

Chadia Chahud Maestrello

Imobilização de xilanases de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223: utilização em reator para obtenção de xilose a partir de sabugo de milho para produção de xilitol

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara/SP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Araraquara/SP

2022

M186i Maestrello, Chadia Chahud
Imobilização de xilanases de *Aspergillus labruscus* ITAL
22.223 : utilização em reator para obtenção de xilose a partir de
sabugo de milho para produção de xilitol / Chadia Chahud
Maestrello. -- Araraquara, 2022
117 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

1. Resíduos agrícolas. 2. Fermentação em estado sólido. 3.
Xilitol. 4. *Aspergillus*. 5. Enzimas imobilizadas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Imobilização de xilanases de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223: utilização em reator para obtenção de xilose a partir de sabugo de milho para produção de xilitol"

AUTORA: CHADIA CHAHUD MAESTRELLO

ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



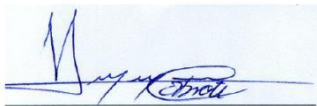
Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES (ParticipaçãoVirtual)
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto



Profa. Dra. DANIELA ALONSO BOCCHINI (ParticipaçãoVirtual)
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO (ParticipaçãoVirtual)
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. HAMILTON CABRAL (ParticipaçãoVirtual)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto



Prof.^a Dr.^a MARINA KIMIKO KADOWAKI (ParticipaçãoVirtual)
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas / Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste - Cascavel, Paraná

Araraquara, 02 de setembro de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Chadia Chahud Maestrello

Nome em citações bibliográficas: MAESTRELLO, C. C.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP. Avenida Bandeirantes, 3900, Vila Monte Alegre, 14040-901 – Ribeirão Preto/SP – Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2018 – 2022 - Doutorado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título “Imobilização de xilanases de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223: utilização em reator para obtenção de xilose a partir de sabugo de milho para produção de xilitol e etanol”. Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães.

2016 – 2018 – Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título “Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 cultivado em Fermentação em Estado Sólido utilizando resíduos agroindustriais”. Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães.

2010 – 2014 – Graduação em Engenharia de Energias Renováveis e Ambiente, modalidade Bacharelado. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Brasil. Título: Produção de Biogás a partir de cama de frango e dejetos bovinos. Orientador: Prof. Dr. João Antônio Galbiatti.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015 – Água em curso (Carga horária: 12h)

Agência Nacional de Água, ANA, Brasil.

2015 – Capacitação em Energia Renováveis – O Biogás (Carga horária: 16h)

Observatório de Energias Renováveis para a América Latina e Caribe, ONUDI, Uruguai.

2016 – Escrita Científica (Carga horária: 6h)

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2016 – Espectrometria de Massas – Avançado (Carga horária: 8h)

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Brasil.

2019 – Docência no Ensino Superior: fundamentos e práticas pedagógicas (Carga horária: 30h)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

2021- Fundamentos da cromatografia líquida para indústria farmacêutica – HPLC (Carga horária: 8h)

Cromatografando, HPLC, Brasil.

2022 – HPLC sem mistério (Carga horária: 8h)

Cromatografando, HPLC, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA/ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2013 – 2015 – Membro Discente da Comissão Própria de Avaliação.

Universidade de Araraquara, UNIARA.

2015 – 2016 – Bolsista FAPESP, treinamento técnico TT3

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

2016 – 2018 – Projeto de Mestrado: Análise secretômica da linhagem *Aspergillus* sp. cultivado em fermentação em estado sólido (FES) contendo bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

2020-2021 – Estágio docência. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

CAVALCANTI, R. M. F.; **MAESTRELLO, C. C.**; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Immobilization of the Tannase From *Aspergillus fumigatus* CAS21: Screening the Best Derivative for the Treatment of Tannery Effluent Using a Packed Bed Reactor. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** *JCR*, v. 9, p. 1-12, 2021.

MAESTRELLO, C. C. Reaproveitamento de resíduos de madeira da construção civil para geração de energia: Revisão. **Construindo**, v. 3, p. 1-9, 2021.

MAESTRELLO, CHADIA CHAHUD; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Potential of the *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 as a producer of cellulolytic enzymes and xylanase under solid-state fermentation. **International Journal of Scientific Reports**, v. 4, p. 147-152, 2018.

CHAHUD, E.; **MAESTRELLO, C. C.**; CHAHUD, B.; NUNES BRANCO, L. A. M. Proposta de dimensionamento de peças de madeira submetida à tração paralelas às fibras*. **Construindo**, v. 9, p. 1-7, 2017.

Resumos publicados em anais de congress

AVALCANTI, R. M. F.; **MAESTRELLO, C. C.**; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Imobilização da tanase de *Aspergillus ochraceus* e aplicação na síntese de propil galato analisada por TLC e FTIR. In: Congresso Online Internacional de Bioquímica, 2020, Divinópolis. Congresso Online Internacional de Bioquímica, 2020.

CAVALCANTI, R. M. F.; **MAESTRELLO, C. C.**; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Tratamento enzimático do chá verde em reator de leito fixo com tanase imobilizada em esferas de alginato. In: Semana de Bioquímica Aplicada, 2020, Viçosa. Semana de Bioquímica Aplicada, 2020. v. 1. p. 67-69.

CAVALCANTI, R. M. F.; **MAESTRELLO, C. C.**; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Immobilization of the *Aspergillus ochraceus* tannase and application of the derivate in enzymatic hydrolysis of tannins of grape juice and black tea. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

MAESTRELLO, C. C.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Hydrolysis of xylans extracted from corn cobs by free and immobilized xylanase produced by *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

MAESTRELLO, C. C.; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Produção e caracterização parcial da xilanase de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 em fermentação em estado sólido. In: VIII Congresso Farmacêutico e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2018. v. 39.

Apresentação de Trabalhos

CAVALCANTI, R. M. F.; **MAESTRELLO, C. C.**; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Imobilização da tanase de *Aspergillus ochraceus* e aplicação na síntese de propil galato analisada por TLC e FTIR. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; **MAESTRELLO, C. C.**; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Tratamento enzimático do chá verde em reator de leito fixo com tanase imobilizada em esferas de alginato. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).

MAESTRELLO, C. C.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Hydrolysis of xylans extracted from corn cobs by free and immobilized xylanase produced by *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; **MAESTRELLO, C. C.**; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Immobilization of the *Aspergillus ochraceus* tannase and application of the derivate in enzymatic hydrolysis of tannins of grape juice and black tea. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MAESTRELLO, C. C.; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Produção e caracterização parcial da xilanase de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 em fermentação em estado sólido. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MAESTRELLO, C. C., JORGE, J. A., GUIMARÃES, L. H. S. Production of Enzymes of the Cellulolytic Complex by *Aspergillus labruscus* Under Solid State Using Agroindustrial by Products. 2017. (Apresentação de trabalho/Congresso).

MAESTRELLO, C. C., JORGE, J. A., GUIMARÃES, L. H. S. Produção de Enzimas do Complexo Celulolítico de *Aspergillus labruscus* Utilizando Produtos/Resíduos Agroindustriais em Fermentação em Estado Sólido (FES). 2017. (Apresentação de trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE COMISSÕES JULGADORAS

MAESTRELLO, C. C. XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2020. Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

5º Congresso Internacional de Bioenergia. Curitiba-PR, 10 a 13 de agosto de 2010. (Congresso).

6º Congresso Internacional de Bioenergia. Curitiba-PR, 16 a 19 de agosto de 2011. (Congresso).

Encontro Internacional Brasil-Moçambique: Perspectivas para os Biocombustíveis. Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto-SP, 16 de março de 2011. (Encontro).

Semana de Engenharia Bioenergética. Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, 23 a 27 de maio de 2011. (Encontro).

Semana da Engenharia Bioenergética: Inovações Tecnológicas em Energias Renováveis. Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, 01 a 04 de outubro de 2012. (Encontro).

XIV Feira de Cursos da UNIARA. Centro Universitário de Araraquara- UNIARA. 2013. (Feira)

46a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Águas de Lindóia-SP, 27 a 30 de julho de 2017. (Congresso).

2º Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial. Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto-SP, 03 a 06 de setembro de 2017. (Congresso).

VIII Congresso Científico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Produção e caracterização parcial de xilanase de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 em fermentação em estado sólido. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araraquara. 2018. (Congresso).

30º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Hydrolysis of xylans extracted from corn cobs by free and immobilized xylanase produced by *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223. Maceió – AL. 2019. (Congresso).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais (*in memoriam*) Gilberto e Marisa e a minha irmã Muriel, por todo amor, carinho, compreensão e união em todos os momentos desta e de muitas trajetórias.

Agradecimentos

A Deus, primeiramente, pela oportunidade da encarnação nesta Terra para minha própria evolução, me proporcionando luz, força, fé e amor no meu caminhar.

Ao prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, pela oportunidade, confiança depositada, pelos ensinamentos e orientações ao longo dos 6 anos e meio de trabalho e convivência. Muito obrigada.

Aos meus pais, Profa. Dra. Marisa Chahud e Prof. Gilberto Antonio Maestrello, que hoje se encontram na pátria espiritual. Agradeço por terem assumido e desempenhado de forma ímpar a missão de me trazerem ao mundo para que eu pudesse ter a chance de seguir o exemplo da força, garra, luta e dedicação que tiveram ao longo dos anos para comigo e meus irmãos. O legado de amor deixado por vocês me acompanhará por todos os dias da minha vida. Amo vocês eternamente, com a certeza do reencontro.

À minha irmã, Muriel Chahud Maestrello, pela paciência e compreensão durante todos esses 30 anos de convivência. Amo você.

Aos meus tios, Prof. Dr. Fernando Chahud e Adriana Chahud, e aos meus primos, Fernando Jr. e Leonardo, pela convivência excepcional durante esses anos que estive em Ribeirão Preto. Serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim. Amo vocês.

