de algumas enzimas lignocelulolíticas, especialmente xilanases.

**Figura 10** - Mapa de localização da região da Nhecolândia.



Fonte: DE ALMEIDA et al., 2016.

**4 CAPÍTULO 1: Production, physical-chemical properties and breadmaking application  
of *Aspergillus hortae* xylanases**

#### 4.1 ABSTRACT

This research reports the first investigation of an *Aspergillus hortae* strain producing hemicellulosic enzymes. The work focused on xylanase production in submerged cultures utilizing corn cobs as carbon source and used a 2<sup>2</sup> complete factorial design to optimize enzyme production. The results showed optimum culture conditions at pH 5.36 and 35 °C, yielding 21.75 U/mL of enzyme activity. The filtrate showed optimum activity at pH 6.5 and 55 °C, a wide range of pH stability with around 80 % of residual activity from pH 3.0 to 8.0 and remained 67 % of activity at 50 °C for 5 h. The bread produced with xylanase influenced the decrease in firmness and anti-staling action.

**Keywords:** Xylanases. *Aspergillus hortae*. Enzyme production. Experimental design. Bread making application.

## 4.2 INTRODUCTION

Hemicellulose, the second main component of lignocellulose materials, is an insoluble polymer and a potential source of fermentable sugars (xylans, mannans or galactans). Xylan is the most common hemicellulosic polysaccharide and has a complex structure with a main chain composed by  $\beta$ -D-xylopyranosyl units, linked by  $\beta$ -(1–4)-glycosidic bonds. Lateral substituents as 4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucuronopyranosyl units,  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl, acetyl groups that gives partial solubility in water and others may exist (POLIZELI et al., 2005).

The complete breakdown of xylan requires a xylanolytic system including mainly endo- $\beta$ -1,4-xylanase ( $\beta$ -1,4-D-xylan-xylanohydrolase, EC.3.2.1.8),  $\beta$ -xylosidase (4- $\beta$ -D-xylan xylohydrolase, EC 3.2.1.37) and accessory enzymes. Xylanases are responsible for xylan depolymerization by cleavage of the internal glycosidic linkages of the backbone, liberating oligosaccharides. Many microorganisms, especially fungi, have the ability to secrete these enzymes into the extracellular medium and promote xylan hydrolysis. The *Aspergillus* genus is known as a good producer of xylanases. A study tested twenty-one fungal species and observed that the highest yield of xylanase activity was produced by *Aspergillus terreus* when grown in liquid media containing an agro-industrial residue as the carbon source (DE SIQUEIRA et al., 2010).

For a long time, an *Aspergillus* strain named *Aspergillus hortae* was considered as a synonym of *Aspergillus terreus*, but it has recently been elucidated through phylogenetic analysis that it is a distinct specie. Furthermore, *A. hortae* shows a strong morphological resemblance to *A. terreus*, but has a distinct extrolites profile (SAMSON, PETERSON, FRISVAD; VARGA, 2011). The specie is known from the ex-type isolate and soil isolates from the Galapagos Islands and Florida (USA) and is now reported in our study, for the first time, as a xylanase producer isolated from saline lakes of Nhecolândia, State of Mato Grosso do Sul, Brazil.

Xylanases have many biotechnological applications in various industrial processes: clarifying fruit juices, improving wine aroma, food processing, breadmaking, improvement of the nutritional properties of agricultural silage, poultry feed, degumming of plant fibers, paper pulp or textile industries and increase of the extraction yield of vegetable oils. Despite their well-known biotechnological potential, the challenge is to find enzymes that have the tripod for large-scale applications: low production cost, high yield and high activity in required industrial conditions (temperature, pH and others). For this reason, bioprospecting in extremophile

environments has gained considerable interest in researches to find microorganisms that secrete enzymes that may present these desired industrial characteristics.

Among the various industrial processes in which the enzyme can be employed, endo- $\beta$ -1,4-xylanase from fungi has been successfully used to enhance the breadmaking process quality: improving rheological characteristics of the dough and increasing volume and crumb softness of bread (SHA; MADAMWAR, 2006; JIANG et al, 2010; AHMAD et al., 2012).

In the bread manufacturing process, mixing wheat flour with water forms a dough with a gluten network and other components such as starch and non-starch polysaccharides. Amongst the latter, wheat hemicellulose, which contains different arabinoxylans, competes with the water necessary for the development of the gluten network, in the form of water-unextractable arabinoxylans (WUAX), and impacts bread volume negatively. If xylanase with appropriate characteristics is used, the enzyme acts solubilizing the WUAX, improving dough viscosity and allowing increased hydrogen bonding with dough proteins and starch (McPHILLIPS et al., 2014). Overall, it seems interesting to investigate cheaper ways of production, optimization and the enzyme features, such as pH and temperature, which may be of good applicability in the breadmaking process.

Thus, the aim of this study was to investigate the influence of culture conditions on the production of xylanase by *A. hortae*, biochemically characterize enzyme activity in the crude filtrate obtained under optimized conditions and verify its potential for breadmaking application.

## **4.3 MATERIAL AND METHODS**

### **4.3.1 Microorganism**

The thermotolerant fungi *A. hortae* was isolated from saline lakes of Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brazil and maintained in our laboratory using Castellani's method with distilled water, and cultured periodically on Vogel solid medium, with 1.5 % (w/v) wheat bran, at 40 °C, during 7 days for conidia production.

### **4.3.2 Culture conditions and preparation of crude extracts**

The standard inoculum size ( $2-5 \cdot 10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>) was inoculated in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of the Vogel medium supplemented with 1 % of corn cobs obtained at RASUL Ind. and Com. of Ingredients for Feed Ltda, PR, Brazil. Cultures were

carried out in static conditions at 40 °C during seven days, except when indicated. After that, the crude extracts were vacuum filtered with Whatman No. 541 filter paper and these crude filtrates were used as sources of extracellular enzymes.

#### **4.3.3 Effect of carbon source**

The influence of carbon sources on xylanase production were assayed in submerged culture. Vogel medium was supplemented with 1.0 % (w/v) of each substrate, such as pure carbohydrates (Avicel, carboxymethylcellulose, glucose, oat spelts xylan and xylose) and natural carbon sources (brewer's spent grain, cassava peel, corn cobs, corn cobs and corn stover, rice husk, rice straw, sugarcane bagasse, oat bran and wheat bran).

#### **4.3.4 Xylanase assay**

The xylanase activity was determined by incubation of the culture filtrate with 1 % beechwood xylan (Sigma) in Tris-HCl buffer, pH 7.0, at 50 °C, except when indicated. At 5 and 10 minutes, the reaction was stopped by the addition of the 3,5-dinitrosalicylic acid reagent (DNS) for reducing sugars determination (MILLER, 1959), using xylose as standard. Assays were performed in triplicate. One enzyme activity unit was defined as the amount of enzyme required to release 1 $\mu$ mol of reducing groups per min/mL of sample. Specific activities were expressed as enzyme units per milligram of protein.

#### **4.3.5 Protein determination**

The protein concentration determination was performed by the method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall (1951), using bovine serum albumin as standard.

#### **4.3.6 Effect of culture time and agitation on xylanase production**

The experiments to observe the effect of culture time in static and agitation conditions followed the culture conditions and extract obtainment already mentioned in 4.3.2. The cultures were analyzed for 15 days; triplicate samples were filtered every day and analyzed according to xylanase activity (U.mL<sup>-1</sup>) and specific activity (U.mg<sup>-1</sup>). In agitation condition, the flasks were maintained at 120 rpm.

#### 4.3.7 Effect of pH and temperature on xylanase production

A Central Composite Rotatable Design (CCRD) of two factors ( $2^2$ ) with replicates at the central point was used to optimize the fermentation parameters for enhancing xylanase production. This strategy aimed to find information on the response variable (xylanase activity), the estimation of the optimal condition and validation. The dependent variable selected was enzymatic activity ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and the independent variables were pH and temperature of cultivation. As we used a full factorial design, then  $\alpha$  was calculated according Eq. 1 and  $k=2$  factors (pH and temperature), so that  $\alpha=1.41$ .

$$\alpha = [2^{k/4}] \quad (\text{Eq. 1})$$

The data were treated with STATISTICA 8 from Statsoft Inc (2325 East 13 th Street, Tulsa, OK, 74 104, USA) analyzed by multiple regression analysis according to Eq. 2 and analysis of variance (ANOVA).

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_1x_1^2 + \beta_2x_2^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

Where Y is the measured response variable (xylanase activity);  $x_1$  and  $x_2$  represent the independent variables in coded values.  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{12}$  are constant and regression coefficients of the model.

#### 4.3.8 Optimum pH and temperature and stability of crude filtrate from *A. hortae*

The optimum pH was evaluated in the reaction medium by incubation of enzyme preparations at 50 °C using the substrates with different buffer solutions of different pH values: 0.05 M glycine-HCl (3.0 and 3.5), 0.05 M sodium acetate (4.0 to 5.5), 0.05 M imidazole (6.0 and 6.5), 0.05 M Tris-HCl (7.0 to 9.0), Sorensen (9.5 and 10.0) and McIlvaine (3.0 to 8.0). Optimum temperature was determined by performing the reaction from 30 °C to 75 °C in 0.05 M imidazole buffer pH 6.5

Stability at different pH values was determined as residual activity after enzyme incubation, without substrate, in 2:1 (v/v) solution with buffers of different pH values for 24 h and at 4 °C. The buffers utilized were 0.05 M glycine-HCl (3.0 and 3.5), 0.05 M sodium acetate (4.0 to 5.5), 0.05 M imidazole (6.0 and 6.5), 0.05 M Tris-HCl (7.0 to 8.5), Sorensen (9.0) and McIlvaine (3.0 to 8.0). Thermal stability was analyzed by determining the residual activity after incubation for 300 min, withdrawing aliquots in different periods at temperatures ranging from 40 to 70 °C. After incubation, the samples for both stability parameters were assayed by DNS in imidazole buffer, pH 6.5, and at 55 °C.

### 4.3.9 Breadmaking application

#### 4.3.9.1 *Ingredients*

The ingredients used to produce pan breads were wheat flour enriched with iron and folic acid (Anaconda Mill, São Paulo, Brazil), sugar (Santa Isabel, Novo Horizonte, Brazil), palm fat (Cargill, Mairinque, Brazil), milk powder (Itambé, Belo Horizonte, Brazil), vital gluten (Roquette, Lestrem, France), salt (Finosal, Natal, Brazil), instant dry yeast (AB Brasil, Pederneiras, Brazil) and calcium propionate (AB Brasil, Pederneiras, Brazil). Wheat flour presented moisture, protein (N x 5.7), fat and ash contents of  $13.20 \pm 0.12$  g/100 g,  $9.05 \pm 1.61$  g/100 g,  $1.14 \pm 0.03$  g/100 g and  $0.58 \pm 0.01$  g/100g, respectively. The wet and dry gluten contents, gluten index and Falling Number were  $23.70 \pm 0.12$  g/100 g and  $8.22 \pm 0.28$  g/100 g,  $99.09 \pm 0.44$  and  $370 \pm 12$  s, respectively.

#### 4.3.9.2 *Rheological properties*

The pure refined wheat flour (RWF), as well as mixtures of this flour with added xylanase enzyme, were analyzed as to their rheological properties in a Farinograph (Model 810130, Brabender, Duisburg, Germany), according to AACCI method 54-21.02 (2010); an Alveograph (Model MA 95, Chopin, Villeneuve-la-Garenne, France), according to AACCI method 54-30.02 (2010); and a Rapid Visco Analyzer (Model 4500, Perten Instruments, Warriewood, Australia), using the TCW 3.15.1.255 software, according to ICC method 162 (1996).

#### 4.3.9.3 *Xylanases extract preparation*

The crude xylanases preparation to be added in the bread formulation followed the item 4.3.2, but at the optimized culture conditions pH 5.36 and 35°C. The concentrate filtrate was dialyzed and analyzed for aflatoxin and ochratoxin A according to Soares and Rodas-Amaya (1989) and no mycotoxin was detected (data not shown).

#### 4.3.9.4 *Bread formulation*

Two pan bread formulations were produced, one denominated control, i.e. without the addition of the enzyme and the second with added xylanase (1063 U per 100 g of flour). The basic formulation for both assays was: RWF (100.0 %), water (64.0 %), sugar (4.0 %), palm fat (4.0 %), milk powder (4.0 %), gluten (1.5 %), salt (1.8 %), instant dry yeast (1.3 %) and calcium propionate (0.2 %), flour basis.

#### 4.3.9.5 Preparation of breads

The breads were prepared in duplicate through the modified straight dough method, in which the ingredients were mixed in a mixer (Model SPI 11, VMI, Montaigu, France) for 3 min at low speed (vat: 20 rpm/blade: 100 rpm) and for 5 min at high speed (vat: 20 rpm/blade: 220 rpm).

The dough was then divided into portions of  $200 \pm 1$  g, which were rounded manually, molded in a molding machine (Model MR500, Prática Technipan, Pouso Alegre, Brazil), put in baking tins (8 cm width x 17.5 cm length x 5 cm height) and taken to a proofing chamber (Model CF10V2, Klimaquip, Pouso Alegre, Brazil) with temperature ( $33 \pm 1$  °C) and relative humidity ( $85 \pm 5$  %) control. The doughs were proofed for approximately 60 min and baked in an electric oven (Model HPE80, Prática Technipan, Pouso Alegre, Brazil) for 20 min at 160 °C.

#### 4.3.9.6 Evaluation of the breads

The breads were characterized on the day after processing in relation to their specific volume, according to AACCI method 10-05.01 (2010).

On the first and fifth days after processing, the crumb was evaluated for: moisture content, according to AACCI method 44-15.02 (2010); water activity using a digital AquaLab apparatus (Model CX-2, Decagon, Pullman, United States); instrumental color, through the CIELab system (Minolta, 1994); and instrumental texture, according to AACCI method 74-09.01 (2010), using a TA-XT2 texture analyzer, with a load of 50 kg (Stable Micro Systems, Surrey, England), and a P/25 cylindrical aluminum probe, being only the crumb compressed. Two slices of bread (1.25 cm each) were superimposed and arranged parallel to the platform and the following parameters were set: test mode and option = measure of strength in compression; pre-test speed = 1.0 mm/s; test speed = 1.7 mm/s; post-test speed = 10.0 mm/s; distance = 40 %.

All analyses were performed in triplicate, except instrumental texture, which was performed in eight repetitions.

#### 4.3.9.7 Statistical analysis

The results of bread quality parameters were evaluated by analysis of variance and mean comparisons by the Tukey test ( $\alpha \leq 0.05$ ), using the Statistica 7.0 software (Statsoft, Tulsa, United States).

## 4.4 RESULTS AND DISCUSSION

### 4.4.1 Influence of the carbon source on xylanase production

In order to optimize xylanase production by *A. hortae*, different carbon sources were tested (Table 1). Among pure carbohydrates, xylan exhibited the highest specific activity (65.11 U.mg<sup>-1</sup>) and carboxymethylcellulose did not exhibit any detectable activity. In general, xylan

**Table 1** - Effect of different carbon source on xylanase production by *A. hortae*.

Carbon source (1% w/v)	Extracelular enzymatic activity (U/mL)	Specific activity (U/mg extracelular protein)
Avicel	0.41 ± 0.06	ND*
Carboxymethylcellulose	ND*	ND*
Glucose	0.30 ± 0.05	1.50 ± 0.29
Xylan (oat spelts)	17.21 ± 1.47	65.11 ± 2.55
Xylose	3.41 ± 0.58	8.92 ± 6.31
Brewer's spent grain	13.71 ± 0.22	29.84 ± 0.60
Cassava peel	0.48 ± 0.04	3.45 ± 0.35
Cassava peel (mashed)	2.02 ± 0.05	14.95 ± 0.88
Corn cobs	23.00 ± 0.62	44.43 ± 1.88
Corn cobs and corn stover	4.08 ± 0.81	13.25 ± 2.08
Oat bran	1.60 ± 0.22	3.42 ± 0.61
Rice husk	3.00 ± 0.36	14.47 ± 1.48
Rice straw	0.74 ± 0.13	2.83 ± 0.21
Sugarcane bagasse (1-0.35)	9.87 ± 1.82	20.94 ± 6.56
Sugarcane bagasse (2-1)	4.08 ± 0.14	13.77 ± 1.19
Wheat bran (comercial)	12.14 ± 0.75	27.80 ± 2.94
Wheat bran (wild)	10.28 ± 1.57	23.14 ± 3.17

Medium Voguel with 0.25% of carbon source, pH 6. Culture of 7 days at 40°C. Activities were assayed at 50°C with 1% xylan in 0.05M Tris-HCl buffer pH 7.0. \*not detectable at assay conditions.

substrates provide an important role in xylanase induction and comprise the highest xylanase activities (SHAH; MADAMWAR, 2005; SUDAN; BAJAJ, 2007). The low xylanase activity observed with more simple or more available substrates, such as glucose ( $1.5 \text{ U.mg}^{-1}$ ) and xylose ( $8.92 \text{ U/mg}$ ), confirms the inducible character of these xylanase, showing a forty-fold increase in activity when using xylan, in comparison to glucose, and an increase of seven-fold when comparing with xylose.

Among the agroindustrial carbon sources, corn cobs showed the highest xylanase activity ( $23 \text{ U.mL}^{-1}$ ,  $44.43 \text{ U.mg}^{-1}$ ). This can be explained due to their high xylan content around 40 % (KNOB et al., 2014). Low activity levels were obtained with cassava peel, rice straw and oat bran, corresponding to  $0.48 \text{ U.mL}^{-1}$  ( $3.45 \text{ U.mg}^{-1}$ ),  $0.74 \text{ U.mL}^{-1}$  ( $2.83 \text{ U.mg}^{-1}$ ) and  $1.60 \text{ U.mL}^{-1}$  ( $3.42 \text{ U.mg}^{-1}$ ), respectively. These low levels and the different production levels observed among the lignocellulosic materials are probably related to differences in composition of these substrates. Rice straw xylose content consists of 14.8 to 23 g/100 g of dry material while in corn cobs it is around 28 to 35.4 g/100 g of dry material (GÍRIO et al., 2010).

Although the highest specific activity was observed with oat spelts xylan and this could be important for further purification studies, corn cobs is a cheaper carbon source and an important by-product from the food industry. So further studies were carried out with this substrate at 1 % concentration (w/v).

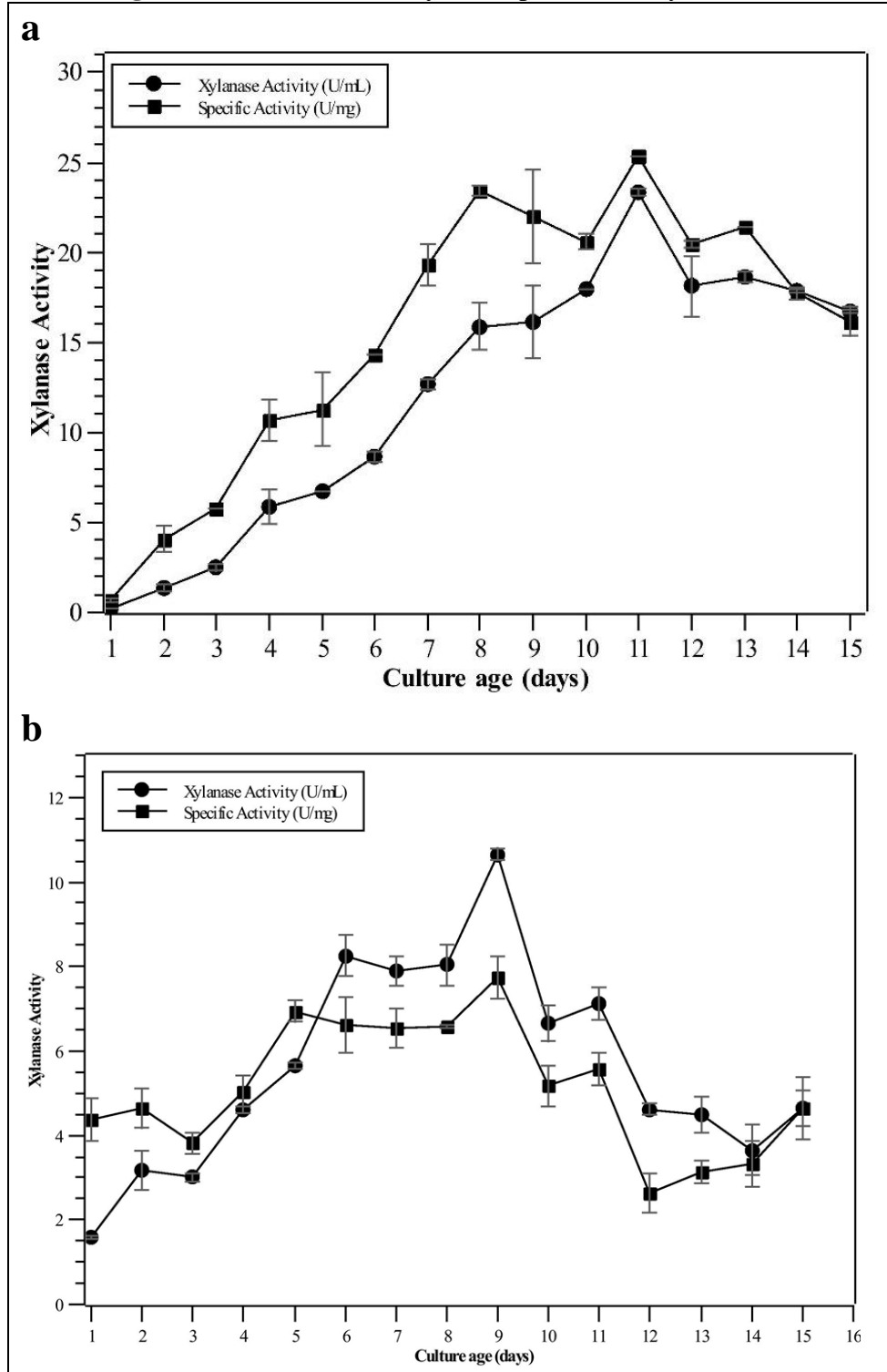
#### 4.4.2 Optimization of culture conditions

##### 4.4.2.1 Time course of xylanase production by *A. hortae* in static and shaking conditions

The figure 1 shows the time course of xylanase production by *A. hortae* in submerged culture and static conditions reach the maximum on the eleventh day ( $23.30 \text{ U.mL}^{-1}$ ;  $25.31 \text{ U.mg}^{-1}$ ) and on the last day analyzed still showed an interesting activity ( $16.70 \text{ U.mL}^{-1}$  and  $16.16 \text{ U.mg}^{-1}$ ). The most common time required by *Aspergillus* species as *A. fumigatus*, *A. niveus*, *A. awamori*, *A. oryzae* and *A. tamaraii* xylanase production is between 3 and 5 days (DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009). High xylanase production from *A. foetidus* was achieved after 4 days of cultivation (SHAH; MADAMWAR, 2005) and a peak of xylanase production on the fifth day was reported with *A. niveus* (SUDAN; BAJAJ, 2007). Besides the atypical behavior compared to most *Aspergillus* species, a very long period of cultivation, as observed in our study, was also shown by an *A. fumigatus* xylanase produced with wheat bran carbon source during 11 days (ABDEL-MONEM; EL-BAZ; SHETAIA; EL-SABBAGH, 2012). It would appear that the maximum enzyme production stage is largely dependent upon

the type of microbial strain as well as on cultural and environmental conditions during the growth of the organism.