Ao meu tio, Prof. Dr. Eduardo Chahud, o Engenheiro mais admirável que conheci nesta vida, por todo apoio e incentivo de ingressar neste mundo acadêmico, afinal, engenheiro entende engenheiro!!! Obrigada por tudo o que fez e faz por nossa família. Amo você.

Às minhas primas Bruna, Mariana e Natália pela amizade inabalável que veio, literalmente, do berço. Amo vocês eternamente.

Aos meus padrinhos Ricardo Chahud e Eliana Bueno da Silva Chahud que estão presentes em todos os momentos da minha vida, torcendo e incentivando-me a seguir em frente. Amo vocês.

Às minhas tias Daniela e Madalena que se fizeram presente em todos os momentos, felizes ou não, da minha vida. Amo vocês.

Às minhas tias, Adur, Badia, Vitória (*In memoriam*), que sempre acreditaram no meu potencial, incentivando-me em todos os momentos que estivemos juntas neste plano. A saudade é imensa, mas a certeza do reencontro é confortador.

Amo vocês.

Aos meus eternos e fiéis amigos de vida, Jéssica e Paulo, por estarem comigo em todos os momentos nesses últimos 20 anos de amizade. Obrigada por todos os churrascos e jantares. Mas, sobretudo, obrigada por me darem o título de “titia mais babona do planeta” com a chegada da Manuela. Com a certeza de que somos muito mais que amigos, hoje somos uma família. Amo vocês infinitamente.

Aos amigos que Ribeirão Preto me proporcionou. Thaís, Rayza, Pedro, Isabela, Larissa, Fernanda, Camila e Luiz Felipe pelo companherismo, amizade, risadas, traquinagens no laboratório e sobremesas pós almoço. Sem vocês os dias não teriam luz!!!

Ao técnico Maurício pelo auxílio e apoio no laboratório.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela disponibilidade para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Instituto de Química de Araraquara, UNESP, por estarem sempre a disposição quando foi necessário, em especial às secretárias da Pós-Graduação em Biotecnologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Por isso, vê lá onde pisa. Respeite a camisa que a gente suou, respeite quem pode chegar onde a gente chegou! E a gente chegou muito bem, sem desmerecer a ninguém!!!”

Jorge Aragão

RESUMO

O sabugo de milho é um resíduo rico em material lignocelulósico que pode ser reaproveitado para produção de xilitol, por meio de conversão enzimática e posterior fermentação com leveduras do gênero *Candida*. Diante do exposto, esse estudo teve por objetivo a extração de xilana de sabugo de milho para ser hidrolisada por xilanase de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 imobilizada e a xilose, obtida da hidrólise enzimática, utilizada em fermentação com *Candida tropicalis* ATCC 750 para produção de xilitol. As xilanas extraídas apresentaram baixa contaminação por proteínas (<0,45%) e fenóis (<0,1%) e quando hidrolisadas enzimaticamente, foi possível constatar, através do CCD, bandas de nítidas de xilose, xilobiose e xilotriose. Na caracterização da atividade enzimática, utilizando xilana comercial como substrato, a enzima apresentou temperatura ótima na faixa de 55–75 °C, pH ótimo de reação de 4,5 e 5,5, termoestabilidade em 45 °C por 120 min e estabilidade ao pH na faixa de 3,0 a 5,0 por 1 h. Para xilana extraída de sabugo de milho (ABST) 5% utilizada como substrato, a temperatura ótima de reação para a enzima foi de 45-60 °C, pH ótimo de reação 3,5 e 5,0, termoestabilidade de 45-50 °C por 24 h e estabilidade ao pH de 80% de atividade em todas as faixas analisadas. Na imobilização da xilanase, utilizando resinas de troca iônica, obteve-se rendimento, eficiência, atividade recuperada e atividade do derivado de 93%, 97%, 100% e 11U/g, respectivamente, para DEAE-Celulose, e de 99%, 98%, 11% e 8,9 U/g, respectivamente, para DEAE-Sephadex. Os derivados apresentaram temperatura e pH ótimo de reação de 55 °C e 5,0, utilizando a xilana ABST como substrato. O derivado DEAE-Celulose foi utilizado em reator enzimático para hidrolisar a xilana ABST, obtendo 2mg/mL de xilose ao final de 48 h. Na fermentação com *C. tropicalis*, a xilose comercial 2% foi 85% consumida a 35 °C em 72 h de fermentação. No ensaio com a xilose obtida da hidrólise da xilana ABST, a levedura consumiu cerca 60% ao final de 96 h e as análises de HPLC indicaram a produção de 1,02 mg/mL de xilitol em 48 h de fermentação. Deste modo, foi possível produzir xilitol a partir da xilose obtida da hidrólise da xilana de sabugo de milho, potencializando a reutilização do sabugo de milho para produção de produtos de alto valor agregado.

Palavras-chaves: Xilana; Xilanase; Xilitol; Imobilização.

ABSTRACT

Corn cob is a residue rich in lignocellulosic material that can be reuse for the xylitol production, through enzymatic conversion and fermentation subsequent with yeasts of *Candida* genus. Given above, this study aimed to xylan extract of corn cobs to be hydrolyzed by immobilized *Aspergillus labruscus* ITAL 22,223 xylanase and the xylose, obtained from enzymatic hydrolysis, used in *Candida tropicalis* ATCC 750 fermentation to xylitol production. The xylans extracted showed low contamination by proteins (<0.45%) and phenols (<0.1%) and, when enzymatically hydrolyzed, it was possible to observe, through the CCD, clear bands of xylose, xylobiose and xylotriose. In the enzymatic activity characterization, using commercial xylan as substrate, the enzyme presented an optimal temperature in range of 55-75 °C, pH reaction optimal of 4.5 and 5.5, thermostability at 45 °C for 120 min and stability at pH in the range from 3.0 to 5.0 for 1 h. For corn cob ABST 5% xylan used as substrate, the optimal temperature for the enzyme was 45-60 °C, optimal reaction pH of 3.5 and 5.0, thermostability of 45-50 °C for 24 h and stability at pH of 80 % of activity in all analyzed range. In enzymatic immobilization, using ion exchange resins, yield, efficiency, recovered activity and derivative activity of 93%, 97%, 100% and 11U/g were obtained, respectively, for DEAE-Cellulose, and 99%, 98 %, 11% and 8.9 U/g, respectively, for DEAE-Sephadex. Derivatives showed an optimal reaction temperature and pH of 55°C and 5.0, using ABST xylan as substrate. The DEAE-Cellulose derivative was used in an enzymatic reactor to hydrolyze ABST xylan, obtaining 2mg/mL of xylose after 48 h. The fermentation with *C. tropicalis*, the commercial xylose 2% was consumed 85% at 35 °C in 72 h of fermentation. The assay with xylose obtained from ABST hydrolysis, the yeast consumed about 60% at in 96 h and HPLC analyzes production indicated of 1.02 mg/mL of xylitol in 48 h of fermentation. In this way, it was possible xylitol production from xylose obtained from the xylan hydrolysis of corn cob, enhancing reuse of corn cob for products production with high added value.

Keywords: Xylan; Xylanase; Xylitol; Immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de milho nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul no ano de 2021.	23
Figura 2. Componentes externos do sabugo de milho.....	25
Figura 3. Modelo da parede celular da biomassa lignocelulósica	26
Figura 4. Classes das Hemiceluloses.....	28
Figura 5. Hidrólise da hemicelulose pelo complexo xilanolítico.	30
Figura 6. Crescimento de <i>Aspergillus labruscus</i> ITAL 22.223.....	32
Figura 7. Metabolismo de xilose	41
Figura 8. Esquema simplificado dos experimentos realizados no presente estudo.....	45
Figura 9. Fluxograma do processo de extração da xilana.....	48
Figura 10. Esquema do processo de utilização do reator.	58
Figura 11. Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..	66
Figura 12. Atividade enzimática relativa das xilanases dos microrganismos <i>A. labruscus</i> e <i>B. subtilis</i>	69
Figura 13. Hidrólise das xilanas A S20, B S20, A ST e B ST e das misturas da xilanas A S20 + B S20 e A ST + B ST.....	70
Figura 14. Influência da temperatura e do pH na atividade da xilanase livre precipitada, termoestabilidade e estabilidade ao pH, utilizando o substrato xilana comercial	72
Figura 15. Influência da temperatura e do pH na atividade da xilanase livre precipitada, termoestabilidade e estabilidade ao pH, utilizando o substrato ABST.	74
Figura 16. Cromatografia em Camada Delgada	76
Figura 17. Atividade enzimática da xilanase imobilizada em alginato de sódio por diferentes ciclos.	78
Figura 18. Influência da temperatura e do pH na atividade da xilanase imobilizada em DEAE-Celulose, utilizando xilana comercial e xilana ABST como substratos.	83

Figura 19. Influência da temperatura e do pH na atividade da xilanase imobilizada em DEAE-Sephadex, utilizando xilana comercial e xilana ABST como substratos.....	84
Figura 20. Reuso dos derivados DEAE-Celulose e DEAE-Sephadex, utilizando Xilana comercial.....	85
Figura 21. Produção de xilose pelo derivado DEAE-Celulose em reator de leito fixo, usando xilana ABST como substrato.	87
Figura 22. Crescimento da levedura <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	89
Figura 23. Consumo de xilose obtida da hidrólise de ABST <i>C. tropicalis</i> ATCC 750.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de operação do reator.....	59
Tabela 2. Rendimentos das xilanas extraídas, em relação à matéria bruta do sabugo de milho.....	64
Tabela 3. Quantificação de proteínas e fenóis da xilana comercial das xilanas extraídas do sabugo de milho.	68
Tabela 4. Imobilização de xilanase livre em extrato bruto (sem processo de precipitação) de <i>A. labruscus</i> por adsorção em resinas após 24 h.....	79
Tabela 5. Imobilização da xilanase produzida por <i>A. labruscus</i> e precipitada, em resinas DEAE-Sephadex e DEAE-Celulose pH 7,0 após 24h.	81
Tabela 6. Consumo de xilose (%) na fermentação com <i>C. tropicalis</i> ATCC 750.	90
Tabela 7. Parâmetros de bioconversão da xilose extraída de sabugo de milho pela levedura <i>C. tropicalis</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ABST – Xilana extraída de sabugo de milho