**Figure 1:** Time-course of xylanase production by *A. hortae*



Static (a) and shaking (b) culture conditions. Growth conditions medium: Vogel liquid with corn cobs (1%), pH 7.0, 40 °C. Activities were assayed in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 with 1% xylan, at 50 °C.

The xylanase production by *A. hortae* in shaking conditions (120 rpm) had a peak earlier than that presented in static cultures, on the ninth day ( $10.5 \text{ U.mL}^{-1}$ ), but was lower than that found in stationary cultures. Furthermore, the specific activity ( $7.75 \text{ U.mg}^{-1}$ ) in shaking conditions was found to be much lower than in static culture conditions. Less xylanases from *Penicillium janthinellum* were found being produced at higher agitation rates, suggesting that the shearing forces causing hyphal disruption and influencing on xylanase production, or xylanase activities could decrease with increases in oxygen concentration probably due to inhibition by oxygen (PALMA; DE MANCILHA, 1996).

According to the results presented, stationary culture conditions for 11 days exhibited the best xylanase activities and were selected for the subsequent experiments.

#### 4.4.2.2 Response surface methodology (RSM) for optimizing xylanase production

A  $2^2$  experimental design with two factors and five levels, including three replicates at the central point (totalizing 11 experimental runs) was used to obtain a second-order model in order to predict the xylanase production as a function of pH ( $x_1$ ) and temperature ( $x_2$ ). The coded levels of the input variables and the real pH and temperature values are exhibited in Table 2. The highest xylanase activity ( $20.02 \text{ U.mL}^{-1}$ ) was observed for run 5, in which the factor pH was employed at a lower level (pH 4) and temperature at an intermediary level ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ). The lowest xylanase activities were observed for runs with pH at high levels (runs 4 and 6) and for run 8 that had high temperature.

**Table 2** - Experimental design and results of the  $2^2$  factorial design

Run number	Coded Levels (real levels)		Xylanase activity ( $\text{U.mL}^{-1}$ )	
	$x_1$	$x_2$	Observed	Predicted
1	-1 (4.88)	-1 (27.9)	10.54	10.45
2	1 (9.12)	-1 (27.9)	9.52	6.83
3	-1 (4.88)	1 (42.1)	15.11	16.36
4	1 (9.12)	1 (42.1)	2.28	0.92
5	-1,41 (4)	0 (35)	20.02	18.90
6	1,41 (10)	0 (35)	2.86	5.43
7	0 (7)	-1,41 (25.0)	6.97	5.11
8	0 (7)	1,41 (45.0)	1.81	5.11
9	0 (7)	0 (35)	19.54	18.43
10	0 (7)	0 (35)	18.13	18.43
11	0 (7)	0 (35)	17.63	18.43

$X_1$  and  $X_2$  are the coded and real values of pH and temperature

According to the regression analysis, all quadratic terms for pH and temperature were significant ( $p < 0.1$ ), but the linear term for temperature was not significant ( $p > 0.1$ ), so it was eliminated from the model (Table 3).

**Table 3** - Regression analysis of the  $2^2$  factorial design

Term	Coefficient	T-statistic	P-value
Intercept	18.43333	13.25446	0.000011
$x_1$	-4.76474	-5.59476	0.001388
$x_1^2$	-3.13479	-3.09255	0.021318
$x_2^2$	-6.65979	-6.57006	0.000596
$x_1 \cdot x_2$	-2.95250	-2.45142	0.049695

$x_1$ : pH;  $x_2$ : temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ).  $p \leq 0.1$

A second-order polynomial equation to predict xylanase production as a function of pH and temperature was obtained (Eq. 3) and the R-squared was 0.93 indicating that 93 % of the variability in the observed response values for xylanase production can be explained by the experimental factors and their interactions and only 7 % of the total variation cannot be explained by the model.

$$\text{Xylanase Activity} = 18.43 - 4.76x_1 - 3.13x_1^2 - 6.66x_2^2 - 2.95x_1x_2 \text{ (Eq. 3), where:}$$

$x_1$ : pH and  $x_2$ : temperature.

ANOVA was used to evaluate the adequacy of the fitted model (Table 4); the model is predictive because the calculated F-value (20.49) was 6 times higher than the listed F-value (3.18), at 90 % confidence level. The low p-values obtained also indicate the significance of the model. Therefore, the coded model in Eq. 3 was used to generate the response surface (Fig. 1a) and contour plot (Fig. 1b) to optimize culture requirements for xylanase production.

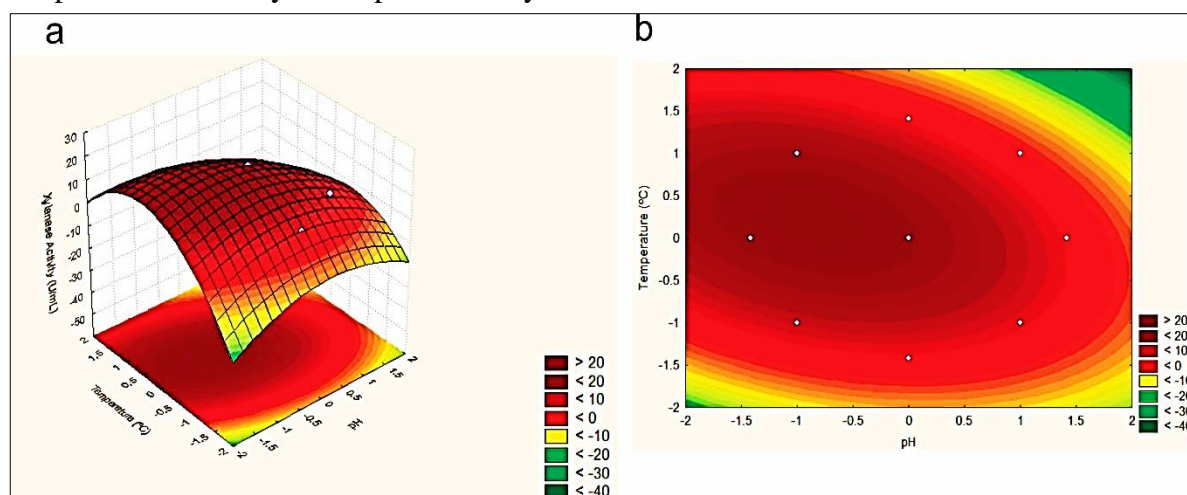
**Table 4** - Analysis of variance (ANOVA) for the second order polynomial models

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F calculated	F listed
Regression	475.50	4	118.88	20.49	3.18
Residual	34.81	6	5.80		
Lack of fit	19.54	3	6.51	1.28	9.16
Pure error	15.27	3	5.09		
Total	510.32	10			

$R^2=0.93178$ .

As can be seen in the response surface (Fig. 2a) and contour plot (Fig. 2b), the conditions in the dark red region can be considered the optimum region for xylanase production. Included in this region the best conditions for xylanase production found in our experiments: pH 4 and 35 °C (run 5). However, even better production conditions can be predicted if we use levels closer to the central region of the surface or plot. This region was calculated and corresponds to the coded value for pH -0.76 and real value of 5.36 and for temperature the values are in the central point (coded 0 and real 35 °C). Thus, using these improved production conditions coded values in Eq. 3, the predicted activity obtained is 20.25 U.mL<sup>-1</sup> and the observed activity in the experimental validation was 21.75 U.mL<sup>-1</sup>, showing that the model is valid.

**Figure 2** - Response surface curve (a) and contour plot (b) of the combined effects of pH and temperature on the xylanase production by *A. hortae*.



Activities were assayed in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 with 1% xylan, at 50 °C

Commonly, the best yields for xylanase production by *Aspergillus* spp. are seen in pH range of 4 to 7. Hood and co-workers (2014) observed that the highest xylanase activity from *Aspergillus brasiliensis* was produced at pH 6.5 (39.57 U.mL<sup>-1</sup>). On the other hand, Ahmad (2012) achieved lower xylanase activity at these pH (11.97 U.mL<sup>-1</sup>) and higher at pH 5.5 (37.93 U.mL<sup>-1</sup>). Other studies showed that xylanase production was maximum around pH 5 (MILAGRES, LACIS; PRADE, 1993) as well as our study verified it for *A. hortae*.

Lower xylanase activity was observed when the initial pH of the medium was set to alkaline conditions, especially if in combination with high temperatures. The activity dropped considerably, as shown in run 4: pH 9.12 and 42 °C (2.28 U.mL<sup>-1</sup>) and in run 6: pH 10 and 35 °C (2.86 U.mL<sup>-1</sup>). However, when cultivated at pH 9.12, but under lower temperature (27.9 °C),

the xylanase activity was considerably higher ( $9.52 \text{ U.mL}^{-1}$ ). Several studies also showed that low xylanase activity was observed in alkaline pH medium (GUPTA, GAUR, YADAVA; DARMWAL, 2009; HOOD; HO, 2014). It could indicate that the fungi was not able to grow at experimental high alkaline condition and hence, xylanase was not synthesized.

Regarding temperature of the culture medium, it is a very important parameter to reach the best xylanase yield in submerged culture. If it were higher than the optimum, it could affect factors such as availability of nutrients for the culture and enzyme inhibition or denaturation. On the other hand, low temperature may lead to lower metabolic activity. Several studies indicated that maximum fungal xylanases production occurred at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (DUEÑAS; TENGERDY; GUTIERREZ-CORREA, 1995; ZIMBARDI ET AL., 2013) and Hood and co-workers (2014) obtained the best production at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $38.53 \text{ U.mL}^{-1}$ ) with *A. brasiliensis*. Lakshmi and coworkers (2009) noticed that the maximum xylanase production was observed at  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  with *A. terreus* under solid state fermentation and Fang (2007) also achieved optimal cultivation conditions predicted for xylanase from *A. carneus* at  $35.08 \text{ }^\circ\text{C}$ .

In our study, the maximum xylanase yield was achieved at  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , and at temperatures close to  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $27.9 \text{ }^\circ\text{C}$ ), the yield decreased to half (run 1). Instead, Gupta et al. (2009) noted maximum xylanase production from *Fusarium solani* ( $60 \text{ U.mL}^{-1}$ ) at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  and a decrease at  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $40 \text{ U.mL}^{-1}$ ). Although there are studies showing that higher temperatures favor the growth of fungi and lower temperatures lead to higher yields of xylanase, Lenartovicz (2002) showed, as evidenced in our work, a higher xylanase yield ( $57 \text{ U.mL}^{-1}$ ) at high temperature ( $42 \text{ }^\circ\text{C}$ ) than that observed at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $54 \text{ U.mL}^{-1}$ ). It was also evidenced by Rizzatti (2004), who worked with *Aspergillus phoenicis*, and mentioned that xylanase was strongly stimulated at the higher temperature.

#### **4.4.3 Properties of the xylanases present in crude extract**

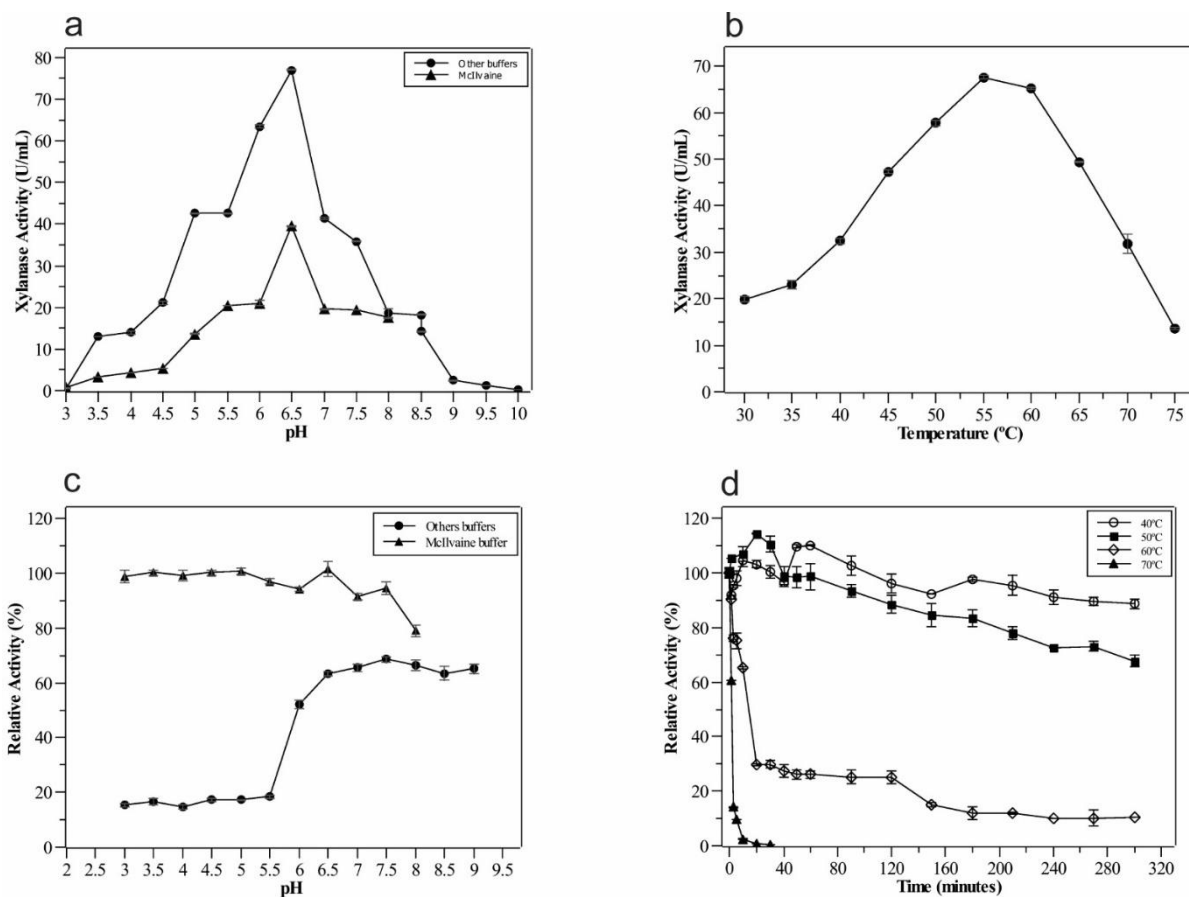
##### *4.4.3.1 Optimum pH and temperature*

The best pH for xylanase activity of the crude extract was 6.5 (Fig. 3a). Several studies verified that the most suitable pH value for xylanase activity was within the acid region (MILAGRES, 1993). Furthermore, in studies with *Aspergillus* spp., a commonly found optimum pH is pH 5.0 (SHAH; MADAMWAR, 2005; DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009; ZIMBARDI et al., 2013). Souza (2012) demonstrated optimum xylanase activity at pH 6.0 for filtrate culture from *Aspergillus fumigatus*. Sudan (2007) showed optimum pH for xylanase from *Aspergillus niveus* at the neutral region (pH 7.0), but in our

study the relative activity dropped to 54 % in this region when using Tris HCl buffer and to 50 % with McIlvaine buffer in the reaction medium. Other *Aspergillus* spp. xylanases are alkalophilic (POLIZELI et al., 2005), but in this pH range we had less than 50 % of xylanase activity.

The optimum temperature was 55 °C (Fig. 3b), greater than that found for most other fungal xylanases that exhibit an optimum temperature at 50 °C (SHAH; MADAMWAR, 2005; SUDAN; BAJAJ, 2007), but in accordance with that exhibited by xylanase from *A. niveus* (DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009). Jin and co-workers (2012) also showed

**Figure 3** - Influence of pH (a) and temperature (b) on the xylanase activity and pH (c) stability and thermoestability (d) of crude filtrate from *Aspergillus hortae*.



Activities were assayed at 50 °C in McIlvaine buffer (▲) and others buffers solutions (●): glycine-HCl (3.0 and 3.5), sodium acetate (4.0 to 5.5), imidazole (6.0 and 6.5), Tris-HCl (7.0 to 8.5), Sorensen (8.5 to 10.0) and McIlvaine (3.0 to 8.0) in (a) and in imidazole buffer pH 6.5 in (b); Samples were incubated at 4°C for 24 h in buffer solutions: glycine-HCl (3.0 and 3.5), sodium acetate (4.0 to 5.5), imidazole (6.0 and 6.5), Tris-HCl (7.0 to 8.5) and Sorensen (9.0) and in McIlvaine buffer (pH 3.0 to 8.0) and activities were assayed at 55°C in imidazole buffer pH 6.5 in (c). Samples were incubated at 40 °C (○), 50 °C (■), 60 °C (◇), 70 °C (▲) and assayed at 55°C in imidazole buffer pH 6.5 in (d).

optimum temperature at 55 °C with xylanase from *A. niger* when cultivated in solid state fermentation using wheat straw and corn cobs. Higher xylanase optimum activities were noticed by Zimbard (2013) with *Colletotrichum graminicola* (66.91 °C) and, although less common, some *Aspergillus* spp. exhibited the same optimum temperature observed for thermophilic fungi as that noticed by De Carvalho Peixoto-Nogueira and co-workers (2009), that presented optimum activities at 70 °C for xylanase from *A. fumigatus*.

#### 4.4.3.2 pH and temperature stability

Thermal and pH stability are important properties for many industrial applications. The pH stability of crude xylanase from *A. hortae* is shown in Fig. 3c. It was noted that xylanase relative activity was kept above 80 % of its original activity after 24 h over a broad range of pH evaluated (from 3.0 to 8.0) when incubated with McIlvaine buffer. However, with other buffers analyzed, the relative activity was not very stable, exhibiting activity less than 20 % in acid pH (from 3.0 to 5.5) and between 52 % and 69 % around pH 6.0 to 9.0.

The reports regarding pH stability present wide variation in literature, even for *Aspergillus* sp. De Carvalho Peixoto-Nogueira and co-workers (2009) observed a xylanase from *A. fumigatus* more stable in pH from 6.0 to 8.0 while xylanase from *A. niveus* was more stable in pH range 4.5 to 6.0. Despite the variation in the literature on pH stability, it is most common to find a good stability at pH 4.5 to 9.0. The good stability (99 %) observed using McIlvaine buffer at pH 3, as found in our study, is not common in literature.

Regarding thermostability, xylanase relative activity at 40 °C remained above 89 % and at 50 °C remained above 67 % for a period of 5 h (Fig. 3d). The half-life times at 40 °C and 50 °C were around 7 h and 8 h, respectively. At 60 °C, the half life was around 15 min and at 70 °C it was around 2 min. Xylanase produced by *A. niger* remained stable after incubation at 50 °C for 30 min (JIN et al., 2012). Our study also verified a similar result at 50 °C, but whereas the xylanase of the mentioned study retained 64 % of its original activity after incubation at 60 °C for 30 min, we obtained around half this activity (30 %) in the same conditions.

On the other hand, Rizzatti (2004) verified that a crude xylanase from *A. phoenicis* was stable up to 60 min at 50 °C, but a significant decrease was obtained at 60 °C, as also evidenced in our study. After 120 min at 60 °C, a crude xylanase from *A. fumigatus* retained only 10 % of its activity and xylanase from *A. niveus* maintained 30 % of its initial activity (DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA ET AL., 2009), whereas we observed 25 % of relative activity at 60 °C after the same time.

Other studies showed xylanases with high thermostability, especially from thermophilic fungi. Souza (2012) related an endoxylanase from *A. fumigatus* that retained around 40 % of its activity after 120 min at 60 °C. Stability at even higher temperatures was observed by Jin (2012) that reported a xylanase with a stability of 55 % at 85°C for 30 min. Although in our study the crude filtrate does not seem stable at very high temperatures, as in the mentioned studies, it had the required temperature for breadmaking application and had a property much required in some industrial processes as the maintenance of stability for a long period.

#### **4.4.4 Breadmaking application**

##### *4.4.4.1 Rheological properties*

The results obtained in the farinographic, alveographic and pasting properties analyses are shown in Table 5. The farinographic parameters of the dough were altered with the addition of the xylanase enzyme, except water absorption. The dough with added xylanase had lower arrival and dough development times, as well as reduced stability in relation to the control (without enzyme).

A greater mixing tolerance index (MTI) value for the dough was also observed, which together with the previous results, shows a tendency to a reduction in consistency (that could be interpreted as weakening) of the dough with the addition of the xylanase. Jiang and co-workers (2005) also observed this weakening, once they obtained decreased water absorption, development time and stability when using thermostable recombinant xylanase. Steffolani and co-workers (2010) obtained a difference between control and xylanase added doughs only for stability, noting a slight decrease of this parameter with the enzyme addition, which is also due to this weakening of the dough. Despite the changes observed, these values are suitable for the production of bread (POMERANZ, 1988).

The alveographic parameters showed no difference between the control and xylanase containing dough for any of the parameters, indicating that maybe a smaller effect would be observed during resting and proofing than during mixing. At concentrations of 0.006 %, Steffolani and co-workers (2010) did not observe any influence of the enzyme on the same parameters.