ATP – Adenosina trifosfato

ATR – Reflexão total atenuada

BDA – Batata Dextrose Agar

BSA – Albumina de Soro Bovino

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CM – Carboximetil

DEAE – Dietilaminoetil

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico

E.C. – Enzyme Commission

FES – Fermentação em Estado Sólido

FTIR – Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

m/v – Massa por volume

mg/mL – Miligrama por mililitro

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

pI – ponto isoelétrico

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TCA – Ácido tricarboxílico

U – Unidade de atividade enzimática

XDH – xilitol desidrogenase

XI – xilose isomerase

XK – xiluloquinase

XOS – Xilooligossacarídeos

XR – Xilose redutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Hemicelulose	27
1.2. Complexo xilanolítico	30
1.3. Produção de xilanases	31
1.3.1. <i>Aspergillus labruscus</i> ITAL 22.223	32
1.3.2. Fermentação em Estado Sólido	33
1.4. Aplicação das xilanases	35
1.5. Imobilização de enzimas	38
1.6. Metabolismo de xilose	40
1.7. Produção de xilitol	42
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo geral	43
2.2. Objetivos específicos	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Microrganismos e manutenção das linhagens em laboratório	46
3.2. Coleta e preparo do sabugo de milho para extração de xilanas	46
3.3. Extração da xilana	46
3.4. Caracterização físico-química das xilanas	48
3.4.1. Análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	48
3.4.2. Quantificação de proteínas das xilanas extraídas e dos extratos enzimáticos	49
3.4.3. Quantificação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu	49
3.5. Produção enzimática em Fermentação em Estado Sólido (FES)	49
3.6. Precipitação da xilanase	50
3.7. Determinação da atividade xilanásica	51

3.8. Caracterização da xilanase livre	52
3.9. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	52
3.10. Imobilização.....	53
3.10.1. Encapsulação em alginato de sódio reticulado com CaCl ₂ e MnCl ₂ 53	
3.10.2. Adsorção em resina CM Sephadex	53
3.10.3. Adsorção em resina DEAE-Sephadex A25 e DEAE-Celulose	54
3.11. Determinação da atividade xilanásica imobilizada	54
3.12. Determinação da eficiência, rendimento e atividade recuperada após imobilização	55
3.13. Caracterização enzimática parcial da xilanase imobilizada em DEAE- Celulose	56
3.14. Utilização do derivado DEAE-Celulose em reator de leito fixo	57
3.15. Fermentação com a levedura <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	59
3.16. Determinação das melhores condições de fermentação	60
3.17. Determinação do crescimento celular, consumo de xilose e concentração de xilitol	60
3.18. Determinação dos parâmetros da Bioconversão	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Extração de xilanas do sabugo de milho	63
4.2. Caracterização físico-química das xilanas	65
4.2.1. Análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)....	65
4.2.2. Quantificação de proteínas e fenóis totais das xilanas extraídas ...	67
4.3. Hidrólise enzimática das xilanas comercial e extraídas	69
4.4. Caracterização da enzima livre	71
4.5. Análise dos produtos de hidrólise das xilanas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	75
4.6. Imobilização	77

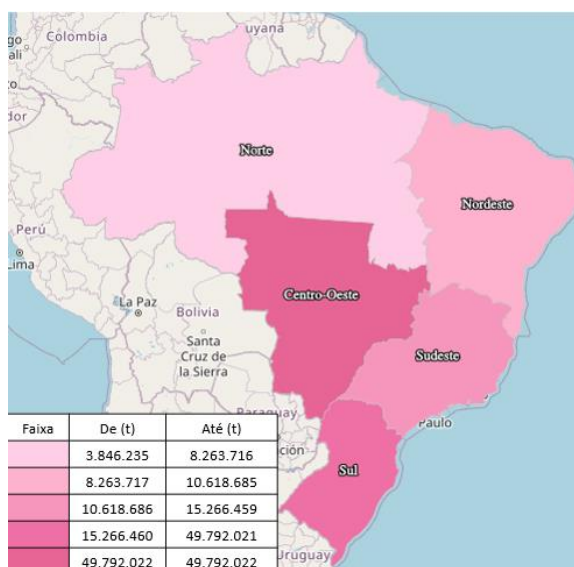
4.6.1. Imobilização em alginato de sódio	77
4.6.2. Imobilização em resina CM Sephadex, DEAE- Sephadex A25 e DEAE- Celulose por adsorção	79
4.6.3. Caracterização enzimática da xilanase imobilizada em DEAE- Celulose e DEAE-Sephadex	82
4.6.4. Reuso dos derivados	85
4.7. Utilização do derivado em reator de leito fixo.....	86
4.8. Fermentação com levedura <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 utilizando xilose comercial	88
4.8.1. Fermentação com <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 utilizando xilose obtida da xilana de sabugo de milho.	91
5. CONCLUSÕES	93
6. REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

O consumo da população de alimentos, farmacêuticos ou energéticos, os modos de produções e alterações no estilo de vida, em decorrência do desenvolvimento econômico, crescimento demográfico urbano e crescimento do setor industrial somado a ineficiência da gestão de resíduos sólidos, tem intensificado cada vez mais a produção de resíduos urbanos e agrícolas, ocasionando de forma desenfreada a poluição ambiental (CONCEIÇÃO; TEIXEIRA, 2021; LIMA; BARROS, 2019; ROMANO; MOLINOS-SENANTE, 2020; VIEIRA et al., 2019).

No contexto agroindustrial, o milho é um dos grãos de maior destaque no Brasil, um dos cinco maiores produtores mundiais. Na safra 2020/21, o país contou com cerca de 20 milhões de hectares de área cultivada, produzindo aproximadamente 87 milhões de toneladas de milho (IBGE, 2022). Na Figura 1 podemos observar a produção nacional do grão por região, segundo o levantamento sistemático da produção agrícola do IBGE em 2021.

Figura 1. Produção de milho nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul no ano de 2021.



Fonte: IBGE (2022).

Nota-se que a região Centro-Oeste é responsável pela maior cota da produção, seguida das regiões Sudeste e Sul, resultado de investimentos mais elevados em mão de obra capacitada e em tecnologia para colheita de milho. Já as regiões Norte e Nordeste, por serem regiões mais pobres, apresentam produções mais baixas e o cultivo é voltado para o consumo interno, já que o milho é uma espécie vegetal eficiente na armazenagem de energia devido a sua capacidade de acumulação de fotoassimilados (compostos resultantes da fotossíntese), portanto é base da alimentação dessas regiões (COSTA FILHO, 2021).

Evidentemente, a colheita do milho gera resíduos. Segundo Costa Filho (2021), estima-se que a cada tonelada de grãos de milho produzida, são gerados 2,3 toneladas de resíduos, sendo que uma lavoura de milho pode gerar de 6 a 12 toneladas por hectares de resíduos, abundantes em carbono e nitrogênio. Os resíduos podem ser divididos em sabugo, folha, caule e palha. Durante a colheita, o maquinário efetua o corte do talo de milho, os grãos são debulhados e armazenados no próprio equipamento, enquanto que uma porcentagem dos resíduos é devolvido ao solo *in situ*, que tem, por finalidade, minimizar a erosão, diminuir a evaporação e impedir o crescimento de plantas daninhas, conservando o solo; a outra parte é utilizada em fornalhas para geração de calor. A palhada (nome genérico dado ao caule, sabugo, folha e palha), também é utilizada, embora menos comum, na suplementação da ração bovina, devido as características nutricionais. Entretanto, a contribuição nutricional do sabugo para o solo é inferior em relação aos demais resíduos, fazendo com que esse resíduo não seja explorado em todo o seu potencial. (COSTA FILHOA, 2021; SANTOS, 2021; CRUZ et al., 2011; SANTOS, 2014; KONZEN; ALVARENGA, 2008; DANTAS, 2013; TRAKARNPAIBOON et al., 2017; VIEIRA JÚNIOR et al., 2020).

A espiga do milho é formada pela fusão de várias espiguetas femininas em um eixo comum, fusão que dá origem ao sabugo, pelas sementes e por brácteas (palha do milho) que protegem o interior da espiga. O sabugo é a parte central da espiga, onde estão presos os grãos de milho. Estruturalmente, o sabugo é dividido em quatro partes fundamentais: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula (Figura 2).

Figura 2. Componentes externos do sabugo de milho.



Fonte: MORENO e FERREIRA (2018).