**Table 5** - Farinographic and alveographic parameters and pasting properties of the control formulation (wheat flour) and of the xylanase added formulation (xylanase + wheat flour)

Parameters	Control formulation	Formulation with added xylanase
<b>Farinographic</b>		
WA (%)	55.7 ± 0.3 <sup>NS</sup>	55.8 ± 0.2 <sup>NS</sup>
AT (min)	0.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>b</sup>
DDT (min)	14.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	12.5 ± 1.1 <sup>b</sup>
S (min)	20.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	16.5 ± 1.4 <sup>b</sup>
MTI (BU)	40.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	46.7 ± 1.5 <sup>a</sup>
<b>Alveographic</b>		
P (mm)	111.7 ± 10.1 <sup>NS</sup>	101.5 ± 4.3 <sup>NS</sup>
L (mm)	40.8 ± 6.7 <sup>NS</sup>	45.3 ± 2.5 <sup>NS</sup>
P/L	2.8 ± 0.7 <sup>NS</sup>	2.2 ± 0.0 <sup>NS</sup>
W (10 <sup>-4</sup> J)	181.7 ± 11.2 <sup>NS</sup>	187.7 ± 10.3 <sup>NS</sup>
<b>Pasting properties</b>		
Pasting temperature (°C)	68.5 ± 0.8 <sup>NS</sup>	69.1 ± 0.4 <sup>NS</sup>
Peak viscosity (cP)	1887.3 ± 36.7 <sup>NS</sup>	1812.7 ± 34.3 <sup>NS</sup>
Breakdown (cP)	1019.3 ± 28.4 <sup>NS</sup>	1014.3 ± 26.6 <sup>NS</sup>
Final viscosity (cP)	1987.0 ± 23.6 <sup>a</sup>	1845.0 ± 26.0 <sup>b</sup>
Setback (cP)	1119.0 ± 18.5 <sup>a</sup>	1046.7 ± 18.9 <sup>b</sup>

Mean ± standard deviation; WA = water absorption; AT = arrival time; DDT = dough development time; S = stability; MTI = mixing tolerance index; BU = Brabender units; P = overpressure; L = abscissa at rupture; W = deformation energy. Means with different letters in the same row are statistically different ( $p \leq 0.05$ ); NS = not significant.

Regarding pasting properties, the addition of xylanase caused a decrease in final viscosity and setback (retrogradation tendency), in relation to the control. It is known that xylanase acts on the insoluble arabinoxylans, turning them into soluble arabinoxylans, probably causing changes in viscosity (ROUAU et al., 1994; COURTIN; DELCOUR, 2001). According to Courtin and Delcour (2001), xylanases degrade water-extractable arabinoxylans to lower molecular weight compounds, thereby lowering viscosity inducing properties and partially impairing gelling capacity. A decreased setback can be described as a lower tendency of amylose to retrograde after diffusing outside the starch granules during the cooking stage (ROJAS et al., 1999). Apparently, xylanase contributed to the reduction of setback, possibly contributing to decrease the firmness of breads.

#### 4.4.4.1 Evaluation of the breads

Among the parameters analyzed, the texture of the crumb of the breads was affected by adding the xylanase (Table 6). It is also possible to observe that the breads with added xylanase presented higher moisture content on the first day of storage, but differences were not

significant on the fifth day of storage. The small or no influence on moisture and water activity of the bread, respectively, can be derived from the farinographic water absorption, which was not affected by the enzyme.

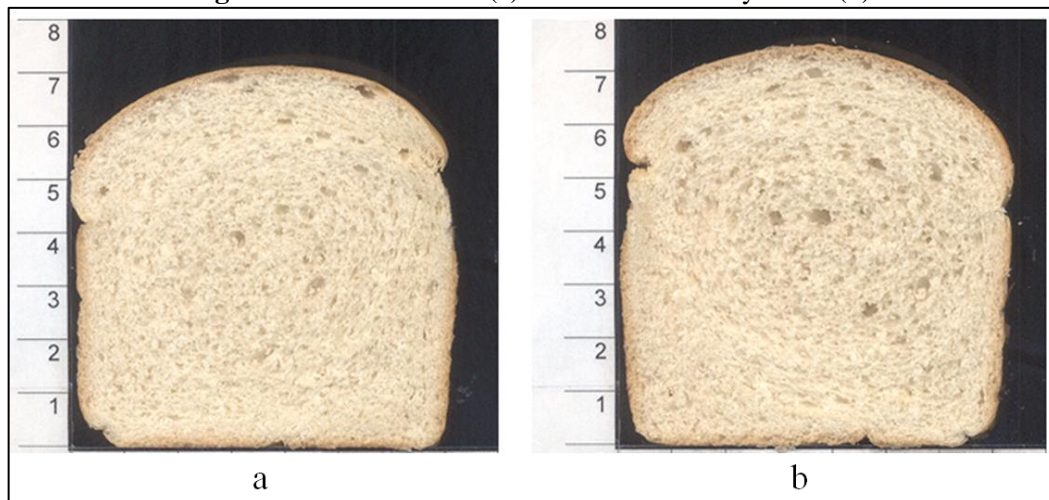
**Table 6** - Technological parameters of the loaves

Analyses	Days	Breads		
		Control formulation	Formulation with added xylanase	
SV (mL/g)	1	3.42 ± 0.17 <sup>ns</sup>	3.50 ± 0.18 <sup>ns</sup>	
Aw	1	0.956 ± 0.001 <sup>ns A</sup>	0.956 ± 0.002 <sup>ns A</sup>	
	5	0.951 ± 0.002 <sup>ns B</sup>	0.949 ± 0.001 <sup>ns B</sup>	
Moisture (%)	1	38.5 ± 0.1 <sup>b A</sup>	38.9 ± 0.1 <sup>a A</sup>	
	5	36.4 ± 0.4 <sup>ns B</sup>	36.2 ± 0.3 <sup>ns B</sup>	
Firmness (N)	1	896.90 ± 125.13 <sup>a B</sup>	814.49 ± 92.65 <sup>b B</sup>	
	5	1345.83 ± 133.95 <sup>a A</sup>	1190.80 ± 115.08 <sup>b A</sup>	
Color parameters	L*	1	82.44 ± 0.66 <sup>ns A</sup>	82.85 ± 0.35 <sup>ns A</sup>
		5	81.40 ± 0.61 <sup>ns B</sup>	82.04 ± 0.64 <sup>ns B</sup>
	a*	1	1.89 ± 0.10 <sup>ns NS</sup>	1.86 ± 0.09 <sup>ns NS</sup>
		5	2.02 ± 0.20 <sup>ns NS</sup>	1.95 ± 0.11 <sup>ns NS</sup>
	b*	1	21.27 ± 0.59 <sup>ns B</sup>	20.87 ± 0.48 <sup>ns B</sup>
		5	22.13 ± 0.72 <sup>ns A</sup>	21.77 ± 0.57 <sup>ns A</sup>

Mean ± standard deviation; SV = specific volume; Aw = water activity. Means with different lowercase letters in the same line and different uppercase letters in the same column for the same parameter differ statistically ( $p \leq 0.05$ ); ns or NS = not significant.

Although no influence of the xylanase was seen on the specific volume of the loaves, in the literature, some effects of xylanases in bread have been reported. For example, regarding the specific volume, several authors have reported its increase with the use of xylanase (STEFFOLANI; RIBOTTA; PÉREZ; LEÓN, 2010; JAEKEL; SILVA; STEEL; CHANG, 2012; McPHILLIPS et al., 2014). However, Damen and co-workers (2012) also did not observe the influence on volume, as in our study. These different results can be explained by different factors, such as the enzyme type and concentration used or the pentosan content of the wheat flour, that can vary from one flour to another (COURTIN; DELCOUR, 2001). Another parameter, the color of breads did not change, which is very positive, since this is an important quality attribute and affects acceptance by consumers.

**Figure 4 - Control bread (a) and bread added xylanase (b).**



Regarding the firmness of the crumb, several authors also observed a decrease with the addition of different types of xylanase (JIANG et al., 2005; STEFFOLANI et al., 2010; JAEKEL; SILVA; STEEL; CHANG, 2012; ELGHARBI et al., 2015). It is known that xylanases have an anti-staling action during bread storage but their action is not clear (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002). According to Haros and co-workers. (2002), the effect of xylanase on bread texture can be linked to the specific volume, because generally a lower initial firmness is due to a greater volume. However, in our study, we observed a decrease in firmness without the volume having been altered, demonstrating the direct anti-staling action. Xylanase probably transforms water-insoluble hemicellulose into the soluble form, which binds water in the dough, therefore decreasing dough firmness, increasing volume and creating finer and more uniform crumbs (ROUAU et al., 1994; ELGHARBI et al., 2015). This anti-staling effect can be confirmed by a reduction of the hardening rate of 33.3 to 31.6% for the control bread and the bread with added xylanase, respectively, i.e., lower firmness was maintained until day five.

In addition, the texture may have been influenced by the reduction of amylose retrogradation (as seen in the pasting property response of a decrease of setback), which is also responsible for the firming of the crumb of breads during the first hours after baking (HAROS et al., 2002).

Regarding the evaluation of bread quality parameters during the storage period, the changes were small and as expected for breads, with the xylanase added sample maintaining its firmness lower when compared to the control.

#### 4.5 CONCLUSION

*Aspergillus hortae* is a good xylanase producer when using corn cobs as carbon source cultured at optimal conditions, pH 5.36 and 35 °C. The crude xylanase presented optimal activity at pH 6.5 and 55 °C, stability in a broad range of pH (from 3.0 to 8.0) and high thermal stability at 40 and 50 °C, retaining more than 80 % of its activity. The crude filtrate from *A. hortae* containing xylanases can be applied in breadmaking to promotes a significant anti-staling effect. Despite the xylanase having promoted a small weakening in the dough, it caused no changes that could greatly interfere in the process. However, the decrease in the final viscosity and the setback may have influenced the decrease in firmness and anti-staling action, which can be confirmed by the reduced crumb firmness, both on day 1 as on day 5 of storage.

**5 CAPÍTULO 2: Halotolerant xylanases of *Aspergillus hortae* isolated from saline environment: purification and partial characterization**

## 5.1 ABSTRACT

The xylan is composed by a main chain of D-xylose residues linked by glycosidic bonding  $\beta$ -1,4 commonly with branching. Endo-1,4- $\beta$ -xylanases (E.C.3.2.1.8) catalyze the xylan backbone hydrolysis to xylooligosaccharides. This work describes, for the first time, the purification of three xylanases from an *Aspergillus hortae* strain isolated from saline environment. The Xyl I, Xyl II and Xyl III molecular mass estimated by SDS and gel filtration were 33 and 26 kDa, 25 and 20 kDa, 29 and 28 kDa, respectively. The enzymes activities were optimum on pH 6.0 for Xyl I and pH 6.5 for Xyl II and Xyl III. The optimum temperature displayed by Xyl I and Xyl II was 55°C whereas Xyl III presented optimum activity at 65°C as well as stability over a wide pH range from 3.0 to 10.0. The  $K_m$  and  $V_{max}$  on oat spelts xylan for Xyl I, Xyl II and Xyl III were 2.19 U/mL and 0.45 mg/mL, 2.28 U/mL and 546.00 mg/mL and 16.08 U/mL and 79.70 mg/mL, respectively. For beechwood xylan, Xyl I, Xyl II and Xyl III showed  $K_m$  and  $V_{max}$  of 5.34 U/mL and 0.19 mg/mL, 1.27 U/mL and 308.80 mg/mL and 1.64 U/mL and 22.22 mg/mL, respectively. Xyl I was activated in all analysed NaCl concentrations, especially at 4 M and remained fully activated after 3 h incubation at 25°C in 2 M NaCl concentration. Xyl II and Xyl III showed high tolerance to NaCl, displaying 85% and 58% of activity at 2 M, respectively as well as remained with 75% and 58% of activity after 3 h incubation at 25°C in this concentration. These results indicate possible employment of such enzymes in some industrial processes, which require activity in elevated temperature and stability in alkaline or saline conditions.

**Palavras chave:** *Aspergillus hortae*; xylanases purification; halotolerant; thermostable enzymes.

## 5.2 INTRODUCTION

Xylanases are enzymes belonging to the class of glycosyl hydrolases and are responsible for the xylan hydrolysis. The structure of xylan is composed of a main chain of  $\beta$ -1,4 linked glycosidic D-xylose residues and branches with different substituents as well as degrees of polymerization, depending on the nature of the material (LIAB, et al., 2000; DODD; CAN, 2009; PEÑA, et al., 2016). The corn cobs xylan, for example, has a structure consisting of 4-O-methyl-D-glucuronic acid, L-arabinose and D-xylose in proportions of 2: 7: 19, respectively (SILVA et al., 1998; GARCIA; GANTHER; CARVALHO, 2000). Endo-1,4- $\beta$ -xylanases (E.C.3.2.1.8) catalyzes the hydrolysis of the xylan backbone to xylooligosaccharides. Other accessory enzymes act cooperatively in the degradation of xylan substituents into small fragments such as xylose heterodimers, glucuronic acid, arabinose and xylooligosaccharides (KORMELINK; VORAGEN, 1993; RAHMAN et al., 2003; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; SUEB et al., 2017).

Xylanases have great biotechnological application, which has reflected the researches on optimized forms of production, purification and characterization. This applications are also due to the fact that its main substrate, hemicellulose, is the second most abundant biomass component of the planet after cellulose (NINAWA; KAPOOR; KUHAD, 2008; DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012) being also found as residue in several industries. Xylanases have been extensively used in order to promote the delignification of the pulp cellulose and paper bleaching or paper waste depigmentation (TERRASAN et al., 2013, BORUAH et al., 2016; CHUTANI; SHARMA, 2016), to cooperating in the pre-treatment stage and hydrolysis of sugarcane bagasse (ZIMBARDI et al., 2013; ZAFAR et al., 2016), for ethanol production (THOMAS et al., 2016), as additives in animal feed to promote better absorption of nutrients (NDOU et al., 2015; CHEN; LI; WANG et al., 2016) and in food industries to improve juice clarification, bread quality parameters, improve filtration efficacy in brewing industry and xylooligosaccharides production (JAEKEL et al., 2012; ARAGON et al., 2013; AHMED et al., 2016; WANG et al., 2016; YEGIN, 2017).

Bioprospecting of fungi in extremophile environments has been stimulated by the possibility of finding microorganisms that, adapted to such environments, produce more stable enzymes under extreme conditions of pH, temperature, salinity, among other parameters that represent the reality of many industrial processes in which these enzymes are employed (COLLINS, GERDAY; FELLER, 2005; LITTLECHILD, 2015; DHAKAR; PANDEY, 2016; MOUBASHER et al., 2016).

Fungi are extensively exploited for the production of xylanases, with emphasis on genera *Aspergillus* and *Trichoderma* as the most studied (HERÁNDEZ- DOMÍNGUEZ et al., 2014). These microorganisms generally secrete xylanases into the culture medium, which facilitates their obtaining, avoiding the need for cell lysis. Thermotolerant or halotolerant fungus can be good producers of xylanases thermostable and halostable and has gained highlight in the scientific literature of recent years (TAIBI et al., 2012; ZHU et al., 2012; SINGH; KAPOOR; KUMAR et al., 2012; YEGIN, 2017).

Despite the existence of numerous xylanases described and characterized, the researches with these enzymes are still important due to the relevance of its applications, currently with more use in lignocellulosic materials bioconversion to fermentable sugars and generation of biological fuels, and also by the need to find xylanases with the required industrial parameters of resilience to the process as well as found optimal purification strategies since the low yield in the purification process makes the final product honerous (YEGIN, 2017). These aspects still stimulate the research by the production, purification and characterization of xylanases of new fungal strains, especially thermotolerant, alkalitolerant or halotolerant fungi, in order to better know their biochemical characteristics and application advantages. Our study shows, for the first time, the purification and partial characterization of xylanases from a specie identified as *Aspergillus hortae* isolated from saline lakes of Mato Grosso do Sul, Brazil that presents interesting properties for industrial application.

## 5.3 MATERIALS AND METHODS

### 5.3.1 Fungal identification

A new *Aspergillus hortae* strain was isolated from saline lakes of Pantanal of Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brazil, an interesting region composed of innumerable lakes with varied properties such as salinity and alkalinity. The fungus was deposited in the Environmental Studies Center Collection, CEA/UNESP, Rio Claro, Brazil.

The specie identification was performed by analysis of macro and micro morphological characteristics, followed by the sequencing of molecular markers. The genomic DNA was extracted by cetyltrimethylammonium bromide method according to Rodrigues and co-workers (2009). The amplification regions were the internal transcribed spacer (ITS), ITS5<sub>f</sub> e ITS4<sub>r</sub> (WHITE et al., 1990),  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ t2a<sub>f</sub> e  $\beta$ t2b<sub>r</sub> (GLASS; DONALDSON, 1995) and calmodulin Cmd5<sub>f</sub> and Cmd6<sub>r</sub> (HONG et al., 2005). Polymerase chain reactions (PCR) were

conducted with 25  $\mu\text{L}$  final volume consisted of: 0.2 mM of each dNTP, 10X KCl buffer, 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of BSA, 1.5 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer and 1U of Taq polymerase enzyme (Promega). PCR conditions varied according to each marker, namely: ITS: 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 2 min (WHITE et al., 1990), Cmd: 94 °C for 10 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 2 min (SERRA et al., 2006) and  $\beta$ -tubulin: 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72°C for 1 min (SAMSON et al., 2004).

The reaction products were electrophoresed on 1% agarose gel and visualized under UV after staining with GelRed™ (Biotium). Once the amplicons were confirmed, they were purified with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). The purified amplicons were quantitated in NanoDrop® (Thermo Scientific), thereafter, 20  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  of DNA were prepared for sequencing using BigDye Terminator® v. 3.1 Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The products were sequenced in ABI 3500 (Life Technologies). Both forward and reverse sequences were generated and compiled into contigs using BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). The identification was made by search for homologous sequences to the contigs obtained in International Gene Bank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), using the MegaBLAST application (ZHANG et al., 2000; MORGULIS et al., 2008) and CBS ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)).

### 5.3.2 Culture conditions and filtrate obtention

In our laboratory, the fungus was maintained by Castellani Method on Vogel solid medium slants with 1.5% (w/v) wheat bran, at 4 °C and cultured periodically. In order to conidia production, the cultures were inoculated in the same medium and incubated during 7 days at 40°C. After that, conidia were harvested on sterile water and suspension of  $3\cdot 10^7$  conidia per milliliter were inoculated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL liquid medium. The culture parameters were previously optimized and the best conditions for xylanase production was defined using corn cobs as substrate (1% w/v) with Vogel's liquid medium at pH 4.0 and maintained in static conditions at 35 °C, for 11 days. The crude enzyme filtrate free of mycelium was obtained by vacuum filtration in an ice bath and frozen prior to use.

### 5.3.3 Enzyme assay

The xylanase activity was determined from the crude filtrate or purified enzyme by the quantification of reducing sugars using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (MILLER, 1959). Unless otherwise quoted, the reaction was conducted at 50 °C for 0 min (blank), 5 min and 10 min, using beechwood xylan 1% (w/v) as substrate (Sigma, USA; xylose residues  $\geq 90\%$ ) prepared with 0.05 M imidazole buffer solution pH 6.5. The reaction was stopped with 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) by addition of 250  $\mu\text{L}$  of DNS reagent and boiled for 5 min following the addition of 2.5 mL of distilled water. The absorbance of the solutions was measured at 540 nm against the blank. The quantifying activity was carried out from a standard curve of xylose from 0 to 1,000  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Enzyme activity was expressed in  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  and one unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme capable to release 1  $\mu\text{mol}$  of reducing sugar at assay conditions per min. All the experiments were done in triplicate and the results are expressed as mean and respective standard deviation. Specific activities were expressed in U per mg of protein and refers to the relation between enzyme activity and protein content.

### 5.3.4 Protein and carbohydrate determination

The amount of protein in samples was determined by Lowry method (LOWRY, 1951) using bovine serum albumin as the standard. The protein contained in the samples of chromatographic steps were monitored for reading absorbance at 280 nm. Total carbohydrate was determined by the phenol sulphuric acid method (DUBOIS, 1956), with glucose as standard.

### 5.3.5 Purification

#### 5.3.5.1 General procedures

In each purification step the samples were assayed for xylanase activity, specific activity and protein content in order to express the data and analyze the purification factor and yield of each purification step. All steps were carried out at 4 °C and 3.0 mL fractions were collected. The dialyze procedures were performed for 8 h, with buffer changes each 2 h, in order to eliminate small molecules or obtain a buffered solution.

### 5.3.5.2 Chromatography steps

The concentrated crude enzyme filtrate (200 mL) was dialyzed against 0.05 M sodium acetate buffer pH 4.5. The dialyzed sample was applied to a cation exchanger CM-Sephadex C-50 column (2.8 x 19.0 cm) equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer, pH 4.5 at 54 mL/h flow rate. The elution procedure was performed by a linear NaCl gradient (0-1 M) in the same buffer and flow rate.

The first and the second eluted peaks showing considerable xylanase activity were separately pooled, dialyzed against ammonium acetate buffer pH 4.5, lyophilized, re-dissolved in a small volume (2.0 mL and 3.5 mL, respectively) of the same buffer and applied to size exclusion chromatography on a Sephadex G-75 (1.8 × 60.0 cm) column flowing at 16.2 mL/h.

The non-retained fractions on CM-Sephadex C-50 column were pooled, dialyzed against 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 and submitted to anion exchange chromatography on a DEAE Sephadex A-50 column (1.1 × 17.0 cm), previously equilibrated with the same dialysis buffer at 50 mL/h flow rate. The elution with NaCl gradient (0-2 M) was on the same buffer and flow rate. The eluted fractions were pooled and dialyzed against ammonium acetate buffer pH 5.5, lyophilized, re-dissolved in a small volume (2.0 mL) of the same buffer and applied to size exclusion chromatography on the same conditions already mentioned. Aliquots representative of each purified enzyme were submitted to electrophoresis (SDS-PAGE).

## 5.3.6 Biochemical characterization of purified xylanases

### 5.3.6.1 Molecular mass determination

To determine the xylanase molecular mass through gel filtration chromatography, the column was calibrated using blue dextran for the void volume determination and ribonuclease (15.4 kDa), chymotrypsin (25.0 kDa), ovalbumin (43.0 kDa) and bovine serum albumin (67.0 kDa) (Sigma, USA) as standards. The molecular weight of xylanase was estimated from a regression curve ( $R^2 = 0.993$ ), by plotting log of the molecular weights of the standards against the ratio between elution volumes of the standards and the void volume of the column.

### 5.3.6.2 Electrophoresis

SDS-PAGE was performed in 8-18% (w/v) gradient gel using a Mini-PROTEAN® Electrophoresis System (Bio-Rad, USA). Resolved protein bands were visualized after staining with 0.1% (w/v) coomassie brilliant blue R-250 dissolved in methanol, acetic acid, and distilled

water (4:1:5; v/v/v). The standard proteins (Sigma, USA) phosphorylase B (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), and  $\alpha$ -lactalbumin (14.2 kDa) were used to determine the molecular mass through plotting the standard curve log of molecular mass against relative mobility of the proteins.

#### *5.3.6.3 Optima pH and temperature, thermal and pH stability*

Optimum pH values were evaluated by assaying xylanase activity at 55 °C (Xyl I and Xyl II) and 65°C (Xyl III) in pH from 4.0 to 10.0 with the following buffers: sodium acetate (4.0 to 5.5), imidazole (6.0 and 6.5), Tris-HCl (7.0 to 8.5), Sorensen (9.0 and 10.0). Optimum temperatures were determined by assaying xylanase activity from 20 °C to 70 °C.

The pH stability was determined as residual activity after incubation the purified enzymes for 24 h at 4 °C in 2:1 (v/v) solution with the following buffers: McIlvaine buffer (pH 3.0 to 7.5); Tris-HCl (8.0 and 8.5) and glycine-NaOH (pH 9.0 to 10.0). Thermal stability was performed by assaying the remaining activity after incubation of each purified enzyme without substrate at different temperatures from 30 to 70 °C for 300 min withdrawing aliquots on different periods. After incubation, the samples for both stability parameters, pH and temperature, were assayed by DNS in imidazole buffer, pH 6.5 and at 55 °C.

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

Effect of ions and substances on Xyl II and Xyl III was evaluated by assaying xylanase activity in the optimum conditions with a variety of compounds dissolved in reaction medium, as glycerol, zinc, magnesium and manganese sulfates, barium, calcium, cobalt, mercury, ammonium and sodium chlorides, sodium dodecyl sulfate (SDS), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Tween 20 and 80, 1,4-dithiothreitol (DTT), lead acetate,  $\beta$  mercaptoethanol, tetrasodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA). The final concentrations of additives in the reaction mixture was 2 mM and 10 mM. The results were compared with the control without the additives and showed in terms of relative activity (%).

#### *5.3.6.5 Effect of NaCl on xylanase activity and stability*

The enzymes activities were evaluated regarding NaCl concentration from 0.5 M to 4.0 M, assaying xylanases activities on pH 6.5 and at 55 °C. The xylases stabilities were

evaluated regarding NaCl at 2 M and 4 M; after incubation for 3 h at 25 °C, the xylanases were assayed on pH 6.5 and at 55 °C and the data were expressed as relative activity.

#### *5.3.6.6 Substrate specificity and kinetic parameters*

The specificity of Xyl I, Xyl II and Xyl III for commercial substrates as beechwood xylan, birchwood xylan, oat spelt xylan and carboxymethyl cellulose (CMC) was verified at a substrate concentration of 1.0% (w/v) in 50 mM imidazole buffer. The reaction was performed at pH 6.5 and 55 °C, the xylanase activity was measured by DNS and expressed as relative activity.

The kinetic parameters were evaluated by increasing the concentration of the substrates beechwood xylan and oat spelt xylan from 1.0 to 30 mg.mL<sup>-1</sup> and measured Xyl I, Xyl II and Xyl III activities on their optimum conditions.  $K_m$  and  $V_{max}$  were determined through GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) using nonlinear regression analysis.

#### *5.3.6.7 Hydrolysis products*

The hydrolysis products of purified xylanases on 1% (w/v) of oat spelt xylan were investigated by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel G-60 plates (10×15 cm), as described by Fontana and co-workers (1988) using as mobile phase ethyl acetate/acetic acid/formic acid/distilled water (9:3:1:4; v/v/v/v) and a revelation solution of 2% (w/v) orcinol in sulfuric acid/methanol (1:9, v/v). The samples were incubated in imidazole buffer pH 6.5, at 55 °C. After each incubation period, 10 min, 30 min, 2 h and 24 h, aliquots were withdrawn, the enzyme activity was stopped by heating, centrifuged, freezing and the samples were applied on TLC plates. The products of the enzymatic hydrolysis were evaluated by relative mobility to xylose (FONTANA et al., 1988).

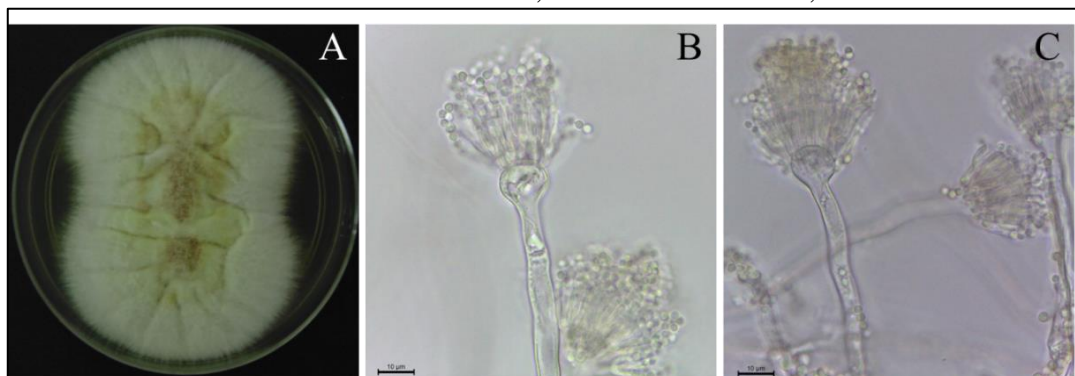
## **5.4 RESULTS AND DISCUSSION**

### **5.4.1 Fungal identification and phylogenetic analysis**

Identification of the fungus was carried out on light microscopy, based on the colony morphologies and structural characteristics as showed in Fig. 01, presenting columnar conidial

heads or conidiophores with brownish tonality with vesicle and phialides, typical of *Aspergillus* section *Terrei* species (SAMSON; PETERSON; FRISVAD; VARGA, 2011).

**Figure 01** - Macro and micro morphological characteristics of *Aspergillus hortae* isolated from saline lakes of Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brazil.

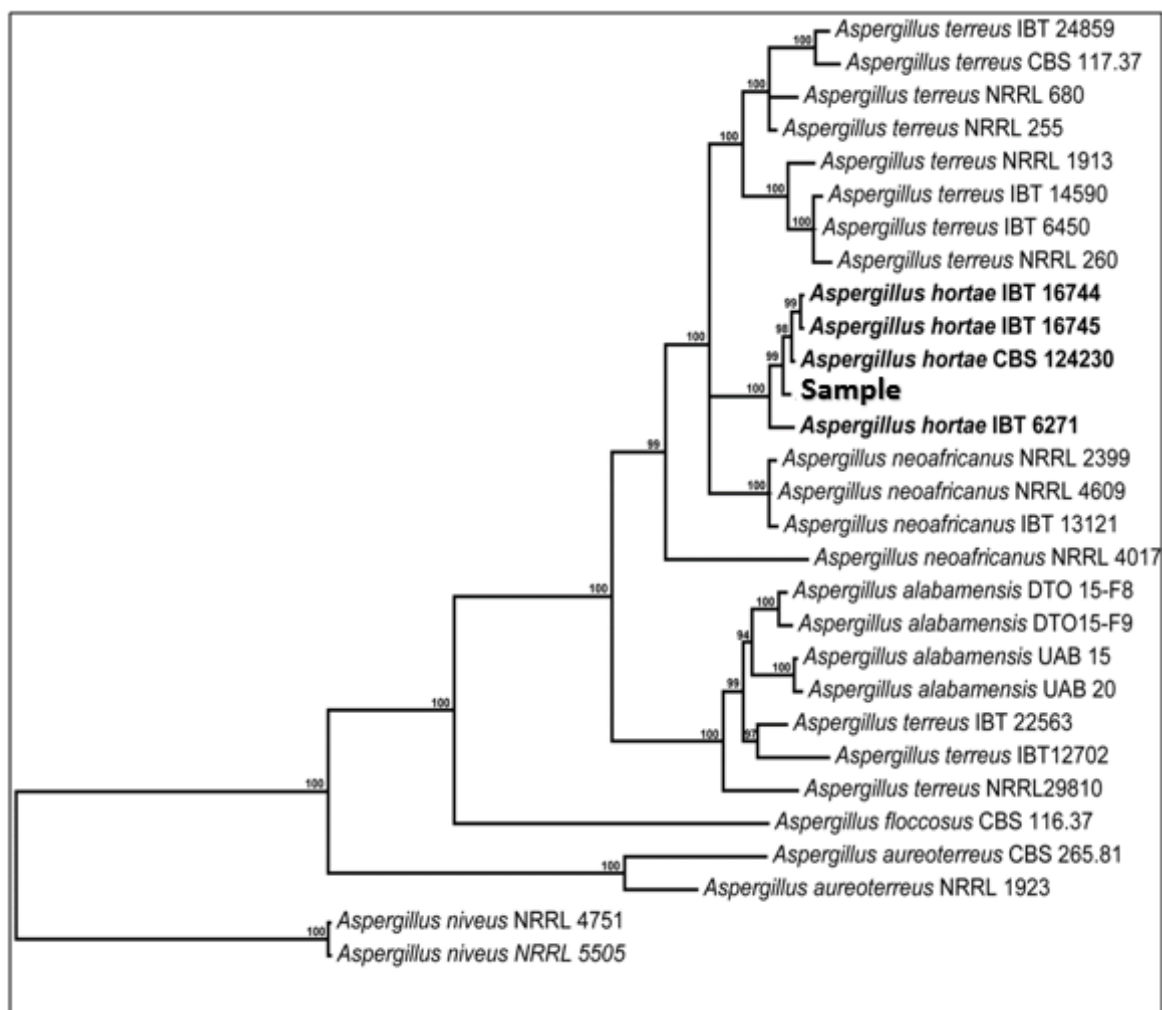


A: characteristics of the colony cultured in PDA at 25 °C for five days in the dark. B-C: conidiophores presenting vesicle and phialid. Scale bars = 10  $\mu$ m.

For phylogenetic analysis, the  $\beta$ -tubulin, ITS and Cmd contigs were compared with the homologous sequences generated by Samson and co-workers (2011) deposited in GenBank. After retrieving the sequences from the database (Supplementary material 01), the final dataset included 28 partial  $\beta$ -tubulin, ITS and Cmd sequences (526 bp, 484 bp and 576 bp, respectively). Alignments were performed separately for each marker using MAFFT v.7 (KATO; STANDLEY, 2013).

The alignments of  $\beta$ -tubulin, ITS and Cmd were concatenated with Winclada v.1.00.08 (NIXON, 2002) and the final file presented a total of 1586 bp. To reconstruct the phylogenetic tree, Bayesian analysis in MrBayes v.3.2.2 (RONQUIST et al., 2012) was used. The nucleotide substitution model HKY +I +G was selected in jModelTest 2 (DARRIBA et al., 2012) for  $\beta$ -tubulin, ITS and Cmd, using the Akaike information criterion with 95% confidence interval. An analysis with a Markov Chain Monte Carlo sampling (MCMC) of 100,000 generations was performed, which was sufficient to reach values of standard deviation of division frequencies below 0.01. Finally, the first 25% of the MCMC generations were discarded as burn-in. Two species of *Aspergillus* (*Aspergillus niveus* NRRL 4751 and *Aspergillus niveus* NRRL 5505) were selected as external group. The final tree (Fig. 02) was edited in FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems) and showed the sample grouped with three *Aspergillus hortae* strains with 99% confidence.

**Figure 02** - Phylogenetic tree of *Aspergillus* species and the fungus under study denoted in the bold clade.



The tree was generated from Bayesian analysis of three different markers:  $\beta$ -tubulin, ITS and Cmd. Sequences of other species of *Aspergillus* were used as external group. Access numbers in crop collections and accession numbers on GenBank follow the names of the *Aspergillus* species.

#### 5.4.2 Purification of *Aspergillus hortae* xylanases

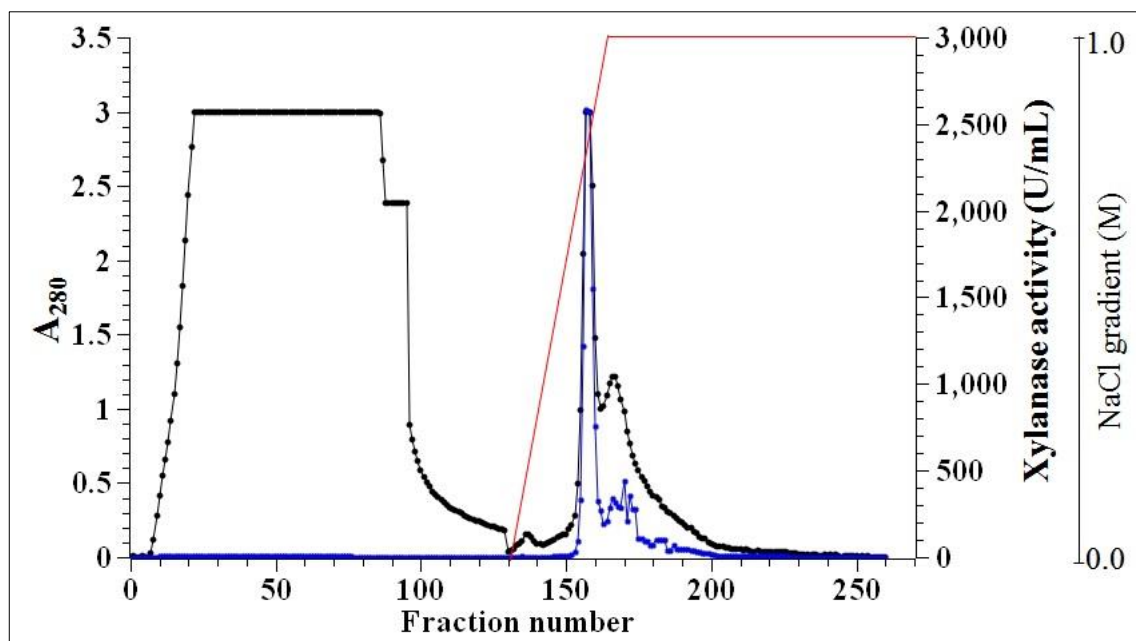
Three xylanases (Xyl I, Xyl II and Xyl III) were purified from the filtrate of *A. hortae*. Multiple xylanases in microorganisms are relatively common and seems involved in more efficient degradation of the xylan and mainly controlled by the transcript level (LIAO et al., 2015; MOREIRA; FILHO, 2016).

A summary of chromatographic procedures is presented in Table 01. Xyl I corresponding to the not retained peak in CM Sephadex C-50 chromatography (Fig. 03). It was pooled, applied to an anion exchanger DEAE Sephadex A-50 column (Fig. 04) and thereafter

**Table 01** - Purification steps of xylanases from *A. hortae*

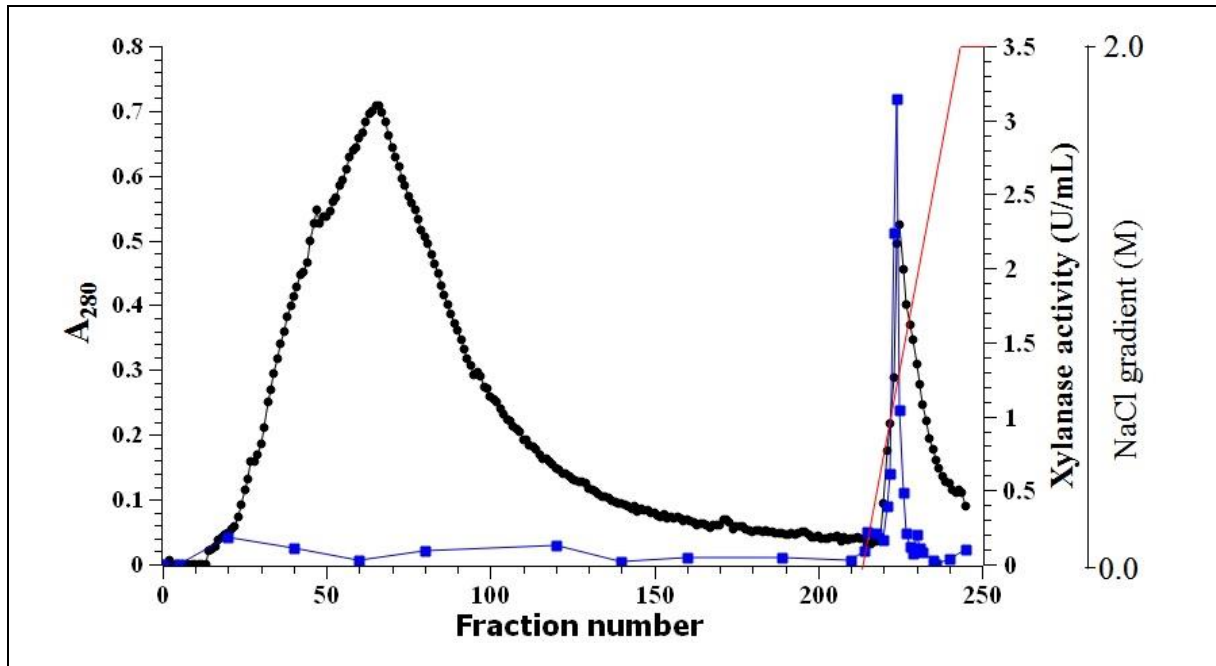
Purification steps		Total Activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Crude filtrate		71424.0	1759.8	40.6	100.0	1.0
Xyl I	CM Sephadex C-50*	5290.9	453.6	11.6	7.4	0.3
	DEAE Sephadex A-50	1032.8	12.1	85.4	1.4	2.1
	Sephadex G-75	492.0	1.5	328.0	0.7	8.1
Xyl II	CM Sephadex C-50*	29225.8	39.9	732.5	40.9	18.0
	Sephadex G-75	19520.3	14.7	1327.9	27.3	32.7
Xyl III	CM Sephadex C-50*	12509.5	198.1	63.1	17.5	1.6
	Sephadex G-75	3185.7	6.7	475.5	4.5	11.7

Same chromatographic step (\*)

**Figure 03** - Elution profile of *A. hortae* xylanases from CM Sephadex C-50 column

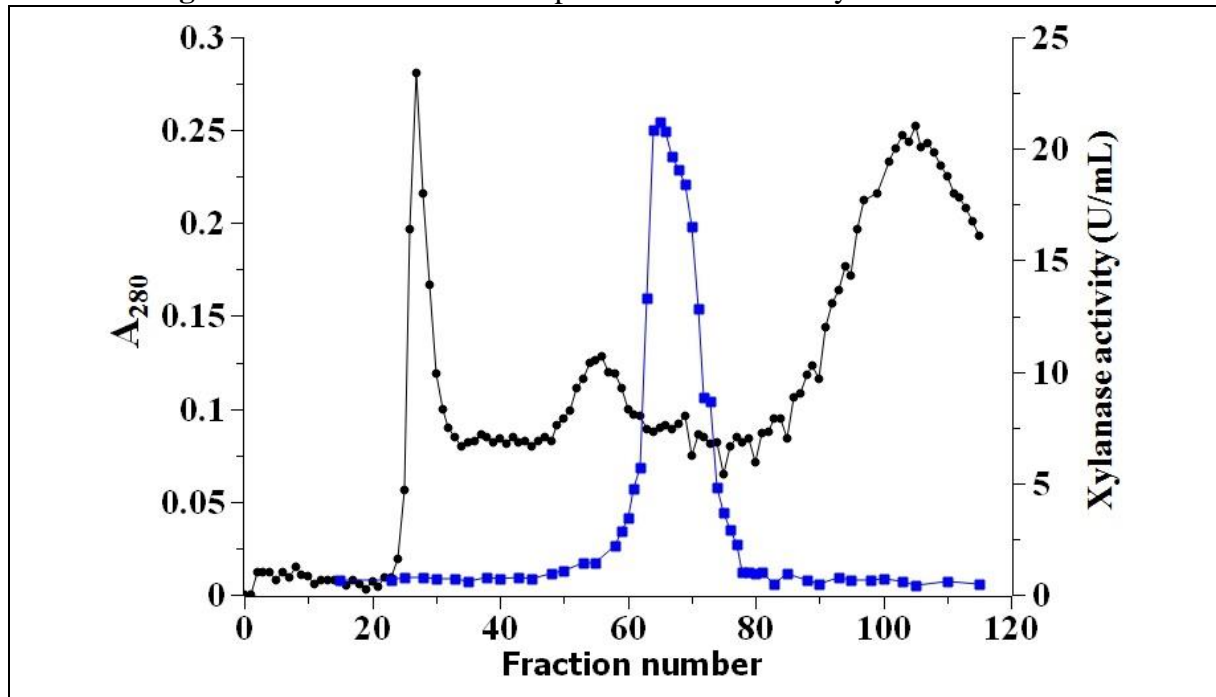
CM Sephadex C-50 column equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer pH 4.5. The flow rate and fraction size were 54 mL/h and 3.0 mL, respectively. (●) A<sub>280</sub>, (■) xylanase activity, (-) saline gradient 0-1M and pooled fractions: 09 to 80 (Xyl I), 155 to 160 (Xyl II) and 165 to 195 (Xyl III).