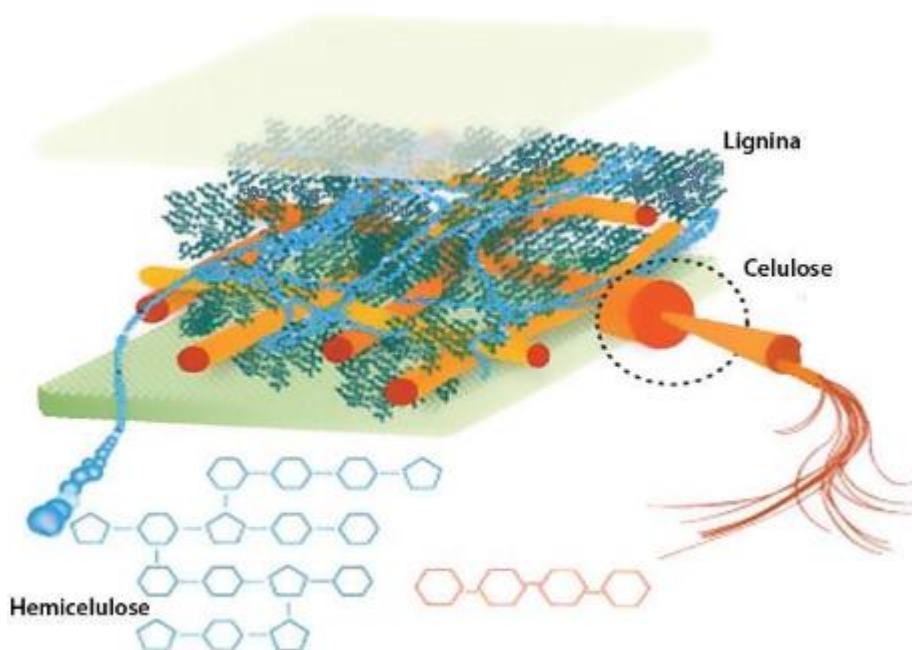
A palha fina é a região externa do sabugo, constitui aproximadamente 5% do sabugo em massa; a palha grossa é a camada que se segue à palha fina e constitui 33% do sabugo em massa; o anel lenhoso é a região interna que constitui mais de 50% do sabugo e a medula é a região interna do anel lenhoso, constituindo apenas 2% do sabugo em massa. Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg são formados pelo sabugo. Apesar de grande quantidade gerada desse subproduto, sua utilização ainda não se mostra compatível com o seu potencial de uso (COSTA FILHO, 2021; SILVEIRA, 2010).

Dentre as opções de utilização industrial do sabugo de milho, devido à sua dureza e resistência, é utilizado como abrasivo e polidor em produtos de limpeza; fabricação de tijolos e cerâmica; na produção do composto químico furfural; na ração animal; como aditivo em óleos vegetais; na produção de massas de bolos, pães ou pizzas por não apresentar grande solubilidade em água ou leite (SILVEIRA, 2010; FOLEY; VANDER-HOOVEN, 1981; ANWAR; BHANGER; YASMEEN, 2003; ZIGLIO et al., 2007).

Além disso, o sabugo de milho, é uma biomassa constituída basicamente por celulose, pectina, lignina e hemicelulose (Figura 3). A biomassa lignocelulósica representa cerca de 90% da biomassa de carbono disponível na biosfera e a proporção de cada um dos componentes não é fixa, pois os teores sofrem influencia de fatores como localização geográfica, condições climáticas,

origem e espécie do vegetal, entre outros (SANTOS, 2021; GUIMARÃES et al., 2013; COSTA FILHO, 2021; SAINI et al., 2015; MUSULE et al., 2016; XU et al., 2020).

Figura 3. Modelo da parede celular da biomassa lignocelulósica



Fonte: Ozmak (2010) adaptado.

A celulose é o biopolímero renovável mais disponível no mundo, correspondendo aproximadamente a 40% de toda a reserva de carbono disponível na biosfera. A celulose possui uma cadeia linear formada por unidades de D-glicose ligadas por ligações β -1,4 unidas paralelamente por ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, e forças de Van der Waals na estrutura cristalina, denominada fibrila elementar altamente ordenada, consistindo em cerca de 40 cadeias de glicano, formando as fibrilas da celulose. A junção destas fibrilas dá a formação das microfibrilas, onde distinguem-se regiões cristalinas que são conhecidas por serem de elevada organização, onde a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação devido à grande quantidade de ligações de hidrogênio presente e regiões amorfas, menos organizadas, onde a fibra apresenta maior grau de flexibilidade devido ao menor

número de ligações de hidrogênio presente (COSTA FILHO, 2021; RABELO, 2010; JEFFRIES, 1990; BAYER; LAMED, 1992; BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992; SILVA, 2010).

Responsável por aproximadamente 30% do carbono orgânico na biosfera, a lignina é o segundo biopolímero mais abundante da biomassa lignocelulósica. Sua principal atuação é como componente estrutural, adicionando força e rigidez às paredes celulares, permitindo, também, o transporte de água e solutos através do sistema das plantas e fornecendo barreiras físicas contra invasões de fitopatógenos e outros estresses ambientais (COSTA FILHO, 2021; EUDES et al., 2014; RAGAUSKAS et al., 2014).

A hemicelulose é outro constituinte da matriz lignocelulósica presente em toda a parede celular vegetal intimamente ligada a celulose e lignina, correspondendo de 15 a 45% da biomassa lignocelulósica, sendo caracterizado pela insolubilidade em água e solubilidade em soluções alcalinas. (GUIMARÃES et al., 2013).

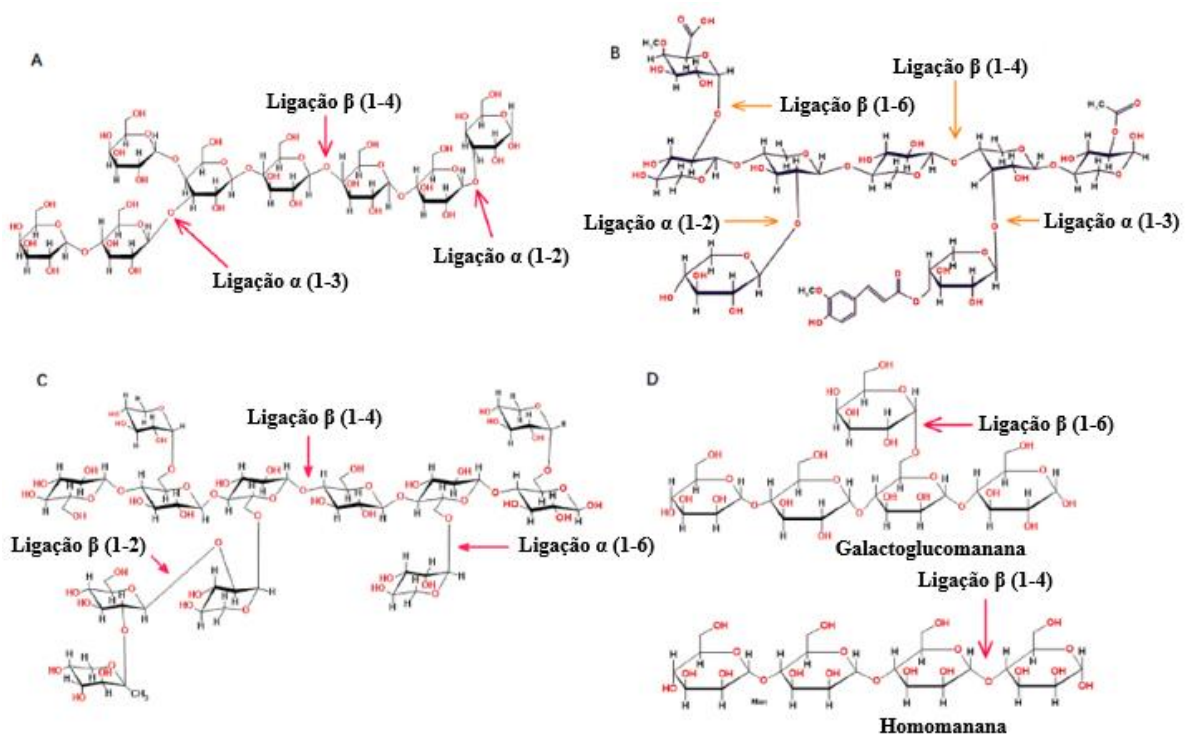
1.1. Hemicelulose

As unidades constituintes das hemiceluloses podem consistir em unidades repetidas de pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-galactose, D-glicose e D-manose) e ácidos urônicos, sendo os principais constituintes os polissacarídeos denominados xilanas e heteroxilanas. Ainda no que diz respeito ao sabugo de milho, tem sido considerado que as xilanas apresentam, em geral, uma estrutura química formada por ácido 4-O-metil-D-glucorônico, L-arabinose e D-xilose, na proporção 2:7:19 (GÍRIO et al., 2010; QASEEM; SHAHEEN; WU, 2021; CAPETTI et al., 2021; SENATORE et al., 2021; AGRAWAL et al., 2021; SANTOS, 2021; MARABEZI, 2009; MILÉO, 2011; SILVA et al., 1998).

Com base na estrutura, as hemiceluloses são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal, que são β -glucanas (Figura 4 A), xilanas (Figura 4 B), xiloglucanas (Figura 4 C) e mananas (Figura 4 D). A xilana é o polímero predominante na estrutura da hemicelulose que forma a parede celular da planta.

É o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose, correspondendo cerca de 33% da biomassa lignocelulósica e é formada por unidades de D-xilose (oligômeros dessas unidades são conhecidos como xilooligossacarídeos) unidas por ligações glicosídicas β (1-4) na cadeia principal. Os xilooligossacarídeos (XOS) podem ser obtidos a partir da hidrólise da xilana utilizando enzimas do complexo xilanolítico (KAUSHAL et al., 2021; SILVA et al., 1998; QASEEM, SHAHEEN e WU, 2021).

Figura 4. Classes das Hemiceluloses: A- β -glucanas; B- xilanas; C- xiloglucanas e D- mananas.



Fonte: Qaseem, Shaheen e Wu (2021), adaptado.