**Figure 04** - Elution profile of *A. hortae* Xyl I xylanase from DEAE Sephadex A-50 column chromatography



DEAE Sephadex A-50 column equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer pH 5.5. The flow rate and fraction size were 54 mL/h and 3.0 mL, respectively. (●)  $A_{280}$ , (■) xylanase activity, (-) saline gradient 0-2 M and pooled fractions: 221 to 226.

**Figure 05** - Gel filtration on Sephadex G-75 of the Xyl I from *A. hortae*

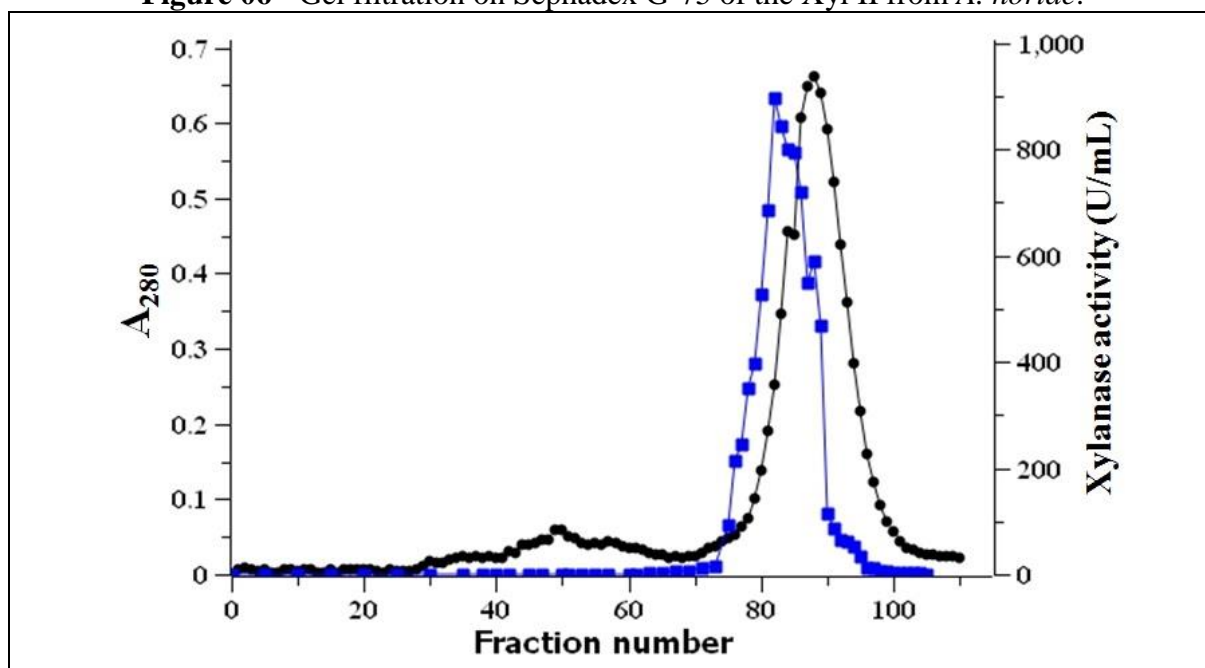


The column was equilibrated and eluted with 50 mM ammonium acetate buffer pH 5.5. The flow rate and fraction size were 15.6 mL/h and 3.0 mL, respectively. (●)  $A_{280}$ , (■) xylanase activity and pooled fractions: 58 to 77.

subjected to a molecular exclusion chromatography on Sephadex G-75 (Fig. 05). After that, Xyl I presented a purification factor of 8.4 and a yield of 0.7%. The low yield presented by Xyl I can be explained by its strongly adherence to the DEAE Sephadex, not being completely eluted in this step. This fact was observed at the end of the chromatography, after column disassembly to verification of xylanase activity in the DEAE- Sephadex. For this reason, in one of the DEAE chromatographies tests performed, a 2 M NaCl gradient was used, but it not caused changes in the chromatographic profile compared with 0-1M NaCl gradient tested (data not shown).

The two peaks in CM Sephadex C-50 chromatography (Fig. 03) corresponding to the eluted fractions with xylanase activity, the highest and the smaller peak were later denoted as Xyl II and Xyl III, respectively. These fractions were pooled separately and applied each one on Sephadex G-75 column (Fig. 06 and Fig. 07). In the final process, Xyl II represented the most abundant xylanase produced by *A. hortae*, with a yield of 27.3% and was purified 32.7 fold and Xyl III had a purification factor of 11 fold and a yield of 4.5%. Several works purified multiple xylanases and also found xylanases in different proportions. Commonly, the type less abundant is produced in small quantities and possibly it is responsible for the hydrolysis of less frequent bonds in the substrate (MOREIRA et al., 2013).

**Figure 06** - Gel filtration on Sephadex G-75 of the Xyl II from *A. hortae*.

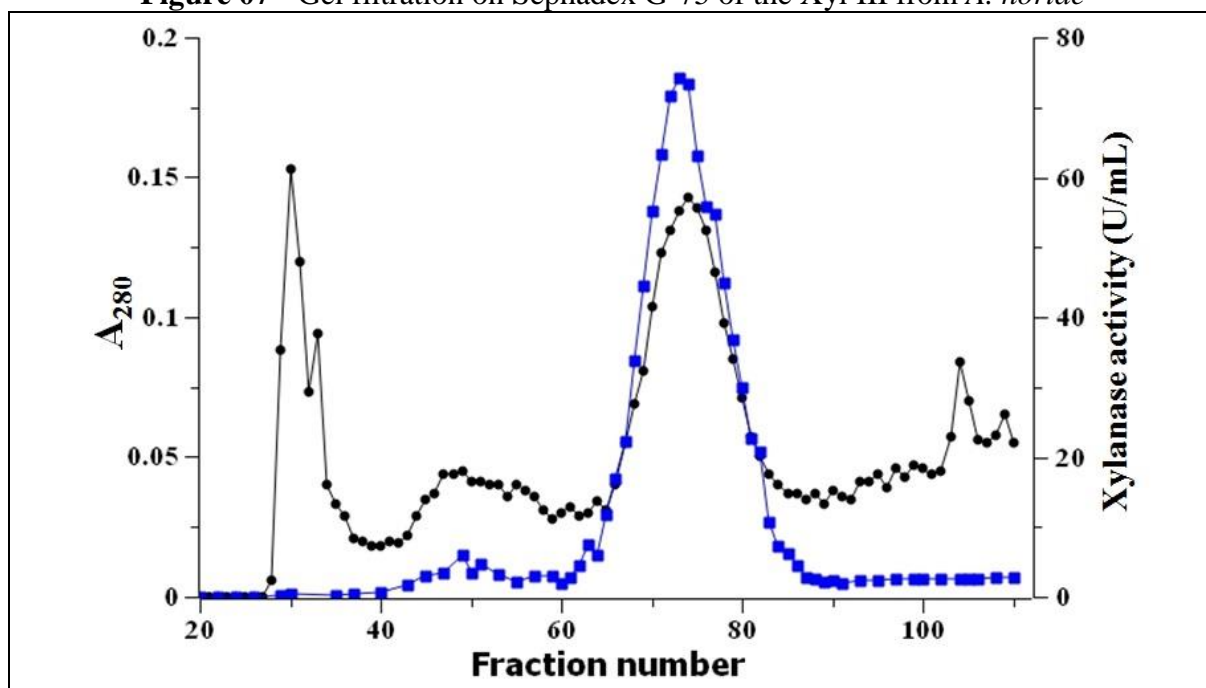


The column was equilibrated and eluted with 50 mM ammonium acetate buffer pH 5.5. The flow rate and fraction size were 16.2 mL/h and 3.0 mL, respectively. (●)  $A_{280}$ , (■) xylanase activity and pooled fractions: 786 to 101.

The yield determine the sucess and applicability of the purification methodology for large-scale use (YEGIN, 2017). The number of steps required to purify an enzyme usually implies in the final recovery percentage. There are few studies that succeeded purify in a single step (SORGATTO et al., 2012; KOCABAS; GÜDER; ÖZBEN, 2015; YEGIN, 2017). A purified xylanase from *A. caespitosus* presented sucess in recovery showed 61.7%, favored results by achieving purification in a single step, just by Sephadex G-100 (SANDRIM et al., 2005). Most of the works needed two or more steps to purify xylanases as ionic exchange and molecular exclusion chromatographies and few are those which had a yield higher than 50% as reported by Moreira and co-workers (2013) that showed a total yield of 80% and by Sorgato (2012) that obtained a yield of 67%.

Considering the above, our results seems reasonable with a total yield of 32.5% being higher than others found in the literature as those displayed by purified xylanases from *Aspergillus niger*: 38.9% (PAL; KHANUM, 2011), 20.7% (KRISANA et al., 2005) and 16.0% (HMIDA et al., 2012) or by xylanases purified from other *Aspergillus* species as *A. oryzae* with a yield of 8.2% (HE et al., 2015), *A. ochraceus*, 22.0% (MICHELIN et al., 2014), *A. fumigatus*, 13.9% (YANG et al., 2015) and 3.4% (DESHMUKH et al., 2016), *A. flavus*, 22.3% (BHUSHAN et al., 2015) and *A. terreus*, 0.6% (CHIDI et al., 2008).

**Figure 07** - Gel filtration on Sephadex G-75 of the Xyl III from *A. hortae*



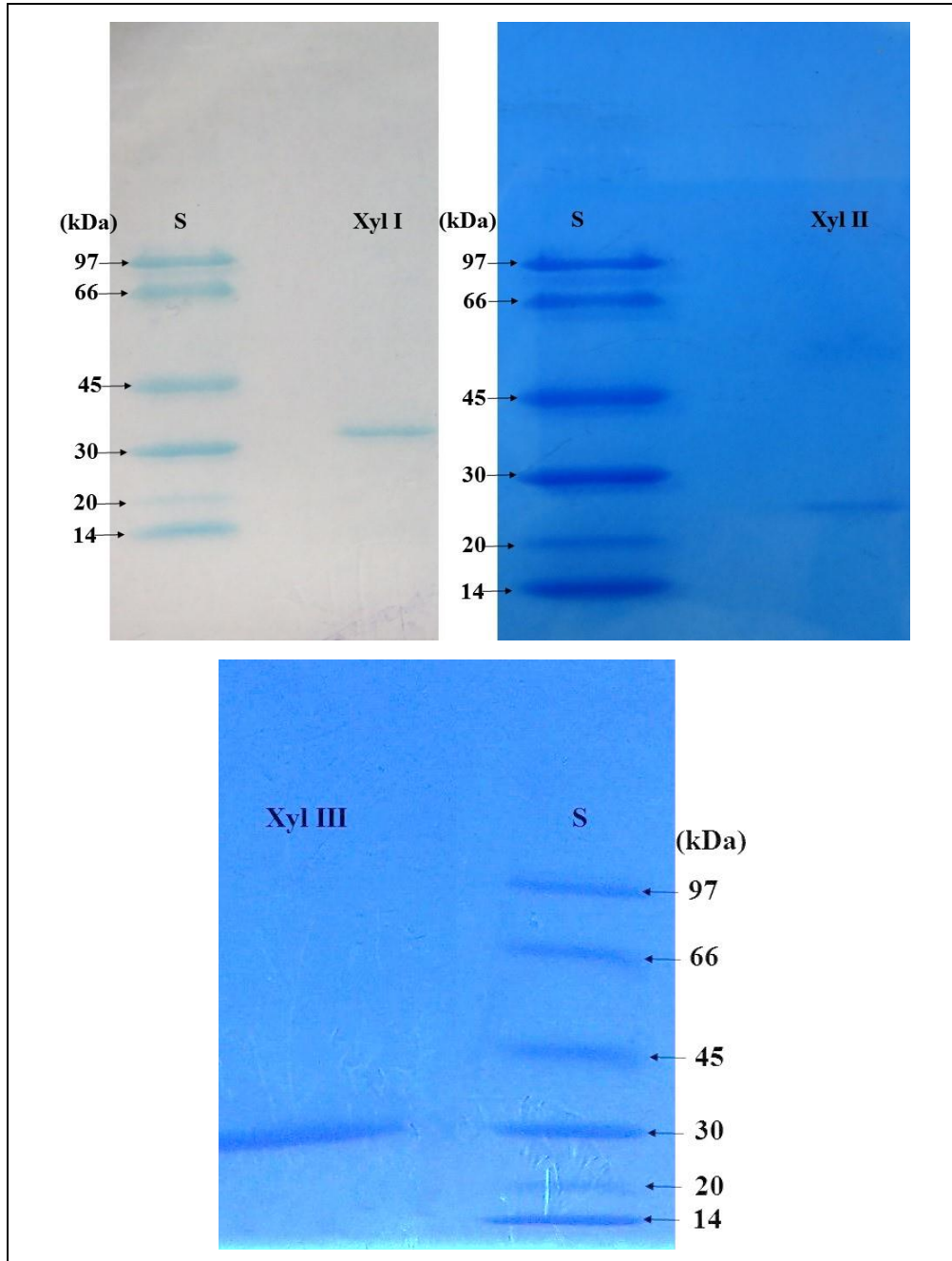
The column was equilibrated and eluted with 50 mM sodium acetate buffer pH 5.5. The flow rate and fraction size were 15.6 mL/h and 3.0 mL, respectively. (●) A<sub>280</sub>, (■) xylanase activity and pooled fractions: 62 to 86.

### 5.4.3 Physico-chemical characterization of xylanases from *A. hortae*

#### 5.4.3.1 Molecular mass

The SDS-PAGE allowed the visualization of a single band for Xyl I, Xyl II and Xyl III after the purification steps (Fig. 08) and the molecular weight estimation according to their

**Figure 08** - SDS PAGE of purified xylanases from *Aspergillus hortae*.



Xyl I, Xyl II and Xyl III are the purified xylanases from *A. hortae*. S: standard proteins phosphorylase B (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), and  $\alpha$ -lactalbumin (14.2 kDa).

apparent mobility of 33, 25 and 29 kDa, respectively. The mass by molecular exclusion chromatography was 26 kDa for Xyl I, 20 kDa for Xyl II and 28 kDa for Xyl III. In general, xylanases from *Aspergillus* presents molecular mass between 20 and 30 kDa, however xylanases with 32 kDa and 35 kDa also were described (FIALHO et al., 2004; SORGATO, et al., 2012; ELGHARBI, et al., 2015; DESHMIKER et al., 2016; MOREIRA et al., 2016). Michelin and co-workers (2014) purified three xylanases from *A. ochraceus*, with molecular mass of 25 kDa, 28 kDa and 32 kDa similar to those found in our study. The small difference between the molecular masses of the electrophoresis and gel filtration analyzes may indicate glycosylation, as confirmed by the carbohydrate analysis that showed 15%, 5% and 8% of carbohydrate for Xyl I, Xyl II and Xyl III, respectively. This difference may also be related to the protein conformation or tertiary structure that may interfere with its elution in a gel filtration chromatography (SCOPES, 1994).

#### 5.4.3.2 Effect of pH and temperature

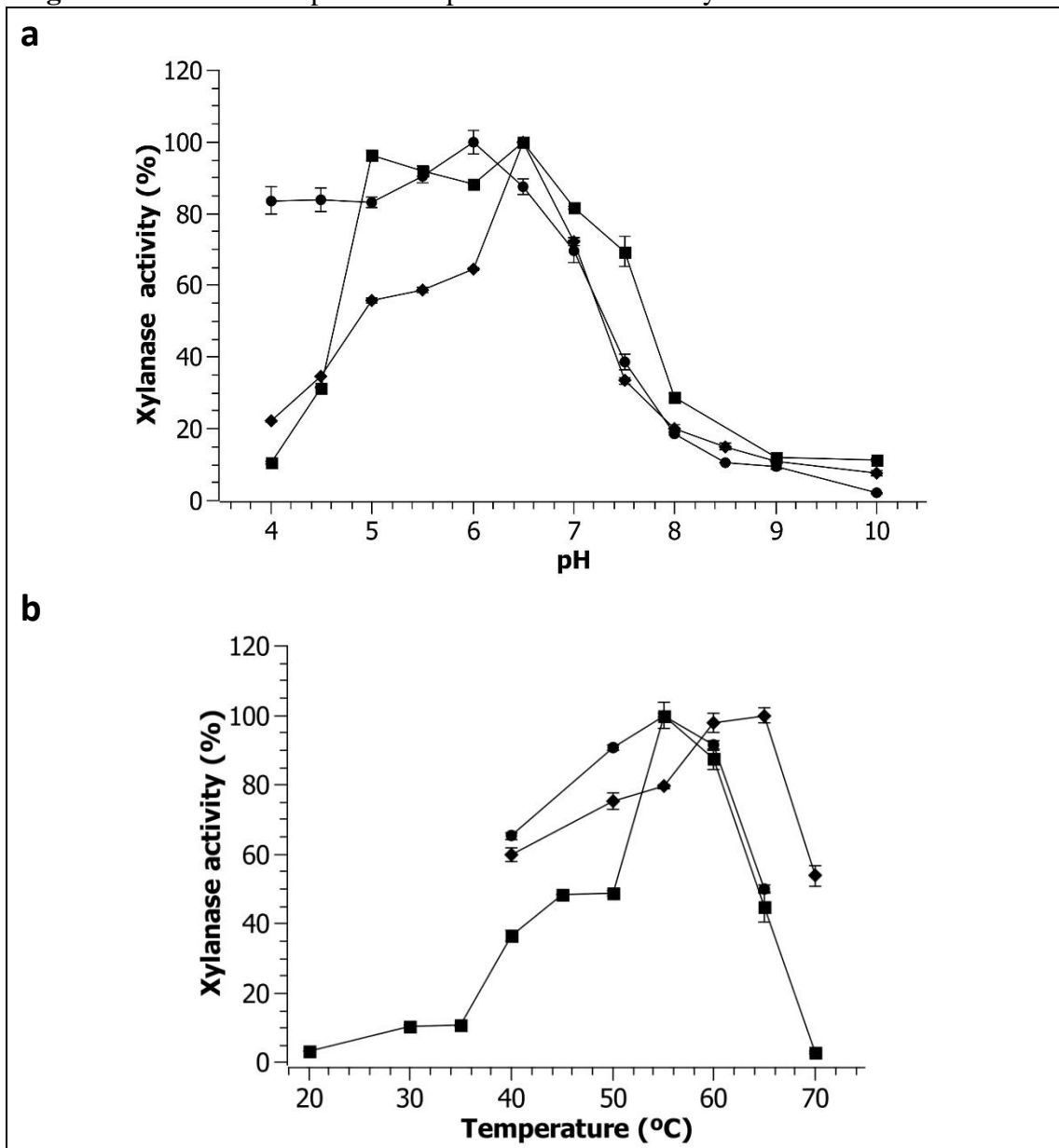
The optimal pH exhibited for both purified xylanases Xyl II and Xyl III was 6.5 and for Xyl I was 6.0. Most of the xylanases showed optimum pH between 5.0-5.5 and there are few reports of xylanases with optimal pH above 6.0. Carmona et al. (1998), Bankeere et al. (2014), Chutani et al. (2015) and Terrasan et al. (2016) found pH 6.0 as optimal for xylanase from *Aspergillus vesicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma longibrachiatum* and *Penicillium janczewskii*, respectively. A review showed some properties of purified xylanases from *Aspergillus* sp. and for 26 xylanases analyzed, only 4 showed an optimum pH of 6.5 or greater, that were xylanases from *A. giganteus*, *A. nidulans* and *A. sydowii* (ABDEL-SATER; EL-SAID, 2001).

Optimum activity for Xyl I and Xyl II was observed at 55 °C and Xyl III seems present an thermostable profile, with an optimum activity at 65 °C and retained 55% of the activity at 70 °C (Fig. 09b). There is a great variation on the optimum temperature between *Aspergillus* xylanases, most of them between 45 °C and 60 °C and the majority at 50 °C. Optimum temperatura above 60 °C is more rare to be found in xylanases from *Aspergillus*. Xylanases with optimum temperature above 60 °C were found for xylanases from *Aspergillus oryzae* (HE et al., 2015).

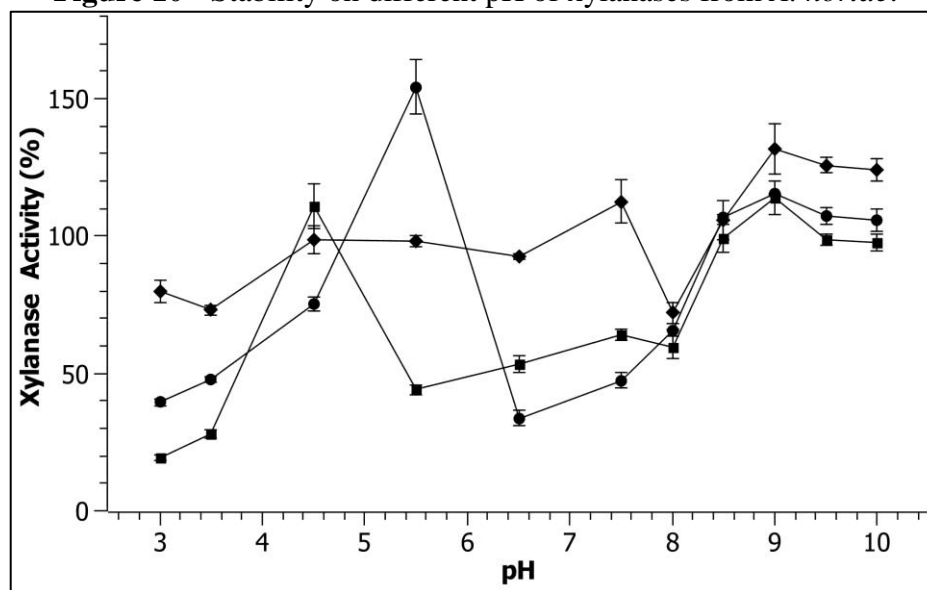
Regarding the pH stability, the enzymes presented heterogeneous profile after incubation for 24 h at 4 °C (Fig. 10). Xyl I showed stability more than 50% at pH 4.5, 5.5 and 8.0 and above pH 8.0 the enzyme showed stable until pH 10.0. Xyl II and Xyl III also were

stable from pH 8.0 to 10. Xyl III was stable in more than 70% in the pH range from 3.0 to 10.0. The thermostability of the purified xylanases are presented in Fig. 11. Xyl I retains more than 50% of the activity at 55 °C for up to 20 min and loses around 80% of the activity in the first 2.5 minutes when incubated at 65 °C. Xyl II retained more than 50% of activity at 55 °C and 14% at 65°C until 20 min. Xyl III remains stable in 77% when incubated at 55 °C for 3 h and retained 38% of the enzymatic activity at 65 °C for 10 min.

**Figure 09** - Influence of pH and temperature on the activity of xylanases from *A. hortae*.



Influence of (a) pH and (b) temperature on the activity of Xyl I (●), Xyl II (■) and Xyl III (◆) from *A. hortae*. Assay conditions: (a) 1% (w/v) birchwood xylan in McIlvaine buffer pH 3.0-8.0, Tris HCl pH 8.5-9.0, Glycine NaOH pH 9.0-10.0, at 50°C. (b) 1% (w/v) birchwood xylan in 0.05 M imidazole buffer pH 6.5

**Figure 10** - Stability on different pH of xylanases from *A. hortae*.

pH stability of Xyl I (●), Xyl II (■) and Xyl III (◆) from *A. hortae*. Activities were assayed with 1% (w/v) birchwood xylan in 0.05 M imidazole buffer pH 6.5 at 55°C.

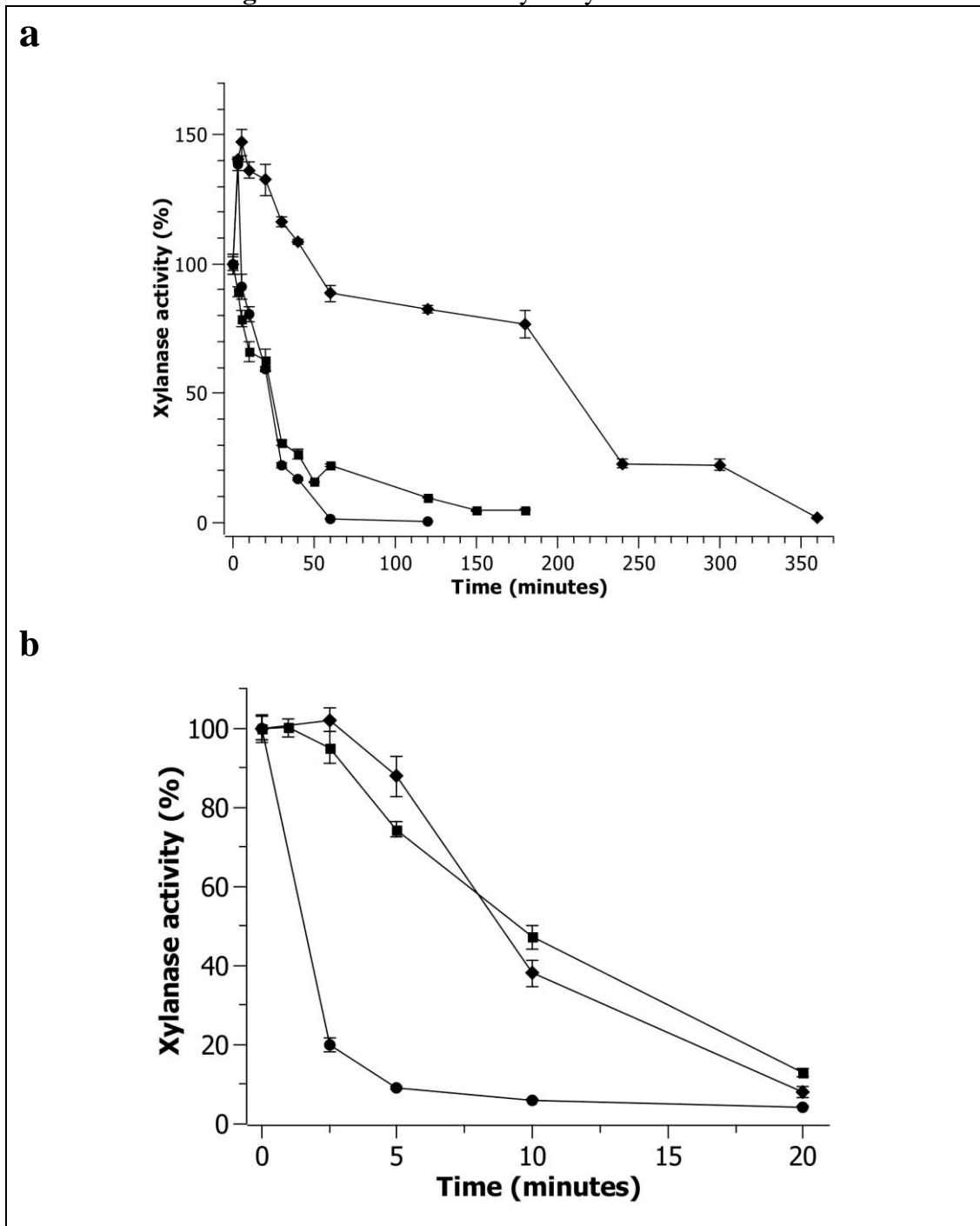
#### 5.4.3.3 Substrate specificity and kinetic parameters

Xylanase was assayed against different substrates (1%; w/v): birchwood, beechwood, oat spelts xylans and carboxymethyl cellulose (CMC). As shown in Table 02, the three enzymes showed no activity on CMC, suggesting that they do not hydrolyze the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glycopyranose from cellulose, hydrolyzing exclusively xylans substrates. Xyl I and Xyl III activities were respectively, 13.6% and 16.2% greater for oat spelts xylan, an arabinoxylan, when compared with beechwood xylan, indicating the preference by branched xylan. On the other hand, Xyl II presented activity 8.6% higher for beechwood xylan than oat spelts xylan.

**Table 02** - Substrate specificity of xylanases from *A. hortae*.

Substrate	Xyl I (U.mL <sup>-1</sup> )	Xyl II (U.mL <sup>-1</sup> )	Xyl III (U.mL <sup>-1</sup> )
BEWX	8.96±0.10	38.96±0.10	40.85±2.18
OSX	10.37±0.37	35.60±0.00	48.73±1.65
BWX	7.47±0.15	33.59±0.90	31.49±2.97
CMC	0	0	0

BEWX: beechwood xylan; BWX: birchwood xylan; OSX: oat spelts xylan; CMC: carboximetilcelulose. Activities were assayed with 1% (w/v) of xylan substrates in 0.05 M imidazole buffer pH 6.5 and at 55°C.

**Figure 11** - Thermostability of xylanases from *A. hortae*.

(a) Thermostability at 55 °C of Xyl I (●), Xyl II (■) and Xyl III (◆) from *A. hortae*. (b) Thermostability at 65 °C of Xyl I, Xyl II and Xyl from *A. hortae*. Activities were assayed with 1% (w/v) birchwood xylan in 0.05 M imidazole buffer pH 6.5.

The main factors that influence the hydrolysis rate of xylan are the chain length and degree of substitution (GONÇALVES et al., 2012). Xylan from birchwood is composed of more than 90% xylose residues in the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) type bond. Beechwood xylan exhibits more than 90% xylose residues, and also arabinose in its few branches. The composition of oat spelts xylan is

more varied. It shows approximately 70% xylose, 15% glucose and 10% arabinose, being the most branched of these xylans (Sigma-Aldrich).

The Table 03 shows the kinetic parameters of the purified xylanases,  $k_m$  and  $V_{max}$  were respectively  $2.194 \text{ mg.mL}^{-1}$  and  $0.4537 \text{ U.mL}^{-1}$  for Xyl I in xylan from oat spelts. In beechwood xylan, these enzyme were less specific showing  $k_m$  of  $5.336 \text{ mL}^{-1}$  and  $V_{max}$  of  $0.1924 \text{ mg/mL}$ . However, Xyl II and Xyl III, were more specific in beechwood, with a  $k_m$  and  $V_{max}$  of  $1.273 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $308.8 \text{ U/mg}$  and  $1.642 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $22.22 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectively than oat spelt xylan in which Xyl II exhibited  $k_m$  of  $2.281 \text{ U.mL}^{-1}$  and  $V_{max}$  of  $546 \text{ mg.mL}^{-1}$  and Xyl III presented  $k_m$  of  $16.08 \text{ mg.mL}^{-1}$  and  $V_{max}$  of  $79.7 \text{ U.mL}^{-1}$ .

**Table 03** - Kinect parameters of xylanases from *A. hortae*

Substrate	Kinect parameters	Xyl I	Xyl II	Xyl III
BWX	$K_m \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)}$	$5.336 \pm 0.20$	$1.273 \pm 0.10$	$1.642 \pm 0.11$
OSX		$2.194 \pm 0.08$	$2.281 \pm 0.07$	$16.08 \pm 1.20$
BWX	$V_{max} \text{ (U.mL}^{-1}\text{)}$	$0.1924 \pm 0.015$	$308.8 \pm 12.20$	$22.22 \pm 1.70$
OSX		$0.4537 \pm 0.028$	$546.0 \pm 10.10$	$79.7 \pm 15.90$

BWX: beechwood xylan; OSX: oat spelts xylan. Activities were assayed with in  $0.05 \text{ M}$  imidazole buffer pH 6.5 and at  $55^\circ\text{C}$ .

#### 5.4.3.4 Effect of metallic ions and substances

The effect of metallic ions and substances on Xyl II and Xyl III activities are presented in Table 04. Several ions and substances stimulated Xyl II at  $2 \text{ mM}$ , especially  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$  and glycerol which showed approximately twice the activity compared to the control. These ions also stimulated Xyl III, except  $\text{CuCl}_2$  that inhibited in both analysed concentrations and glycerol that presented a slight decrease of activity of 5%. At concentration of  $10 \text{ mM}$ , there was a decrease in activity, when compared with  $2 \text{ mM}$ , except for DTT, Tween 80 and  $\beta$ -mercaptoetanol which stimulated Xyl II and Xyl III activities and for  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ , DTT, EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  that increased Xyl III activity at  $10 \text{ mM}$ . The others ions still showed greater than or close to the Xyl II control activity, except  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , PMSF,  $\text{HgCl}_2$  and  $\text{CuCl}_2$  that showed relative activities of 60.94%, 56.14%, 7.80% and 13.62% at  $10 \text{ mM}$ , respectively. Xyl III activity showed great inhibition by  $\text{CaCl}_2$ , SDS and  $\text{HgCl}_2$  at  $2 \text{ mM}$  and  $10 \text{ mM}$ . Several studies related the strong inhibitor effect of  $\text{Hg}^{2+}$

**Table 04** - Effect on ions and substance on Xyl II and Xyl III activity

Ions and substances	Xyl II activity (%)		Xyl III activity (%)	
	Control	100.00±0.9	100.00±0.7	
	2 (Mm)	10 (mM)	2 (Mm)	10 (mM)
Glicerol	199.4±2.9	113.8±1.2	94.3±12.1	69.3±2.5
CuCl <sub>2</sub>	147.9±3.6	13.6±0.0	0.7±0.5	0.4±0.0
ZnSO <sub>4</sub>	208.1±0.9	133.0±0.32	162.8±2.3	152.6±13.2
MnSO <sub>4</sub>	214.5±0.4	90.5±1.9	237.7±18.8	102.7±0.8
BaCl <sub>2</sub>	211.0±1.7	128.4±0.5	154.4±17.3	149.0±13.7
CaCl <sub>2</sub>	133.6±2.01	99.0±1.4	28.2±2.7	20.9±0.4
NH <sub>4</sub> Cl	180.9±0.4	135.3±0.1	121.0±2.0	147.0±5.3
SDS	143.6±0.4	114.4±0.7	27.1±2.2	0.1±0.1
PMSF	127.7±1.3	56.1±1.1	108.1±0.1	94.2±0.3
MgSO <sub>4</sub>	133.4±0.4	112.3±2.2	114.0±3.8	160.5±9.1
DTT	124.5±0.9	149.1±1.4	127.4±2.2	188.1±3.6
HgCl <sub>2</sub>	139.5±1.6	7.8±0.0	12.9±0.2	0.3±0.1
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	106.4±1.2	60.9±0.9	93.6±5.2	69.1±3.3
EDTA	137.8±0.2	109.7±0.8	114.8±0.4	126.7±12.7
β-mercaptoetanol	121.9±1.1	123.8±0.5	116.0±3.6	153.8±2.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142.4±1.4	127.9±0.4	105.1±2.2	138.0±5.3
Triton	133.56±6.7	129.6±2.7	141.6±4.0	143.5±6.4
Tween 20	131.8±0.1	128.2±1.3	122.9±0.6	150.5±2.8
Tween 80	117.6±0.3	144.3±1.1	146.1±4.2	133.5±5.9

on xylanases even at 2 mM ou lower (SANDRIM et al., 2005), suggesting the presence of a cysteine residue as part of the enzyme active site or nearby. In our study Xyl II activity was stimulated by HgCl<sub>2</sub> in this concentration, presenting 139.53% and inhibited in 92.2% at 10 mM in comparison with other studies that showed complete inhibition of activity at this concentration (TEIXEIRA, 2010; SOUZA, 2013) or with a xylanase from *A. caespitosus* that presented a inhibition of 88.7% in lower concentration of this ion (SANDRIN et al., 2005). With 10 mM SDS inhibited xylanase from *A. fumigatus* in 78.8% (YANG, 2015) whereas in our study it completely inhibited Xyl III, and actived Xyl II presenting a relative activity of 114.37%. The Mn<sup>2+</sup> at concentrations of 5 mM inhibited xylanase from *A. niger* in 45.8% (ELGHARBI et al., 2015). In our study this ions caused less inhibition of Xyl II activity presenting 9.5% with the double concentration of ions and Xyl III was stimulated in these conditions.

#### 5.4.3.5 Effect of NaCl on xylanases activities and stability

The activities of the purified xylanases in different NaCl concentrations was analysed (Tab. 05). Xyl I was activated by NaCl and the activity increment as the concentration increased, displaying 162% at 4 M of NaCl, which indicate a halophilic character of this enzyme. Xyl II and Xyl III showed tolerance by NaCl. Xyl II presented 85% of the activity at 2 M and at 4 M the enzyme still exhibited almost 60% of activity. Xyl III showed 58% and 41% of the activity at 2 M and 4 M of NaCl, respectively. Regarding NaCl stability, Xyl I showed higher activity in NaCl, presenting 177% at 2 M, whereas Xyl II and Xyl III retained 75% and 58% of the activity in this concentration. With NaCl at 4 M, Xyl I presented a large decline of its activity, exhibiting only 46% activity after incubation for 3 h at 25°C. For Xyl II and Xyl III at 4 M NaCl, the activity was reduced by 42% and 34%, respectively.

Our results seem interesting since salt-tolerant or halophilic enzymes or halophilic xylanases have been rarely reported (BAI et al., 2012). In general, most enzymes are negatively affected by high salt concentrations, suffering aggregation and precipitation. This is due to the competition of the salt ions by water molecules that, in non-salt conditions, contribute to the maintenance of the native protein structure through interaction with the water polar groups and water ordering around the hydrophobic groups of the enzyme, balancing the electrostatic interactions between amino acid residues (MEVARECH; FROLOW; GLOSS, 2000; ORTEGA et al., 2011; CARLI, 2016).

Halophilic or halotolerant enzymes have been found usually from bacteria, mainly of *Bacillus* genera, as WEJSE (2003) which purified two halotolerant xylanases from a halophilic bacterium, one of them presented 54% of activity between 1 and 2 M and 31% from 2 to 5 M. Wang and co-workers (2010) found a xylanase from *Bacillus* sp. active over a concentration range of 0 to 20% NaCl, with about 30% of activity at 20% NaCl and retained 46% of its activity after 4 h. Kumar et al. (2013) also showed a halostable xylanase from *Bacillus halodurans* that retained about 100% activity in concentrations of NaCl ranging from 0 to 20 %. Another halotolerant xylanase from *Bacillus* sp., exhibited more than 62% activity at 3–30 % (w/v) of NaCl (ZHOU, 2014).

Compared to the cited works, our results seems promising since Xyl I was activated in all analyzed NaCl concentrations and showed excellent stability after 3 h at 25°C in 2 M NaCl as well as Xyl II and Xyl III, presenting more tolerance or stability to NaCl than cited studies and are few reports of halotolerant or halophilic xylanases isolated from fungi, being one of the latest reported a halophilic xylanase from *Aureobasidium pullumans* (YEGIN, 2017) and from *Colletotrichum graminicola* (CARLI, 2016). In the latter work cited, the xylanase studied

maintained 85% of activity at 0.5 M NaCl and 50% of activity at 3 M (CARLI, 2016). Comparatively, in our study Xyl I and Xyl II showed higher activity with 0.5 M NaCl, although xylanase from *Colletotrichum graminicola* was shown to be more stable when incubated at high NaCl concentrations.

Although the halotolerance mechanism for xylanases is not very well elucidated in the literature and requires more work at the structural level (BAI et al., 2012), it has been reported that species under conditions of environmental stress, such as salinity, can bias their amino acid composition due to their desired chemical characteristics, being that the relationship between acid amino acids (Glu and Asp) and basic amino acids (Lys, His and Arg) may be indicative of adaptation to salinity, being observed in general a high composition of acidic amino acids (MEVARECH; FROLOW; GLOSS, 2000; RHODES *et al.*, 2010; YIN *et al.*, 2015). Halotolerant enzymes have an expressive surface charge, generally reported in the literature as negative charge, which is neutralized mainly by strongly bonded water dipoles, making them more soluble and flexible at high salt concentrations (MEVARECH; FROLOW; GLOSS, 2000). Furthermore, the requirement of high salt concentration for the stabilization of halophilic enzymes occurs because of the low affinity binding of the salt to specific sites on the surface of the folded polypeptide, stabilizing the active protein conformation (MEVARECH; FROLOW; GLOSS, 2000).

These characteristics are in good agreement with the strongly fluctuating salinities occurring in the Nhecolândia lakes where the fungus was isolated.

**Table 05** - Xylanases activities and stability on NaCl of xylanases from *A. hortae*

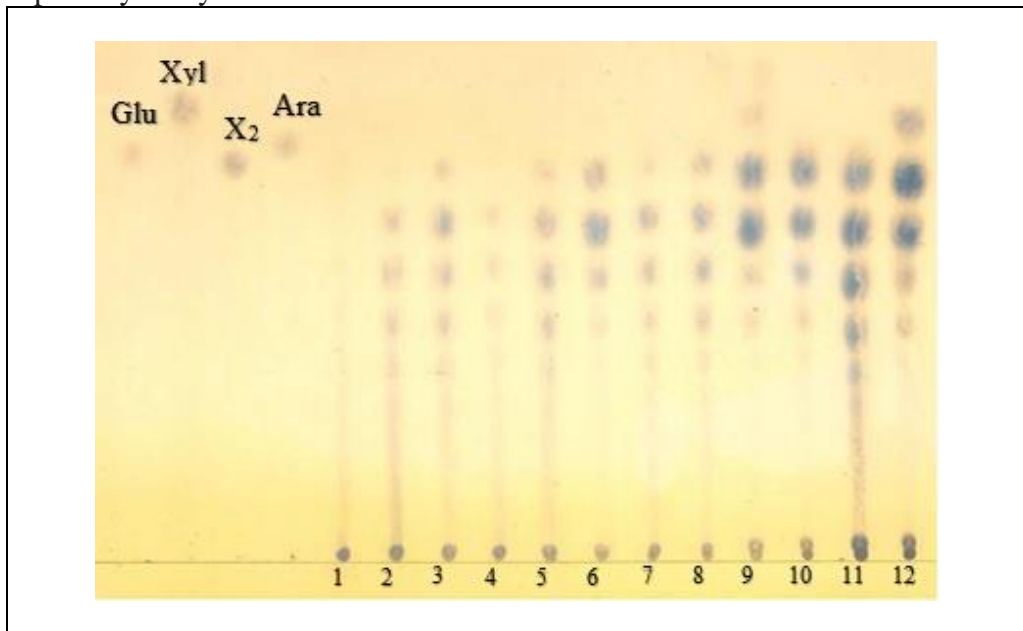
	NaCl concentration (M)	Relative activity (%)		
		Xyl I	Xyl II	Xyl III
Effect on xylanase activity	0	100±4.6	100±7.1	100±5
	0.5	133±4.6	94±2.9	80±1.1
	1	135±12.7	84±0.5	85±0.4
	2	136±2.4	85±2.5	58±0.2
	4	162±1.2	58±0.5	41±4.1
Effect on xylanase stability	0	100±2.7	100±0.9	100±1.4
	2	177±2.1	75±1.7	58±0.2
	4	46±0.6	42±0.8	34±1.1

Activities were assayed with in 0.05 M imidazole buffer pH 6.5 and at 55°C. Stability to NaCl was evaluated after incubation the enzyme with the salt for 3 h at 25 °C.

#### 5.4.3.6 Hydrolysis products

The main hydrolysis products of oat spelts xylan by the purified enzymes were identified using thin-layer chromatography (Fig. 12) and analysed according to their relative mobility to xylose (FONTANA et al., 1988). Xyl I, Xyl II and Xyl III releases xylobiose and other larger xylooligosaccharides, being therefore classified as endoxylanases. Until 2 h incubation, Xyl I released only large oligosaccharides and a low concentration of xylotriose and xylotetrose that increases from 2 h, whereas xylobiose only was evident after 24 h of incubation. For Xyl II, xylobiose was not observed within 10 minutes of incubation, with evidence of only xylooligosaccharides with higher polymerization degree. From 30 min of incubation, Xyl II released xylobiose in small concentrations, with evident increase after 24 h as well as xylooligosaccharides mainly xylotriose and xylotetrose. Unlike the other enzymes, Xyl III released xylobiose from beginning of incubation, and there was a predominance of xylotriose throughout the incubation period as well as xylobiose from 2 h. Besides that, hydrolysis profile shows that Xyl III starting xylose production from 2 h of incubation and increased xylose concentration until 24 h. The xylose production is not common in xylanases and can be explained by a transglycosidase activity or by a contamination with a  $\beta$ -xylosidase not evidenced in the electrophoresis gel.