As β -glucanas (Figura 4 A) e xiloglucanas (Figura 4 C), assim como a celulose, possuem um importante papel na estrutura e função da parede celular, uma vez que elas estão envolvidas no suporte e reticulação da matriz celulósica através de ligações de hidrogênio com a celulose, com outras hemiceluloses e pectinas. Estruturalmente elas são similares à celulose, pois seus esqueletos são formados por ligações β -glicosídicas (OGEDA; PETRI, 2010; QASEEM,

SHAHEEN e WU, 2021). As β -glucanas, antes consideradas específicas das paredes celulares de gramíneas, são agora identificadas em muitos outros grupos de plantas e até mesmo em organismos como algas, líquens, fungos e briófitas. Geralmente, consistem em cadeias de glicose unidas por ligações β -1,4 e interrompidas por ligações β -1,3 (QASEEM, SHAHEEN e WU, 2021).

As xilanas são hemiceluloses lineares de paredes secundárias de plantas, com a cadeia principal constituída de resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4. A cadeia principal é frequentemente substituída por várias pequenas moléculas de oligossacarídeos, incluindo xilose, ácido glicurônico arabinose, glicose, entre outros (QASEEM, SHAHEEN e WU, 2021).

A xiloglucana é um polissacarídeo diverso, pois está presente em quase todas as plantas, com quantidades menores de 2% na parede celular da grama até 25% nas paredes celulares primárias de angiospermas. Os resíduos de β -D-glucopiranosil constituem a cadeia principal da xiloglucana e são substituídos por muitos poli ou oligossacarídeos curtos, como arabinopiranosil, galactosil e arabinofuranosil. A maioria das xiloglucanas é classificada em duas categorias principais: tipo I XXXG-fucogalactoxiloglucana, mais comuns em parede celular de dicotiledôneas e tipo II XXGGn – acetoxiloglucana, mais comuns em parede celular de gramíneas (QASEEM, SHAHEEN e WU, 2021).

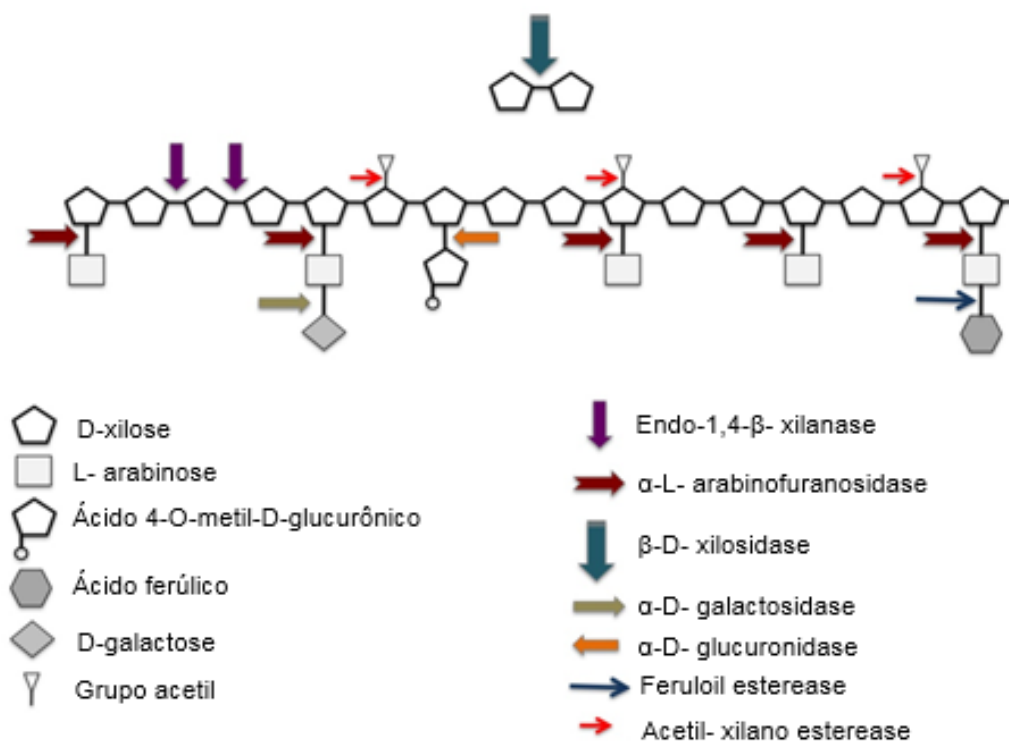
As mananas são heteroglicanos hemicelulósicos estruturalmente complexos envolvidos na manutenção do armazenamento e estrutura da parede celular em plantas. Estruturalmente, as mananas são classificadas em quatro tipos: homomanana, galactoglucomanana, glucomanana e galactomanana. Na homomanana e galactomanana, a cadeia principal consiste exclusivamente de resíduos de manose ligados por ligações β -1,4, enquanto que em glucomanana e galactoglucomanana, a cadeia principal da manose é interrompida por padrões não repetidos de glicose. Além disso, resíduos de galactose também estão ligados a resíduos de cadeia principal de manosil (QASEEM, SHAHEEN e WU, 2021).

Como observado, as hemiceluloses possuem em sua estrutura uma variedade de sacarídeos que podem ser obtidos por meio de hidrólise enzimática, utilizando diversas enzimas que constituem o complexo xilanolítico.

1.2. Complexo xilanolítico

As principais enzimas do complexo xilanolítico são as endo 1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), acetil-xilana esterases (EC 3.1.1.72), feruloil esterases (EC 3.1.1.73), α -D-galactosidases (EC 3.2.1.22), α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139) e *p*-cumárico esterases (EC 3.1.1.10). Estas enzimas atuam sinergicamente hidrolisando de forma randômica as ligações tanto ao longo da cadeia principal, liberar XOS de diferentes tamanhos, quanto sobre as cadeias laterais (Figura 5) (CAPETTI et al., 2021; LI et al., 2019; KAUSHAL et al., 2021; MOREIRA; FILHO, 2016).

Figura 5. Hidrólise da hemicelulose pelo complexo xilanolítico.



Fonte: Souza (2013), adaptado.

As endo 1,4- β -D-xilanases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas internas da cadeia principal, liberando XOS, xilobiose e xilose e as β -D-xilosidases atuam sobre os XOS e a xilobiose, liberando xilose. Já a remoção dos grupos substituintes é catalisada pelas enzimas acessórias: as α -L-

arabinofuranosidases remove resíduos de arabinose, as α -glucuronidases liberam ácido glucurônico ou metilglucurônico, as acetil-xilana esterases hidrolisam ligações acetil-éster, as α -galactosidases removem resíduos de galactose e as *p*-cumárico esterases e feruloil estereases hidrolisam ligações *p*-cumaroil-éster e feruloiléster, respectivamente (MOREIRA; FILHO, 2016; POLIZELI et al., 2005).

No processo de hidrólise, pode ocorrer inibição das endo-xilanases pelos produtos finais de reação (xilobiose e XOS curtos). Entretanto, como as endo-xilanases e β -xilosidases atuam sinergeticamente, as β -xilosidases desempenham papel importante minimizando a inibição das endo-xilanases, o que possibilita maior eficiência no processo como um todo. Forte sinergismo também é observado entre as endo-xilanases e as enzimas acessórias. Por exemplo, a presença de ramificações de arabinose pode dificultar o acesso das endo-xilanases à cadeia principal e a ação das α -L-arabinofuranosidases removendo resíduos de arabinose potencializa a ação das endo-xilanases (LAGAERT et al., 2014)

1.3. Produção de xilanases

Muitos estudos reportam que as xilanases podem ser produzidas por diferentes organismos como fungos filamentosos, leveduras, bactérias, algas marinhas, sementes, crustáceos e caracóis. Contudo, as principais fontes de enzimas são os fungos e as bactérias. Vale ressaltar que as enzimas produzidas podem ter características diferentes umas das outras, de acordo com a fonte produtora, que as torna úteis em várias aplicações (NAMNUCH; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2021; MANDAR, 2015; POLIZELI et al., 2005; BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016).

Os fungos *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. são reconhecidos como produtores importantes da xilanase devido ao alto rendimento extracelular da enzima. Além disso, xilanases produzidas por fungos tem atividades catalíticas superiores quando cultivados em fermentação no estado sólido, por exemplo, se comparadas com as das xilanases de bactérias e de leveduras. Dentre os gêneros fúngicos mencionados, o *Aspergillus* se

destaca por conter no seu genoma vários genes de xilanases, codificando múltiplas xilanases (MAKELA; HILDÉN; VRIES, 2014; BURLACU, CORNEA e ISRAEL-ROMING, 2016)

1.3.1. *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223

O gênero *Aspergillus*, primeiramente descrito por Micheli em 1729, consiste de fungos filamentosos, anamorfos (reprodução assexuada) e de dispersão cosmopolita, podendo ser encontrados principalmente em material vegetal em decomposição. Em relação à morfologia, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração, sendo a principal característica macroscópica utilizada para classificação, em tons de verde, amarelo, cinza, marrom, preto e branco (BENNETT, 2010; SCHUSTER et al, 2002).

Novas espécies têm sido descobertas anualmente em todo o mundo. *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 é uma espécie isolada da superfície da uva Baga (*Vitis labruscas* L.), muito utilizada para produção de suco de uva concentrado, na região sul do Brasil, pertencendo ao subgênero *Circumdati* seção *Nigri* (Figura 6) (FUNGARO et al., 2017).

Figura 6. Crescimento de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 em meio BDA em tubo de ensaio.



Fonte: Autora.

Existe uma grande dificuldade de identificação de *Aspergillus* seção *Nigri* devido as sutis diferenças morfológicas entre as espécies. Devido a esta dificuldade, os autores Fungaro et al. (2017) fizeram a identificação molecular da

linhagem isolada. Tal linhagem, denominada *Aspergillus labruscus*, apresentou de 85-88% de similaridade com as linhagens *Aspergillus homomorphus* CBS 101889, *Aspergillus aculeatus* CBS 172.66 e *Aspergillus japonicus* CBS 114.51.