**Figure 12** - Thin-layer chromatography of the hydrolysis products of oat spelts xylan by xylanases from *A. hortae*.



Lanes 1, 4, 7 and 10 show the hydrolysis products of Xyl I after 10 min, 30 min, 2 h and 24 h of incubation, respectively; lanes 2, 5, 8 and 11 show the hydrolysis products of Xyl II after 10 min, 30 min, 2 h and 24 h of incubation, respectively; ; lanes 3, 6, 9 and 12 show the hydrolysis products of Xyl III after 10 min, 30 min, 2 h and 24 h of incubation, respectively. Glu, Xyl, X<sub>2</sub> and Ara are the standards: glucose, xylose, xylobiose and arabinose, respectively.

## 5.5 CONCLUSION

This work corresponding to the first report about the purification and properties of xylanases from *Aspergillus hortae*. The crude filtrate presented three xylanases that were purified with considerable yield. These enzymes presented optimum temperature at a level higher than that commonly found in the literature for *Aspergillus* xylanases, especially Xyl III. Also were stable over a wide range of pH and presents excellent stability at basic pH, mainly Xyl III that retained 80% of activity at pH 9.5. The enzymes also exhibited great tolerance and stability on NaCl and Xyl I showed a halophilic profile until 2 M NaCl. The results indicate possible employment of such enzymes in some industrial processes, which require activity in elevated temperature and stability in alkaline or saline conditions.

## 5.6 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material 01 - *Aspergillus* species used in the phylogenetic analysis composition.

Isolate	Collection culture code
<i>A. neoaffricanus</i>	CBS 130.55 <sup>T</sup> = NRRL 2399 NRRL 4609 IBT 13121
<i>A. alabamensis</i>	IBT 12702 WB 1920 = IBT 22563 DTO 15-F8 = IBT 29084 DTO 15-F9 = IBT 29086 UAB 15 UAB 20T NRRL 29810 = IBT 29081
<i>A. aureoterreus</i>	CBS 265.81 CBS 503.65 <sup>T</sup> = NRRL 1923
<i>A. floccosus</i>	CBS 116.37 <sup>T</sup> = WB 4872 = IBT 22556
<i>A. hortae</i>	CBS 124230 <sup>T</sup> = NRRL 274 = IBT 26384 IBT 16744 IBT 16745 IBT 6271
<i>A. niveus</i>	CBS 115.27 <sup>T</sup> = NRRL 5505 NRRL 4751 <sup>T</sup>
<i>A. pseudoterreus</i>	CBS 123890 = NRRL 4017
<i>A. terreus</i>	CBS 601.65 <sup>T</sup> = NRRL 255 NRRL 260 NRRL 1913 IBT 6450 IBT 14590 = UAMH 4733 IBT 24859 NRRL 680 = CBS 594.65 = IBT 6252 CBS 117.37 = WB 4873

## 6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira parte deste trabalho compreendeu a otimização da produção de xilanases por uma espécie de fungo isolada de lagoa salina da região da Nhecolândia, no Mato Grosso do Sul, a qual foi posteriormente identificada como *Aspergillus hortae*. A produção de xilanases foi avaliada em diferentes fontes de carbono, especialmente resíduos agroindustriais, sendo o sabugo de milho, o melhor substrato analisado. A caracterização do filtrado de cultura, mostrou atividade ótima em pH 6,5 e 55 °C, estabilidade em pH 3,0 a 9,0 bem como boa estabilidade a 50 °C, mantendo mais de 67% da atividade por 5 horas. O filtrado de cultura contendo xilanases foi aplicado na produção da massa panificada, as sutis melhorias observadas com a adição do filtrado de cultura contendo xilanases na produção de pão, podem ser devido ao tipo de farinha empregado ou ainda ao fato de que, como evidenciado no capítulo 02, as xilanases presentes no filtrado, apresentaram atividade ótima em pH não muito ácido bem como temperatura ótima mais elevada quando o ideal para aplicação em pão seria a utilização de xilanases mais ácidas e com temperatura ótima em torno de 35 °C que é a temperatura de preparação da massa do pão. A segunda parte do trabalho mostrou, pela primeira vez, a purificação das xilanases presentes no filtrado de cultura de *A. hortae*, bem como a caracterização de suas principais propriedades físico-químicas. Foram purificadas três xilanases, Xyl I, Xyl II e Xyl III em poucas etapas cromatográficas. As características bioquímicas destas enzimas, pH ótimo levemente ácido, a temperaturas ótimas mais elevadas 55-65°C bem como estabilidade em ampla faixa de pH e termoestabilidade a 55°C por longo período indicam potencial de aplicação em diversos processos industriais. Além disso, as enzimas apresentaram halofilicidade e halotolerância, característica pouco reportada na literatura para enzimas produzidas por fungos. A atividade de Xyl I foi ativada em todas as concentrações de sal analisadas, 0,5 M a 4 M, e Xyl II e Xyl III apresentaram 85% e 58% de atividade a 2 M de NaCl. Por fim, as enzimas produzidas e purificadas a partir do filtrado de *A. hortae* podem apresentar diferentes aplicações industriais, como na composição de alimentos derivados de frutos do mar, no processo de sacarificação da biomassa com possibilidade reaproveitamento de águas devido ao fato da enzima ser estável a diversos íons bem como condições de salinidade, não necessitando de água purificada para permanecer ativa.

## REFERÊNCIAS

- AACC (2010). American Association of Cereal Chemists. Approved methods. (11th ed.). St. Paul.
- ABDEL-MONEM, O. A.; EL-BAZ, A. F.; SHETAIA, Y. M.; EL-SABBAGH, S. M. Production and application of thermostable cellulase-free xylanase by *Aspergillus fumigatus* from agricultural wastes. **Industrial Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 152-161, 2012.
- ABDEL-SATER, M. A.; EL-SAID, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 47, n. 1, p. 15-21, 2001.
- ABIB – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DA BIOMASSA. **Inventário residual Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://pt.calameo.com/accounts/200968>>. Acesso em: 28 mar. 2016
- ABIP. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA. **Indicadores**. 2009. Disponível em: <[http://www.abip.org.br/perfil\\_internas.aspx?cod=35](http://www.abip.org.br/perfil_internas.aspx?cod=35)>. Acesso em: 20 jan. 2015
- ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6488-6495, 2009.
- AHMAD, Z.; BUTT, M.S.; AHMED, A.; RIAZ, M.; SABIR, S.M.; FAROOQ, U.; REHMAN, F.U. Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 10, p. 2445-2453, 2014.
- AHMED, S.A; SALEH, S.A.; MOSTAFA, F.A.; EL ATY, A.A.; AMMAR, H.A. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 134-144, 2016.
- AMORE, A.; PARAMESWARAN, B.; KUMAR, R.; BIROLO, L.; VINVIGUERRA, R.; MARCOLONGO, L;...FARACO, V. Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 573-581, 2015.
- ASHOUR, A.; AMER, M.; MARZOUK, A.; SHIMIZU, K.; KONDO, R.; EL-SHARKAWY. S. Corncobs as a potential source of functional chemicals. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13823-13830, 2013.
- ARAGON, C. C.; MATEO, C.; RUIZ-MATUTE, A. I.; CORZO, N.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; SEVILLANO, L.; DÍAZ, M.; MONTI, R.; SANTAMARÍA. Production of xylo-oligosaccharides by immobilized-stabilized derivatives of endo-xylanase from *Streptomyces halstedii*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 478-483, 2013.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

ARORA, R.; BEHERA, S.; KUMAR, S. Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: a future perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 699-717, 2015.

BAGBY, M.O.; WIDSTROM, N.W., 1987. Biomass uses and conversions. In: Watson, S. A.; RAMSTAD, P.E., (Eds.). **Corn: Chemistry and Technology**, American Association of Cereal Chemists Ins., St. Paul, MN, USA, pp. 575–590

BAI, W.; XUE, Y.; ZHOU, C.; MA, Y. Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 11, p. 2093-2099, 2012.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; SONIA, K. G.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Functionally diverse multiple xylanases of thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Enzyme and microbial technology**, v. 35, n. 5, p. 460-466, 2004.

BANKEEREE, W.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; CHAIAREEKIJ, S.; EVELEIGH, D. E.; KIM, S. W.; PUNNAPAYAK, H. Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1, 2014.

BARRY, V. C.; DILLON, T. Occurrence of xylans in marine algae. **Nature**, v. 146, n. 620, p. 3692-3696, 1940.

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

BIELY, P. Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases. **ACS Symposium Series**, v. 460, p. 408-416, 1991.

BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo- $\beta$ -1, 4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 151-166, 1997.

BIELY, Peter. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1575-1588, 2012.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260-1274, 2016.

BELOVA, O. V.; LISOV, A. V.; VINOKUROVA, N. G.; KOSTENEVICH, A. A.; SAPUNOVA, L. I.; LOBANOK, A. G.; LEONTIEVSKY, A. A. Xylanase and cellulase of fungus *Cerrena unicolor* VKM F-3196: production, properties, and applications for the

saccharification of plant material. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 50, n. 2, p. 148-153, 2014.

BHUSHAN, B.; PAL, A.; KUMAR, S.; JAIN, V. Biochemical characterization and kinetic comparison of encapsulated haze removing acidophilic xylanase with partially purified free xylanase isolated from *Aspergillus flavus* MTCC 9390. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 191-200, 2015.

BON, E. P. S.; COSTA, R.B.; DA SILVA, M.V.A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; FREITAS, S.P.; FERRARA, M.A. Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Interciência Ltda: Rio de Janeiro, 2008.

BOUCHERBA, N.; GAGAOUA, M.; COPINET, E.; BETTACHE, A.; DUCHIRON, F.; BENALLAOUA, S. Purification and characterization of the xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN-13. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2694-2705, 2014.

BORUAH, P.; DOWARAH, P.; HAZARIKA, R.; YADAV, A.; BARKAKATI, P.; GOSWAMI, T. Xylanase from *Penicillium meleagrinum* var. *viridiflavum*—a potential source for bamboo pulp bleaching. **Journal of Cleaner Production**, v. 116, p. 259-267, 2016.

BRASIL. **Lei nº 12.305 de 02 de agosto de 2010**. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Diário Oficial da União 2010; 3 ago. Disponível em: [http://www.mncr.org.br/box\\_2/instrumentos-juridicos/leis-edecretos-federais/Lei%20%2012.305-2010%20Politica%20de%20Residuos%20Solidos.pdf/view](http://www.mncr.org.br/box_2/instrumentos-juridicos/leis-edecretos-federais/Lei%20%2012.305-2010%20Politica%20de%20Residuos%20Solidos.pdf/view). Acesso em: 04 dez. 2015.

BRASIL. **Decreto nº 6.041, de 8 de fevereiro de 2007**. Institui a política de desenvolvimento da biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 8 fev. 2007. Seção 1, p1. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm)>. Acesso em: mar. 2013.

BRASIL. Ministério do Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário Estatístico do Agronegócio – Secretaria de Produção e Agroenergia**. Brasília: Mapa, 2010c. 78 p.

BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, v. 104, p. 271-280, 2017.

BRIENZO, M.; TYHODA, L.; BENJAMIN, Y.; GÖRGENS, J. Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 253-262, 2015.

BUTT, M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z.; SULTAN, M. T. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 22-31, 2008.

BUZAŁA, K. P.; PRZYBYSZ, P.; KALINOWSKA, H.; DERKOWSKA, M. Effect of Cellulases and Xylanases on Refining Process and Kraft Pulp Properties. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161575, 2016.

CABALLERO, P. A.; GÓMEZ, M.; ROSELL, C. M. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. **Journal of food engineering**, v. 81, n. 1, p. 42-53, 2007.

CAMACHO, N. A.; AGUILAR, G. Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 104, n. 3, p. 159-171, 2003.

CARLI, S. **Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola***. 2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

CARMONA, E. C.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS microbiology letters**, v. 166, n. 2, p. 311-315, 1998.

CARVALHO, E. A.; DOS SANTOS GÓES, L. M.; UETANABARO, A. P. T.; DA SILVA, E. G. P.; RODRIGUES, L. B.; PIROVANI, C. P.; DA COSTA, A. M. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: Application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1499-1506, 2017.

CHEN, Q.; LI, M.; WANG, Xiong. Enzymology properties of two different xylanases and their impacts on growth performance and intestinal microflora of weaned piglets. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 18-23, 2016.

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

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**, v. 127, p. 54-63, 2015.

CHUTANI, P.; SHARMA, K. K. Concomitant production of xylanases and cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* MDU-6 selected for the deinking of paper waste. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 39, n. 5, p. 747-758, 2016.

COELHO, G. D.; CARMONA, E. C. Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization. **Journal of basic microbiology**, v. 43, n. 4, p. 269-277, 2003.

COLABARDINI, A.; HUMANES, A. C.; GOUVEA, P. F.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; VON ZESKA KRESS, M. R.; GOLDMAN, G. H. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* fbxA encoding an F-box protein involved in xylanase induction. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 2, p. 130-140, 2012.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acomp. da safra bras. de cana-de-açúcar, v. 3 – Safra 2016/17, n. 3 - Terceiro Levantamento, Brasília, p. 1-74, dez. 2016. Disponível em: <  
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_12\\_27\\_16\\_30\\_01\\_boletim\\_cana\\_p\\_ortugues\\_-3o\\_lev\\_-\\_16-17.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_p_ortugues_-3o_lev_-_16-17.pdf)>. Acesso em: 01 jan. 2017.

COURTIN, C. M.; GELDERS, G. G.; DELCOUR, J. A. Use of two endoxylanases with different substrate selectivity for understanding arabinoxylan functionality in wheat flour breadmaking. **Cereal chemistry**, v. 78, n. 5, p. 564-571, 2001.

COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread making. **Journal of cereal science**, v. 35, n. 3, p. 225-243, 2002.

DAMEN, B.; POLLET, A.; DORNEZ, E.; BROEKAERT, W. F.; VAN HAESENDONCK, I.; TROGH, I.;...COURTIN, C. M. Xylanase-mediated in situ production of arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic potential in whole meal breads and breads enriched with arabinoxylan rich materials. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 111-118, 2012.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DE ALMEIDA, T. I. R.; SÍGOLO, J. B.; FERNANDES, E.; NETO, J. P. D. Q.; BARBIERO, L.; SAKAMOTO, A. Y. Proposta de classificação e gênese das lagoas da baixa Nhecolândia-MS com base em sensoriamento remoto e dados de campo. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 33, n. suppl. 2, p. 83-90, 2016.

DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA, S.; MICHELIN, M.; BETINI, J. H. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; DE MORAES, M. D. L. T. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 149-155, 2009.

DE GODOY DAIHA, K.; BRÊDA, G. C.; LARENTIS, A. L.; FREIRE, D. M. G.; ALMEIDA, R. V. Enzyme technology in Brazil: trade balance and research community. **Brazilian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 17, 2016.

DERVILLY, G.; LECLERCQ, C.; ZIMMERMANN, D.; ROUE, C.; THIBAUT, J. F.; SAULNIER, L. Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. **Carbohydrate polymers**, v. 47, n. 2, p. 143-149, 2002.

DESAI, D.; IYER, B. D. Biodeinking of old newspaper pulp using a cellulase-free xylanase preparation of *Aspergillus niger* DX-23. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 78-85, 2016.

DE SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA, F.; XIMENES, E. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 54-60, 2010.

DE SIQUEIRA, F. G.; DE SIQUEIRA, E. G.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; ...FERREIRA FILHO, E. X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20-26, 2010.

DE SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA, F.; XIMENES, E. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 54-60, 2010.

DESHMUKH, R. A.; JAGTAP, S.; MANDAL, M. K.; MANDAL, S. K. Purification, biochemical characterization and structural modelling of alkali-stable  $\beta$ -1, 4-xylan xylanohydrolase from *Aspergillus fumigatus* R1 isolated from soil. **BMC biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 11, 2016.

DE SOUZA MOREIRA, L. R.; DE CARVALHO CAMPOS, M.; DE SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O., MARTINS, P. A., ...FERREIRA FILHO, E. X Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46-52, 2013.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1627-1640, 2012.

DHAKAR, K.; PANDEY, A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2499-2510, 2016.

DODD, D; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2-17, 2009.

DORNEZ, E.; VERJANS, P.; ARNAUT, F.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M DORNEZ, E. Use of psychrophilic xylanases provides insight into the xylanase functionality in bread making. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9553-9562, 2011.

DUBOIS, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUENAS, R.; TENDERDY, R. P.; GUTIERREZ-CORREA, M. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 333-337, 1995.

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives– biopolymers with valuable properties, naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular rapid communications**, v. 21, n. 9, p. 542-556, 2000.

ELGHARBI, F.; HMIDA-SAYARI, A.; ZAAFOURI, Y.; BEJAR, S. Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in breadmaking and in vitro digestion. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 103-109, 2015.

EMBRAPA AGROENERGIA. **Biorrefinarias**, Brasília, Folder, 3p, 2011.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; HSIEH, M. C.; FANG, T. J. Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n. 1, p. 36-42, 2007.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; LAN, C. H.; FANG, T. J. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 49-55, 2008.

FIALHO, M. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*. **Folia Microbiologica**, v. 49, n. 1, p. 13-18, 2004.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Secretome data from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated in submerged and sequential fermentation methods. **Data in Brief**, 2016.

FONSECA-MALDONADO, R.; VIEIRA, D. S.; ALPONTI, J. S.; BONNEIL, E.; THIBAUT, P.; WARD, R. J. Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 35, p. 25522-25534, 2013.

FONTANA J.D.; GEBARA M.; BLUMEL M.; SCHNEIDER H.; MACKENZIE C. R.; JOHNSON K.G.  $\alpha$ -4-O-Methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 560–571, 1988.

GANGA, M. A.; PINAGA, F.; VALLES, S.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. **International journal of food microbiology**, v. 47, n. 3, p. 171-178, 1999.

GARCIA, R. B.; GANTER, J. L.; CARVALHO, R. R. Solution properties of D-xylans from corn cobs. **European Polymer Journal**, v. 36, n. 4, p. 783-787, 2000.

GARG, S. Xylanase: Applications in Biofuel Production. **Current Metabolomics**, v. 4, n. 1, p. 23-37, 2016.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; FOLETTI, E. L.; KUHN, R. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Production of cellulolytic enzymes and application of crude enzymatic extract for saccharification of lignocellulosic biomass. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 560-572, 2015.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous *Ascomycetes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, 1323–1330. 1995.

GRUPPEN, H.; KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN, A. G. J. Enzymic degradation of water-unextractable cell wall material and arabinoxylans from wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v. 18, n. 2, p. 129-143, 1993.

GOESAERT, H; BRIJS, K; VERAVERBEKE, W. S; COURTIN, C. M; GEBRUERS, K; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Food Science & Technology**, v.16, p.12-30, 2005.

GONCALVES, G. A.; TAKASUGI, Y.; JIA, L.; MORI, Y.; NODA, S.; TANAKA, T.; ...KAMIYA, N. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. **Enzyme and microbial technology**, v. 72, p. 16-24, 2015.

GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T. M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L. B.; ... PRADE, R. A. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource technology**, v. 119, p. 293-299, 2012.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J. F.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K. S. Lignocellulosic biomass: biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2016.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; ...EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in biochemical sciences**, 2016.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, [s.n.], p. 95-98, 1999.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. Improvement of flour quality through carbohydrases treatment during wheat tempering. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 14, p. 4126-4130, 2002.

HARRIS, A. D.; RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, n. 7, 2010.

HE, H.; QIN, Y.; LI, N.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and Characterization of a Thermostable Hypothetical Xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3148-3161, 2015.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current opinion in structural biology**, v. 7, n. 5, p. 637-644, 1997.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, E. M.; RIOS-LATORRE, R. A.; ÁLVAREZ-CERVANTES, J.; LOERA-CORRAL, O.; ROMÁN-GUTIÉRREZ, A. D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; MERCADO-FLORES, Y. Xylanases, cellulases, and acid protease produced by *Stenocarpella maydis* grown in solid-state and submerged fermentation. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 2341-2358, 2014.

HMIDA-SAYARI, A.; TAKTEK, S.; ELGHARBI, F.; BEJAR, S. Biochemical characterization, cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1839-1847, 2012.

HRMOVÁ, M.; PETRÁKOVÁ, E.; BIELY, P. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. **Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 541-547, 1991.

HONG, S. B.; GO, S. J.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J.; SAMSON, R.; Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1316-1329, 2005.

HOOD, J. S.; HO, H. L. Optimisation of medium formulation and growth conditions for xylanase production by *Aspergillus brasiliensis* in submerged fermentation (SmF). **International Journal of Biodiversity, Bioprocessing and Development**, v. 2014, 2014.

ICC - INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. Rapid pasting method using the Newport Rapid Visco Analyser. Standard n° 162, 1996.

IMJONGJAIKAK, S.; JOMMUENGBOUT, P.; KARPILANONDH, P.; KATSUZAKI, H.; SAKKA, M.; KIMURA, T.; ... SAKKA, K. *Paenibacillus curdlanolyticus*  $\beta$ -6 xylanase Xyn10C capable of producing a doubly arabinose-substituted xylose,  $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -l-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)]-D-Xylp, from rye arabinoxylan. **Enzyme and microbial technology**, v. 72, p. 1-9, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Novembro 2016. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201611.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201611.pdf)>. Acesso em: dez. 2016.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA 2012. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília, 2012 (Relatório de Pesquisa). Disponível em: <[http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917\\_relatorio\\_residuos\\_organicos.pdf](http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917_relatorio_residuos_organicos.pdf)>. Acesso em: mai. 2015.

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. **BioResources**, v. 8, n. 2, p. 3157-3176, 2013.

IRFAN, M.; ASGHAR, U.; NADEEM, M.; NELOFER, R.; SYED, Q. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 139-147, 2016.

JAEKEL, L. Z.; SILVA, C. B. D.; STEEL, C. J.; CHANG, Y. K. Influence of xylanase addition on the characteristics of loaf bread prepared with white flour or whole grain wheat flour. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 4, p. 844-849, 2012.