Com relação à análise de metabólitos, *Aspergillus labruscus* produz ácido secalônico D e neoxalina, e não produz ocratoxina A e fumonisinas, que são micotoxinas cancerígenas. Em comparação com as linhagens filogeneticamente relacionadas, *Aspergillus saccharolyticus* difere de *Aspergillus labruscus* por produzir aculeno A e B e homomorfosinas, e a linhagem *Aspergillus homomorphus* produz ácido secalônio D, assim como *A. labruscus*, mas difere produzindo homomorfosinas e 3-methoxy-5-hydroxy-9-phenyl-2,4,6,8-nanotetranoic acid lactone (FUNGARO et al., 2017).

Segundo os autores Fungaro et al. (2017), as análises macromorfológicas indicaram que os diâmetros de colônias de *A. labruscus*, quando cultivado em meio Czapeck à 25 °C por 7 dias, variam de 70-77 mm, sendo o micélio amarelo e com baixa esporulação. Nas análises micromorfológicas, a estrutura do conidióforo é unisseriada, com cabeças conidiais esféricas, vesículas 43 x 60 µm, fiálide 7,2-7,8 x 3,8 µm, conídios esféricos 6,5-8 x 6,1-6,9 µm e de coloração preta, aparentemente rugoso. Morfologicamente, *A. labruscus* é semelhante ao *Aspergillus sclerotioniger*, que também possui micélio amarelo, baixa esporulação nas mesmas condições de cultivo e conídios ásperos. A principal diferença entre as duas linhagens é que *Aspergillus sclerotioniger* tem conidióforo bisseriado e produz ocratoxina A (FUNGARO et al., 2017).

Com relação à produção de enzimas por *A. labruscus*, Fungaro et al. (2017) analisaram a produção de tanases e proteases obtendo resultados satisfatórios para ambas enzimas. Maestrello e Guimarães (2018) identificaram que *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 produz xilanase e celulase.

1.3.2. Fermentação em Estado Sólido

Considerando a importância da degradação de biomassa lignocelulósica em processos biotecnológicos, estas podem ser realizadas por via enzimática e a produção de enzimas por fungos filamentosos pode ser conduzida de diferentes formas como, por exemplo, a Fermentação em Estado Sólido (FES).

O desenvolvimento de bioprocessos em FES está ligado a vários aspectos gerais, que incluem adequação de diferentes tipos de microrganismos, substratos e parâmetros de processo. Fungos do gênero *Aspergillus* são comumente relatados nesse tipo de fermentação, uma vez que a FES pode fornecer um habitat natural similar (YAZID et al., 2017).

Em FES, o crescimento do microrganismo ocorre sobre e entre as partículas porosas do substrato, onde a água livre apresenta-se escassa, porém com umidade suficiente, existente na forma adsorvida na matriz sólida. As enzimas produzidas por microrganismos nessa condição, geralmente, são mais estáveis a temperatura e ao pH, e são menos susceptíveis a problemas de inibição pelo substrato (HOLKER; LENZ, 2004; PANDEY; RADHAKRISHNAN, 1992; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Em relação aos substratos, estes devem ser selecionados cautelosamente pois desempenham um papel importante para a produção eficiente e econômica do produto final desejado. Deve ser levar em conta, também, a garantia da disponibilidade e custo desses substratos, visando fornecer nutrientes e suporte físico para o desenvolvimento dos microrganismos. Resíduos agrícolas, industriais e alimentícios são os substratos mais adequados para serem utilizados devido à sua abundância com baixo ou nenhum custo e sua composição química. Além disso, o uso destes pode contribuir para a redução dos problemas de poluição ambiental (YAZID et al., 2017).

Além da seleção dos substratos, outros parâmetros importantes devem ser avaliados para melhorar a eficiência da FES, como umidade inicial do cultivo, tamanho da partícula, pH, temperatura, composição do meio, esterilização, atividade de água, densidade do inóculo e extração do produto. Com relação ao tamanho das partículas, em especial, é evidente que partículas pequenas de substrato podem fornecer uma grande área superficial de suporte à fixação do microrganismo. Entretanto, partículas extremamente pequenas podem resultar na aglomeração do substrato e interferir na oxigenação do meio de cultivo, prejudicando o desenvolvimento do microrganismo. O contrário também pode ocorrer com partículas maiores que, embora ofereça maior aeração, podem limitar a área de superfície para a fixação microbiana (PANDEY, 2003; YAZID et al., 2017; CHEN; HE, 2012; DE CASTRO; SATO, 2015).

O teor de umidade também tem um papel significativo na FES, uma vez que fungos necessitam de umidade em torno de 40-60%. Além disso, a alta umidade pode interferir na difusão do oxigênio. Por outro lado, baixa umidade pode limitar a solubilidade dos nutrientes, dificultando o crescimento microbiano (YAZID et al., 2017; MARTINS et al., 2011; SINGHANIA et al., 2009).

As principais vantagens na utilização da FES são sua simplicidade e o uso de substratos sólidos de baixo custo. Além disso, a ausência de uma fase líquida reduz o risco de contaminação bacteriana e geração de águas residuais ao final do processo. Vale ressaltar, também, a redução do uso de reagentes, e baixo consumo de energia, uma vez que a agitação não é necessária. No entanto, algumas desvantagens podem ser citadas, como por exemplo, impossibilidade de controlar o pH e aeração do meio de cultivo. (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003; HOLKER; HOFER; LENZ, 2004; GABELLE et al., 2012; QUIROZ et al., 2015).

Substratos agrícolas têm sido amplamente usados em FES, principalmente para obtenção de enzimas fúngicas do complexo celulolítico e hemicelulolítico, que apresentam ampla variedade de aplicações, como é o caso das xilanases.

1.4. Aplicação das xilanases

As xilanases são consideradas como uma das enzimas industriais mais importantes e, as produzidas por microrganismos, têm atraído grande atenção do mercado pela sua aplicação biotecnológica em diversos processos, como nas indústrias de alimentos, rações e papel e celulose. (BURLACU, CORNEA e ISRAEL-ROMING, 2016).

Na indústria de papel e celulose, a xilanase é utilizada no processo de remoção da xilana da superfície e dos poros da fibra, que está ligada as camadas de celulose e lignina. A ruptura da xilana leva à separação entre esses componentes, aumentando assim o inchaço na parede da fibra, melhorando a extração de lignina da polpa e facilitando o branqueamento subsequente, uma vez que a enzima é utilizada para melhorar o efeito de branqueamento,

reduzindo o nível de produtos químicos convencionais utilizados para este fim (SHARMA et al., 2020; THOMAS et al., 2015; KAUSHAL et al., 2021).

Na indústria têxtil, a fabricação do tecido é realizada em etapas, onde a fibra passa, em um primeiro momento, pela fiação, engomagem e tecelagem, recebendo o nome de tecido cru. As três etapas seguintes consistem em desengomagem, lavagem e branqueamento do fio, obtendo-se o tecido acabado. Anteriormente, o método convencional de desengomagem envolvia a aplicação de altas temperaturas em um ambiente alcalino sob influência de agente oxidantes, causando danos ao componente celulósico útil da fibra, enfraquecendo assim a resistência da fibra. Mais tarde, foi substituído por tratamento enzimático com xilanase termotolerante e alcalina, sendo um método mais adequado e ecologicamente correto para desengomagem (BAJPAI, 2014; KAUSHAL et al., 2021).

Estudos relatam que a utilização das xilanases como pré-tratamento de culturas de forragem melhoram as propriedades nutricionais da silagem agrícola e grãos de alimentos, provocando a melhora na digestibilidade dos alimentos pelos animais, devido a quebra dos complexos arabinoxilanos (WHITING; ROSE; MACKENZIE, 2019). A inclusão de xilanases em dieta a base de centeio para frangos de corte resulta na redução da viscosidade intestinal, melhorando tanto o ganho de peso quanto a sua eficiência de conversão alimentar (BEDFORD e CLASSEN, 1992).

Na indústria de fermentação, como as cervejeiras, xilanases são usadas como pré-tratamento dos substratos contendo arabinoxilanos (cevada, trigo) reduzindo a viscosidade e aumentando a eficiência do processo (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002). Na panificação, a xilanase, quando combinada com a amilase, proporciona melhoria das características da massa, como extensibilidade, maciez e elasticidade, além de aumentar o volume do pão. O trigo utilizado na fabricação do pão consiste em hemicelulose como a arabinoxilana. A xilanase é capaz de solubilizar em água a arabinoxilana não extraível em arabinoxilana extraível, que ajuda na distribuição uniforme da água em toda a massa (KAUSHAL et al., 2021; BAJAJ; MANHAS, 2021).

Xilanases combinadas com celulases e pectinases ajudam na clarificação de mostos e sucos, estabilização da polpa das frutas e redução na viscosidade, hidrolisando substâncias que dificultam a depuração física ou química do suco, que pode causar turbidez no concentrado (POLIZELI et al., 2005; BEG et al., 2001). Particularmente, α -L-arabinofuranosidase e β -D-glucopiranosidase são usadas para aromatizar mostos, vinhos e sumos de frutas. Além disso, as enzimas xilanolíticas são empregadas na extração de café, óleos vegetais e amidos (SPAGNA et al., 1998; SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002).

Outra aplicação da xilanase é na indústria de detergentes, pois a sua utilização proporciona produtos mais eficazes para limpeza de manchas de frutas, vegetais, solos e gramas (DHIMAN; SHARMA; BINDU, 2008).

A produção de biocombustíveis tem ganhado grande importância, pois os recursos energéticos disponíveis estão diminuindo. A ação combinada da xilanase com várias enzimas como a celulase, manase, ligninase, xilosidase, glucanase e glucosidase, entre outras, pode ser utilizada para obtenção de açúcares fermentescíveis, a partir da biomassa lignocelulósica que, posteriormente, podem ser convertidos em biocombustíveis (bioetanol). Para isso, a produção de bioetanol requer a deslignificação da lignocelulose para liberar celulose e hemicelulose. Os passos seguintes incluem a quebra, pelas enzimas, dos polímeros complexos de carboidratos em unidades monoméricas de açúcares livres e a fermentação de pentose mista e hexoses para produzir o bioetanol (CHAUDHARY et al., 2021; LEE, 1998; KAUSHAL et al., 2021).

A xilana está presente em grande quantidade de resíduos hemicelulósicos. Com acúmulo dos resíduos da agricultura, silvicultura e resíduos sólidos urbanos, faz-se necessário desenvolvimento de processos eficientes de hidrólise enzimática, visando oferecer novas perspectivas para tratamento e utilização desses resíduos, como é o caso da obtenção, pela ação das xilanases, dos XOS, os quais podem ser utilizados na indústria farmacêutica devido as suas propriedades anticancerígenas, imunomoduladoras, antimicrobianas e antioxidantes (GUPTA et al., 2018; MONIZ; HO; DUARTE, 2016; KAUSHAL et al., 2021; SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002).

Apesar da ampla variedade de aplicações da xilanase, a enzima apresenta, de modo geral, estabilidade térmica reduzida e alta sensibilidade as condições industriais, o que contribui para desvantagens importantes no uso da xilanase como catalisadora. Técnicas de melhoramento das propriedades enzimáticas, como a imobilização, têm sido empregadas com sucesso para aumentar a estabilidade das enzimas sob condições adversas como pH e temperaturas extremas (ALAGOZ et al., 2022; KAPOOR e KUHAD, 2007; HOKANSON et al., 2011; DAMIS et al., 2019).

1.5. Imobilização de enzimas

A imobilização enzimática apresenta-se como uma importante alternativa biotecnológica para melhorar as características das enzimas e fazê-las atender as demandas industriais. Neste método, a enzima pode ser confinada, ligada ou retida em um determinado suporte/matriz, podendo sofrer modulações positivas nas propriedades catalíticas. Algumas dessas propriedades são aprimoradas com a imobilização, visando maior desempenho catalítico, estabilidade térmica, variações de temperaturas e pH de reação, tolerância a diferentes faixas de pH. Adicionalmente, oferece outras vantagens como o reuso do derivado, fácil separação dos compostos de reação e redução da inibição. Os suportes a serem utilizados, para viabilizar os processos biotecnológicos, devem possuir resistência física a compressão, fácil derivação, biocompatibilidade, resistência ao ataque microbiano e baixo custo (ASHKAN et al., 2021; SALEM et al., 2021; HOARAU; BADIEYAN; MARSH, 2017; BILAL et al., 2018; ARAGON, 2013; BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; SOUZA et al., 2016). As técnicas mais utilizadas para imobilização são, geralmente, adsorção física, ligação iônica, ligação covalente e encapsulação ou aprisionamento (ALAGOZ et al., 2022; WONG et al., 2019).

O método de encapsulamento é conhecido por aumentar a estabilidade mecânica da enzima e seu tempo de vida operacional. É considerada a técnica mais simples e econômica por não envolver modificações químicas tanto na enzima quanto no suporte. No entanto, deve garantir que a enzima permaneça

retida na rede polimérica e que a livre difusão do substrato e dos produtos ocorra sem barreiras (LAROSA et al., 2018; ADHIKARI; PRAMANIK, 2019; WONG et al., 2019).

No método de adsorção, as enzimas são imobilizadas reversivelmente nos suportes por interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e/ou ligações de hidrogênio. Apesar de ser considerado um método simples e relativamente barato, parâmetros como pH e temperatura podem facilmente enfraquecer as ligações e ocasionar a dessorção da enzima do suporte. Diferente do método de adsorção, no método de ligação covalente, a enzima é imobilizada ao suporte por meio de grupos funcionais presentes em sua superfície, levando a maior rigidez da estrutura enzimática e estabilidade a diferentes condições de reação (temperatura, pH, presença de solventes). As ligações ocorrem entre os aminoácidos presentes na cadeia lateral da enzima, como histidina, ácido aspártico, arginina, entre outros, e os grupos funcionais do suporte. Entretanto, estas ligações podem bloquear o sítio catalítico e ocasionar a perda da atividade enzimática (SOUZA et al., 2016; ADHIKARI; PRAMANIK, 2019)

Para imobilização de enzimas por ligações iônicas, os suportes utilizados, geralmente, são resinas cromatográficas que, apesar dos custos serem relativamente altos, permitem regeneração após repetidos ciclos de utilização, podendo ser recuperada, regenerada e utilizada novamente como suporte. Esses três métodos (adsorção, ligação covalente e ligação iônica) imobilizam a enzima externamente, o que possibilita o fácil acesso ao substrato (ADHIKARI; PRAMANIK, 2019; BASSO; SERBAN, 2019; PAL; KHANUM, 2011).

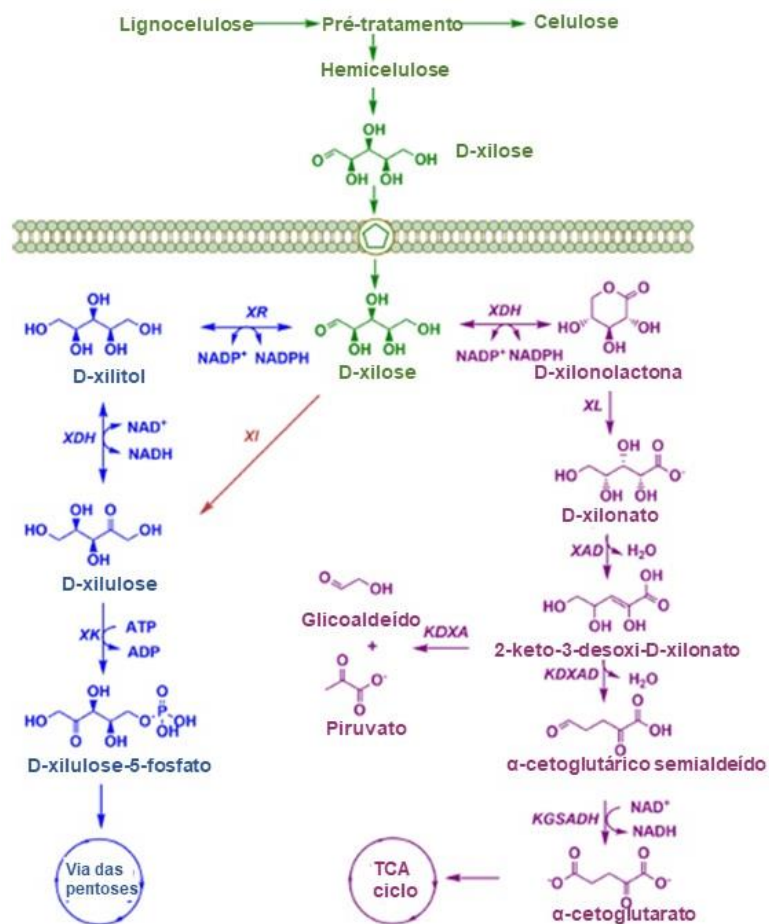
A imobilização de xilanases tem sido descrita na literatura com grande potencial de aplicação. A xilanase de *Aspergillus tamaritii* Kita, quando imobilizada em suporte glioxil-agarose, teve sua termoestabilidade melhorada até 80°C, produzindo com sucesso xilooligossacarídeos em altas temperaturas (HEINEN et al., 2018). Xilanase de *Penicillium janczewskii* foi imobilizada e estabilizada em glioxil-agarose, mantendo 70% da sua atividade inicial após 10 ciclos de utilização do derivado, indicando grande estabilização da enzima (TERRASAN et al., 2017).

O emprego de xilanases produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* em FES e imobilizadas, podem ser utilizadas em biorreatores, facilitando a hidrólise de xilanas, para obtenção de XOS que, por sua vez, podem ser convertidos em xilitol através de fermentação em processos biotecnológicos com o emprego de microrganismos como leveduras do gênero *Candida* e alguns fungos filamentosos, como *Fusarium oxysporum* (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; PANAGIOTOU; CHRISTAKOPOULOS, 2004).

1.6. Metabolismo de xilose

Os microrganismos que catabolizam xilose utilizam três vias distintas. Leveduras e alguns fungos filamentosos empregam uma via oxido-redutora que consiste em duas reações para utilização da xilose, como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Metabolismo de xilose. XR: xilose redutase; XDH: xilitol desidrogenase; XI: xilose isomerase; XK: xiluloquinase; PK: fosfoacetolase; PTA: fosfotransacetilase; ACK: acetato quinase; ACS: acetil-CoA sintetase; XDH: xilose desidrogenase; XL: xilonolactonase; XAD: xilonato desidratase; KDXA: 2-oxo-3-desoxixilonato aldolase; KDXD, 2-oxo-3-desoxixilonato desidratase; α KGSADH, α -oxoglutarico semialdeído desidrogenase



Fonte: Jagtap e Rao (2018), adaptado.

Através de uma reação de oxidação, a xilose é reduzida a D-xilitol pela enzima xilose redutase (XR), usando NADH ou NADPH como cofator. Algumas XRs utilizam apenas NADPH, enquanto que outras podem utilizar tanto NADPH quando NADH, tipicamente com maior especificidade para o primeiro. Em seguida, o D-xilitol é oxidado a D-xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH) estritamente dependente de NAD⁺. A D-xilulose é então fosforilada em D-xilulose-5-fosfato pela xiluloquinase (XK). Leveduras metabolizam D-xilulose-5-

fosfato em vários açúcares fosforilados, como frutose-6-fosfato e gliceroldeído-3-fosfato, que entra na via da glicólise (JAGTAP e RAO, 2018; JEFFRIES, 2006; MOYSÉS et al., 2016; LEE, 1998; KOTTER et al., 1990; JIN et al., 2002).