JARVIS, M. Chemistry: cellulose stacks up. **Nature**, v. 426, n. 6967, p. 611-612, 2003.

JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. **Current opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 337-342, 1996.

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

JIANG, Z.; LE BAIL, A.; WU, A. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 2, p. 172-179, 2008.

JIANG, Z.; LI, X.; YANG, S.; LI, L.; TAN, S. Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima*. **Food research international**, v. 38, n. 1, p. 37-43, 2005.

JIN, N.; MA, S.; LIU, Y.; YI, X.; HE, R.; XU, H.; ...CAO, Y. Thermophilic xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using wheat straw and corn cob. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2387-239, 2012.

JOSHI, C.; KHARE, S. K. Induction of xylanase in thermophilic fungi *Scytalidium thermophilum* and *Sporotrichum thermophile*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 21-27, 2012.

JUTURU, V.; WU, J. C. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 353-363, 2013.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial exo-xylanases: a mini review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 81-92, 2014.

KAMAT, S.; KHOT, M.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMAR, A.; GADE, W. N. KAMAT, S. Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands. **Bioresource technology**, v. 135, p. 246-253, 2013.

KAUR, P.; BHARDWAJ, N. K.; SHARMA, J. Pretreatment with xylanase and its significance in hemicellulose removal from mixed hardwood kraft pulp as a process step for viscose. **Carbohydrate polymers**, v. 145, p. 95-102, 2016.

- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.
- KIEMLE, S. N.; ZHANG, X.; ESKER, A. R.; TORIZ, G.; GATENHOLM, P.; COSGROVE, D. J. Role of (1, 3)(1, 4)- $\beta$ -glucan in cell walls: interaction with cellulose. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 5, p. 1727-1736, 2014.
- KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 199, p. 42-48, 2016.
- KOBAKHIDZE, A.; ASATIANI, M.; KACHLISHVILI, E.; ELISASHVILI, V. Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. **Annals of Agrarian Science**, v. 14, n. 3, p. 169-176, 2016.
- KOBAYASHI, H.; KAIKI, H.; SHROTRI, A.; TECHIKAWARA, K.; FUKUOKA, A. Hydrolysis of woody biomass by a biomass-derived reusable heterogeneous catalyst. **Chemical science**, v. 7, n. 1, p. 692-696, 2016.
- KOCABAS, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66-75, 2015.
- KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S. C.; ALMEIDA, J. M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 9, n. 3, p. 5738-5773, 2014.
- KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN, A. G. J. Degradation of different [(glucurono) arabino] xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 688-695, 1993.
- KÜES, U. Fungal enzymes for environmental management. **Current opinion in biotechnology**, v. 33, p. 268-278, 2015.
- KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: an overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 7, n. 03, p. 149, 2016.
- KRISANA, A.; RUTCHADAPORN, S.; JARUPAN, G.; LILY, E., SUTIPA, T.; KANYAWIM, K. Endo-1, 4- $\beta$ -xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 17, 2005.
- KUMAR, V.; MARÍN-NAVARRO, J.; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 1-10, 2016.

KUMAR, L.; NAGAR, S.; MITTAL, A.; GARG, N.; GUPTA, V. K. Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 9, p. 1737-1749, 2014.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

KUMAR, V.; SYAL, P.; SATYANARAYANA, T. Highly thermo–halo–alkali-stable  $\beta$ -1, 4-endoxylanase from a novel polyextremophilic strain of *Bacillus halodurans*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 5, p. 555-565, 2013.

LAKSHMI, G. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; HOBBS, P. J.; PRAKASHAM, R. S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 51-57, 2009.

LASA, I.; BERENQUER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. **Microbiologia**, v. 9, n. 2, p. 77-89, 1993.

LEMPEREUR, I.; ROUAU, X.; ABECASSIS, J. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum*L.) grain and its milling fractions. **Journal of Cereal Science**, v. 25, n. 2, p. 103-110, 1997.

LENARTOVICZ, V.; MARQUES DE SOUZA, C. G.; MOREIRA, F. G.; PERALTA, R. M. Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. **Journal of basic microbiology**, v. 42, n. 6, p. 388-395, 2002.

LI, S.; MORRIS, C. F.; BETTGE, A. D. Genotype and environment variation for arabinoxylans in hard winter and spring wheats of the US Pacific Northwest. **Cereal Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 88-95, 2009.

LIAB, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1, p. 89-94, 2000.

LIAO, H.; ZHENG, H.; LI, S.; WEI, Z.; MEI, X.; MA, H.; ...XU, Y. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

LITTLECHILD, J. A. Enzymes from extreme environments and their industrial applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 161, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

- MAEDA, R.; IDA, T.; IHARA, H.; SAKAMOTO, T. Induction of apoptosis in MCF-7 cells by  $\beta$ -1,3-xylooligosaccharides prepared from *Caulerpa lentillifera*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1032-1034, 2012.
- 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.
- MANSOUR, A. A.; ARNAUD, T.; LU-CHAU, T. A.; FDZ-POLANCO, M.; MOREIRA, M. T.; RIVERO, J. A. C. Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 1, p. 31-46, 2016.
- MATSUZAWA, T.; KANEKO, S.; YAOI, K. Improvement of thermostability and activity of *Trichoderma reesei* endo-xylanase Xyn III on insoluble substrates. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-9, 2016.
- McPHILLIPS, K.; WATERS, D. M.; PARLET, C.; WALSH, D. J.; ARENDT, E. K.; MURRAY, P. G. Purification and Characterisation of a  $\beta$ -1, 4-Xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and Its Application in Bread Making. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 1747-1762, 2014.
- MCMILLAN, James D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: **ACS symposium series (USA)**. 1994.
- MEDRONHO, B.; LINDMAN, B. Brief overview on cellulose dissolution/regeneration interactions and mechanisms. **Advances in colloid and interface science**, v. 222, p. 502-508, 2015.
- MEVARECH, M; FROLOW, F; GLOSS, L. M. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. **Biophysical chemistry**, v. 86, n. 2, p. 155-164, 2000.
- MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; DA SILVA, T.M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 33, n. 7, p. 813-821, 2010.
- MICHELIN, M.; SILVA, T.M.; JORGE, J. A.; MARIA DE LOURDES, T. M. 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**, v. 174, n. 1, p. 206-220, 2014.
- MILAGRES, A. M. F; LACIS, L. S.; PRADE, R. A. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. **Enzyme and microbial technology**, v. 15, n. 3, p. 248-253, 1993.
- MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINOLTA CORPORATION. **Precise color communication: color control from feeling to instrumentation.** Minolta, 1994.

MIYAUCHI, S.; NAVARRO, D.; GRIGORIEV, I. V.; LIPZEN, A.; RILEY, R.; CHEVRET, D.; ...ROSSO, M. Visual comparative omics of fungi for plant biomass deconstruction. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

MORALES, M.; QUINTERO, J.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: environmental impacts and energy balance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1349-1361, 2015.

MOREIRA, L. R. S; FILHO, E. X. F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5205-5214, 2016.

MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T. L.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER A. A. "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", **Bioinformatics**, v. 24, n. 16, p. 1757-1764, 2008.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization**, 2013.

MOUBASHER, A. A. H.; ISMAIL, M. A.; HUSSEIN, N. A.; GOUDA, H. A. Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natron, Egypt. Part 2: Cellulase, xylanase and pectinase. **European Journal of Biological Research**, v. 6, n. 2, p. 103-111, 2016.

MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Unraveling the secretome of *Termitomyces clypeatus* grown on agroresidues as a potential source for bioethanol production. **Process Biochemistry**, 2015.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and bioprocess technology**, v. 5, n. 2, p. 657-664, 2012.

NAGAR, S; MITTAL, A.; GUPTA, V. K. Enzymatic clarification of fruit juices (apple, pineapple, and tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. **Biotechnology and Bioprocess engineering**, v. 17, n. 6, p. 1165-1175, 2012.

NDOU, S. P.; KIARIE, E.; AGYEKUM, A. K.; HEO, J. M.; ROMERO, L. F.; ARENT, S.; ... NYACHOTI, C. M. Comparative efficacy of xylanases on growth performance and digestibility in growing pigs fed wheat and wheat bran-or corn and corn DDGS-based diets supplemented with phytase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p. 230-239, 2015.

NINAWA, S.; KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1252-1258, 2008.

NIXON, K. C. 1999–2002: WinClada ver. 1.0000. **Published by the author**, Ithaca, NY, USA

OLIVEIRA, D. S.; TELIS-ROMERO, J.; DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L. Effect of a *Thermoascus aurantiacus* thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality. **Food chemistry**, v. 143, p. 139-146, 2014.

ORTEGA, G.; LAÍN, A.; TADEO, X.; LÓPEZ-MENDEZ, B.; CASTANO, D.; MILLET, O. Halophilic enzyme activation induced by salts. *Sci Rep*, v. 1, n. 6, 2011.

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**, v. 46, n. 4, p. 879-887, 2011.

PALMA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; PRATA, A. M. R.; DE MANCILHA, I. M. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 141-145, 1996.

PATEL, S. J.; SAVANTH, V. D. Review on fungal xylanases and their applications. **International Journal**, v. 3, n. 3, p. 311-315, 2015.

PEÑA, M. J.; KULKARNI, A. R.; BACKE, J.; BOYD, M.; O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. Structural diversity of xylans in the cell walls of monocots. **Planta**, v. 244, n. 3, p. 589-606, 2016.

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

POMERANZ, Y. **Wheat: chemistry and technology**. American Association of Cereal Chemists, 1988.

POPP, J.; HARANGI-RÁKOS, M.; GABNAI, Z.; BALOGH, P.; ANTAL, G.; BAI, A. Biofuels and their co-products as livestock feed: global economic and environmental implications. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 285, 2016.

RAGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M. F.; ...LANGAN, P. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 1246843, 2014.

RAHIKAINEN, J. L.; MARTIN-SAMPEDRO, R.; HEIKKINEN, H.; ROVIO, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; ...KRUUS, K. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. **Bioresource technology**, v. 133, p. 270-278, 2013.

RAHMAN, A. S.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 1, p. 58-64, 2003.

- RAJ, A.; KUMAR, S.; SINGH, S. K.; KUMAR, M. Characterization of a new *Providencia* sp. strain x1 producing multiple xylanases on wheat bran. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. **The genus Aspergillus**, 1965.
- RAVICHANDRA, K.; YASWANTH, V. V. N.; NIKHILA, B.; AHMAD, J.; RAO, P. S.; UMA, A.; ...PRAKASHAM, R. S. Xylanase production by isolated fungal strain, *Aspergillus fumigatus* RSP-8 (MTCC 12039): impact of agro-industrial material as substrate. **Sugar Tech**, v. 18, n. 1, p. 29-38, 2016.
- REDDY, S. S; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 237-245, 2016.
- RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. Vibe. Xylan biosynthesis. **Current opinion in biotechnology**, v. 26, p. 100-107, 2014.
- RHODES, M. E.; FITZ-GIBBON, S. T.; OREN, A.; HOUSE, C. H. Amino acid signatures of salinity on an environmental scale with a focus on the Dead Sea. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 9, p. 2613-2623, 2010.
- RIES, L. N.; BEATTIE, S. R.; ESPESO, E. A.; CRAMER, R. A.; GOLDMAN, G. H. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 203, n. 1, p. 335-352, 2016.
- RIZZATTI, A. C.; SANDRIM, V. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; MARIA DE LOURDES, T. M. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 88-93, 2004.
- RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M. J. R.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leafcutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.
- ROJAS, J. A.; ROSELL, C. M.; DE BARBER, C. B. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. **Food hydrocolloids**, v. 13, n. 1, p. 27-33, 1999.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

- ROUAU, X.; EL-HAYEK, M. L.; MOREAU, D. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. **Journal of Cereal Science**, v. 19, n. 3, p. 259-272, 1994.
- ROY, S.; DUTTA, T.; SARKAR, T. S.; GHOSH, S. Novel xylanases from *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604: comparative analysis of production, purification and characterization of enzyme from submerged and solid state fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.
- RUIJTER, G. J.; VISSER, J. Carbon repression in *Aspergilli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, n. 2, p. 103-114, 1997.
- SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in mycology**, v. 50, p. 45-61, 2004.
- SAMSON, R. A., PETERSON, S. W., FRISVAD, J. C., & VARGA, J. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in mycology**, v. 69, p. 39-55, 2011.
- SANDRIM, V. C.; RIZZATTI, A. C. S.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; MILAGRES, A. M. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1823-1828, 2005.
- SCOPE, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3a ed. New York: SpringerVerlag, 380 p. 1994.
- SEGATO, F.; DAMÁSIO, A. R.; DE LUCAS, R. C.; SQUINA, F. M.; PRADE, R. A. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588-613, 2014.
- SERRA, R.; CABANES, F. J.; PERRONE, G.; CASTELLÁ, G.; VENÂNCIO, A.; MULE, G.; KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, v. 98, n. 2, p. 295-306, 2006.
- SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1763-1771, 2005.
- SHAH, A. R.; SHAH, R. K.; MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. **Bioresource technology**, v. 97, n. 16, p. 2047-2053, 2006.
- SHAHI, N.; HASAN, A.; AKHTAR, S.; SIDDIQUI, M. H.; SAYEED, U.; KHAN, M. K. A. Xylanase: a promising enzyme. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 334-339, 2016.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SHARMA, A.; THAKUR, V. V.; SHRIVASTAVA, A.; JAIN, R. K.; MATHUR, R. M.; GUPTA, R.; KUHAD, R. C. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study. **Bioresource technology**, v. 169, p. 96-102, 2014.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: an overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.

SHARMA, M.; MAHAJAN, C.; BHATTI, M. S.; CHADHA, B. S. Profiling and production of hemicellulases by thermophilic fungus *Malbranchea flava* and the role of xylanases in improved bioconversion of pretreated lignocellulosics to ethanol. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 30, 2016.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 307-313, 2015.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e caracterização de xilanas de sabugo de milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 2, p. 1-9, 1998.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C. O.; ALSINA, L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, 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**, v. 43, n. 4, p. 1545-1552, 2012.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SLUIMER, P. **Principles of breadmaking: functionality of raw materials and process steps**. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, 2005.

SOARES, L.M.V.; RODRIGEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some brazilian foods using multitoxin thin layer chromatographic method **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SONG, H. T.; GAO, Y.; YANG, Y. M.; XIAO, W. J.; LIU, S. H.; XIA, W. C.; ... ; JIANG, Z. B.. Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 710-715, 2016.

SONG, L.; TSANG, A.; SYLVESTRE, M. Engineering a thermostable fungal GH10 xylanase, importance of N-terminal amino acids. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 1081-1091, 2015.

SORGATTO, M.; GUIMARÃES, N. C. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; GIANNESI, G. G. Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 32, p. 8076-8084, 2012.

SOUZA, D. T.; BISPO, A. S. R.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Production of thermophilic endo- $\beta$ -1,4-xylanases by *Aspergillus fumigatus* FBSPE-05 using agro-industrial by-products. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1575-1585, 2012.

STEFFOLANI, M. E.; RIBOTTA, P. D.; PÉREZ, G. T.; LEÓN, A. E. Eugenia et al. Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. **Journal of cereal science**, v. 51, n. 3, p. 366-373, 2010.

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

SUEB, M. S. M.; LUO, J.; MEYER, A. S.; JORGENSEN, H.; PINELO, M. Impact of the fouling mechanism on enzymatic depolymerization of xylan in different configurations of membrane reactors. **Separation and Purification Technology**, v. 178, p. 154-162, 2017.

SUDAN, R.; BAJAJ, B. Kumar. Production and biochemical characterization of xylanase from an alkalitolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 491-500, 2007.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical reviews in biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

SWIATKIEWICZ, S.; SWIATKIEWICZ, M.; ARCZEWSKA-WLOSEK, A.; JOZEFIAK, D. Efficacy of feed enzymes in pig and poultry diets containing distillers dried grains with solubles: a review. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 100, n. 1, p. 15-26, 2016.

TAIBI, Z.; SAOUDI, B.; BOUDELAA, M.; TRIGUI, H.; BELGHITH, H.; GARGOURI, A.; LADJAMA, A. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 3, p. 663-679, 2012.

TAMAYO, E. N.; VILLANUEVA, A.; HASPER, A. A.; DE GRAAFF, L. H.; RAMÓN, D.; OREJAS, M. CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 6, p. 984-993, 2008.

- TEIXEIRA, R. S. S.; SIQUEIRA, F. G.; DE SOUZA, M. V.; FERREIRA FILHO, E. X.; DA SILVA BON, E. P. Purification and characterization studies of a thermostable  $\beta$ -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1041-1051, 2010.
- TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Solid-state fermentation of brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 6, 2015.
- TERRASAN, C. R. F.; GUISAN, J. M.; CARMONA, E. C. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: purification, characterization and hydrolysis of substrates. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2016.
- TERRASAN, C. R.; TEMER, B.; SARTO, C.; SILVA JUNIOR, F. G.; CARMONA, E. C. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: production, physico-chemical properties, and application of the crude extract to pulp biobleaching. **BioResources**, p. 1292-1305, 2013.
- THOMAS, L.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. **Renewable Energy**, 2016.
- UDAY, U. S. P., CHOUDHURY, P., BANDYOPADHYAY, T. K., & BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International journal of biological macromolecules**, v. 82, p. 1041-1054, 2016.
- ULLAH, K.; SHARMA, V. K.; DHINGRA, S.; BRACCIO, G.; AHMAD, M.; SOFIA, S. Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 682-698, 2015.
- UMEMOTO, Y.; SHIBATA, T.; ARAKI, T. D-xylose isomerase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain XY-214, and D-xylulose production from  $\beta$ -1,3-xylan. **Marine Biotechnology**, 14, 10-20, 2012.
- VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.
- VAN KUIJK, S. J. A.; SONNENBERG, A. S. M.; BAARS, J. J. P.; HENDRIKS, W. H.; CONE, J. W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 191-202, 2015.
- VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. **Bioresource technology**, v. 117, p. 360-367, 2012.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora*. **Microbiol Genet Bull**, v. 13, p. 42-43, 1956.

- XIONG, H.; VON WEYMARN, N.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 731-736, 2004.
- WANG, C. Y.; CHAN, H.; LIN, H. T.; SHYU, Y. T. Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from *Bacillus* sp. NTU-06. **Annals of Applied Biology**, v. 156, n. 2, p. 187-197, 2010.
- WANG, Q.; CEN, Z.; ZHAO, J. The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: an angle of omics. **Physiology**, v. 30, n. 2, p. 97-106, 2015.
- WANG, M.; HAMER, R. J.; VAN VLIET, T.; OUDGENOEG, G. Interaction of water extractable pentosans with gluten protein: effect on dough properties and gluten quality. **Journal of Cereal Science**, v. 36, n. 1, p. 25-37, 2002.
- WANG, M.; VAN VLIET, T.; HAMER, R. J. Interaction of water unextractable solids and xylanase with gluten protein: effect of wheat cultivar. **Journal of cereal science**, v. 41, n. 3, p. 251-258, 2005.
- WANG, T.; HONG, M. Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 2, p. 503-514, 2016.
- WANG, X.; LUO, H.; YU, W.; MA, R.; YOU, S.; LIU, W.; ...YAO, B. A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. **Food chemistry**, v. 199, p. 516-523, 2016.
- WEJSE, P. L.; INGVORSEN, K.; MORTENSEN, K. K. Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. **Extremophiles**, v. 7, n. 5, p. 423-431, 2003.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, New York, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.
- WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 305, 1988.
- WOOD, I. P.; COOK, N. M.; WILSON, D. R.; RYDEN, P.; ROBERTSON, J. A.; WALDRON, K. W. Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. **Food chemistry**, v. 198, p. 125-131, 2016.
- YAMANE, C.; AOYAGI, T.; AGO, M.; SATO, K.; OKAJIMA, K.; TAKAHASHI, T. Two different surface properties of regenerated cellulose due to structural anisotropy. **Polymer journal**, v. 38, n. 8, p. 819-826, 2006.

YANG, X.; CHOI, H. S.; PARK, C.; KIM, S. W. Current states and prospects of organic waste utilization for biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 335-349, 2015.

YANG, W.; BAI, Y.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; MENG, K.; ...YAO, B. A novel bifunctional GH51 exo- $\alpha$ -l-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 197, 2015.

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

YIN, Y. R.; ZHANG, F.; HU, Q. W.; XIAN, W. D.; HOZZEIN, W. N.; ZHOU, E. M.; ...LI, W. J. Heterologous expression and characterization of a novel halotolerant, thermostable, and alkali-stable GH6 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans*. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 4, p. 857-862, 2015.

YUAN, Q. P.; WANG, J. D.; ZHANG, H.; QIAN, Z. M. Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3255-3257, 2005.

ZAFAR, A.; AFTAB, M. N.; UD DIN, Z.; AFTAB, S.; IQBAL, I.; SHAHID, A.; ...; UL HAQ, I. Cloning, expression, and purification of xylanase gene from *Bacillus licheniformis* for use in saccharification of plant biomass. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 294-311, 2016.

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

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences, **Journal of Computational Biology**, New York, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012.

ZHOU, C. Y.; LI, T. B.; WANG, Y. T.; ZHU, X. S.; KANG, J. Exploration of a N-terminal disulfide bridge to improve the thermostability of a GH11 xylanase from *Aspergillus niger*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 62, n. 2, p. 83-89, 2016.

ZHOU, J.; WU, Q.; ZHANG, R.; MO, M.; TANG, X.; LI, J.; ... HUANG, Z. A thermo-halo-tolerant and proteinase-resistant endoxylanase from *Bacillus* sp. HJ14. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 5, p. 423-431, 2014.

ZHU, Y.; LI, X.; SUN, B.; SONG, H.; LI, E.; SONG, H. Properties of an alkaline-tolerant, thermostable xylanase from *Streptomyces chartreusis* L1105 suitable for xylooligosaccharide production. **Journal of food science**, v. 77, n. 5, p. C506-C511, 2012.

ZIMBARDI, A. L.; SEHN, C.; MELEIRO, L. P.; SOUZA, F. H.; MASUI, D. C.; NOZAWA, M. S.; ... FURRIEL, R. P. Optimization of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 2, p. 2875-2902, 2013.