As bactérias geralmente empregam a via isomerase para conversão de xilose em D-xilulose, utilizando a xilose isomerase (XI). A D-xilulose é então fosforilada pela XK, produzindo D-xilulose-5-fosfato, que então entra no metabolismo central através da via de pentose fosfato (JAGTAP e RAO, 2018).

As Archaeas, juntamente com algumas bactérias, como *Caulobacter crescentus*, possuem vias metabólicas oxidativas da xilose, chamadas de vias de Weimberg e Dahms. Na via de Weimberg, a xilose é oxidada a D-xilanolactona pela D-xilose desidrogenase (XDH), seguida por uma lactonase (XL) para hidrolisar a lactona em D-xilonato. A xilonato desidratase (XAD) age sobre o D-xilonato para produzir 2-keto-3-desoxi-D-xilonato e uma segunda desidratase forma o α -cetosemialdeído. Em seguida, o α -cetosemialdeído é oxidado ao α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A via de Dahms é semelhante à via de Weimberg, exceto que o 2-ceto-3-desoxi-D-xilonato sofre a ação de uma aldolase (KDXA) para formar piruvato e glicolaldeído (JAGTAP e RAO, 2018; NUNN et al., 2010; STEPHEN DAHMS, 1974; WEIMBERG, 1961).

1.7. Produção de xilitol

O xilitol é um açúcar álcool de cinco carbonos (pentose), muito utilizado na indústria alimentícia, como adoçante natural e indústria farmacêutica, como na formulação de creme dental pelo seu poder de prevenção contra cárie. Ele pode ser produzido a partir da xilose, quimicamente e biologicamente (JAGTAP e RAO, 2018; SAHA et al., 2007; RAFIQUL; SAKINAH, 2012; ALBUQUERQUE et al., 2014; JORDAN et al., 2012; LANE et al., 2018).

No caso das vias biológicas, em particular, muitas leveduras empregam a via XR-XDH para o metabolismo de xilose, como é o caso de *Candida tropicalis*. No metabolismo da xilose de *C. tropicalis*, a xilose é captada por uma transferase

específica e reduzida a xilitol por XR com NADPH, seguido de conversão em xilulose pela XDH com NAD⁺. A xilulose é então usada para o crescimento celular e regeneração do NADPH pela via das pentoses fosfato, após a conversão em xilulose-5-fosfato por xilulose quinase com ATP como cofator. Para obter alto rendimento de xilitol, o fluxo de xilose para xilulose deve ser controlado fornecendo oxigênio suficiente para regeneração de NADPH e manutenção das células. Baixos níveis de oxigênio também favorecem a produção de xilitol por conta da menor razão NAD⁺/NADPH, que leva a reação catalisada por XDH e a acumulação de xilitol, alterando a constante de equilíbrio (KIM, RYU e SEO, 1999; KIM et al., 2002). A produção de xilitol nessas leveduras é conhecida por resultar de um desequilíbrio redox associado com as diferentes especificidades de cofator para essas duas enzimas. Esses desequilíbrios tendem a ser ampliados durante o crescimento sob condições limitadas de oxigênio devido à incapacidade das células regenerarem NAD (JEFFRIES, 2006; MOYSÉS et al., 2016; JAGTAP; RAO, 2018).

O xilitol é atualmente produzido em larga escala através da hidrogenação química da xilose, utilizando Ni/Al₂O₃ como catalisador. O custo do processo químico é elevado devido à dificuldade de purificação e separação do xilitol, remoção de subprodutos de hidrolisados de hemicelulose e um baixo rendimento (40-50%) com base em xilano. Processos biotecnológicos para produção de xilitol utilizando leveduras na fermentação da xilose têm se mostrados promissores em relação ao alto rendimento observado (KIM et al., 2002). A utilização de resíduos lignocelulósicos vem ao encontro para complementação na produção de produtos de alto valor agregado, como o xilitol.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Imobilizar a xilanase de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 produzida em FES visando a hidrólise da xilana do sabugo de milho para obtenção de xilose e

seu posterior uso em fermentação com *Candida tropicalis* para a produção de xilitol.

2.2. Objetivos específicos

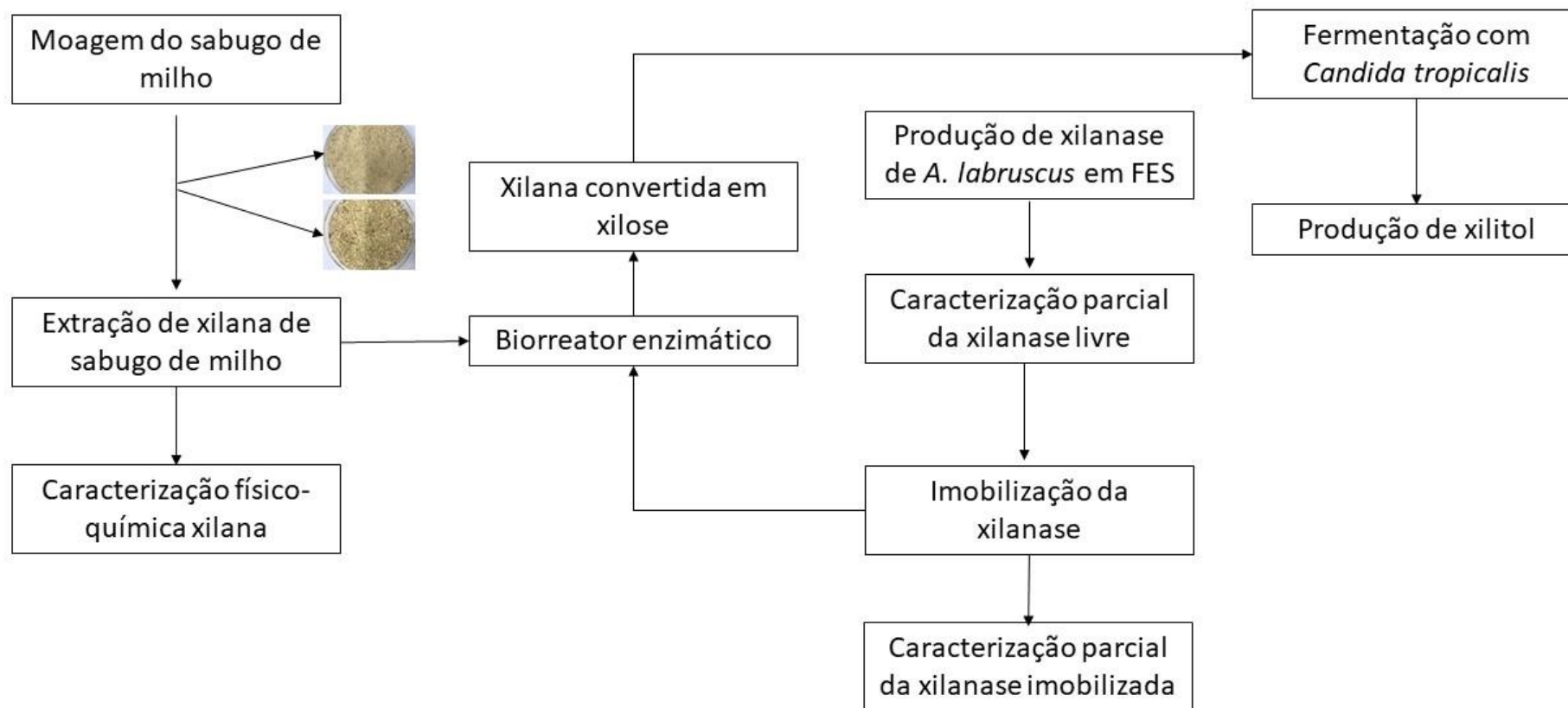
- Produzir xilanases por *A. labruscus* ITAL 22.223 via Fermentação em Estado Sólido (FES);
- Caracterizar as xilanases frente aos parâmetros temperatura e pH de reação, termoestabilidade e estabilidade ao pH;
- Extrair e caracterização físico química da xilana de sabugo de milho;
- Imobilizar as xilanases em diferentes suportes e caracterizar o melhor derivado considerando a influência da temperatura e pH na atividade xilanásica;
- Aplicar a xilanase imobilizada em biorreator enzimático;
- Quantificar a xilose obtida da conversão da xilana no biorreator;
- Determinar das melhores condições de cultivo da levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 e
- Aplicar a xilose obtida da hidrólise da xilana de sabugo de milho na fermentação com *C. tropicalis* para obtenção de xilitol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia de Fungos Filamentosos (LaBEFF) do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP – USP) e no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas do Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

Na Figura 8 está apresentado, simplificada, os procedimentos realizados no presente estudo.

Figura 8. Esquema simplificado dos experimentos realizados no presente estudo.



Fonte: Autora.

3.1. Microrganismos e manutenção das linhagens em laboratório

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram o fungo filamentoso *A. labruscus* ITAL 22.223, gentilmente cedido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas-SP (ITAL) e a levedura *Candida tropicalis* ATCC 750, cedida gentilmente pela Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress e pela Profa. Dra. Marcia Eliana da Silva Ferreira, ambas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

O repique de *A. labruscus* ITAL 22.223 foi realizado em tubos de ensaio inclinado contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA), mantido por 15 dias em estufa a 30 °C e o da *C. tropicalis* foi realizado em tubos de ensaio inclinado contendo meio ágar Sabourau Dextrose, mantido por 48 h em estufa a 30° C e, posteriormente, armazenados em geladeira a 4° C até a sua utilização.

3.2. Coleta e preparo do sabugo de milho para extração de xilanas

Os sabugos de milho foram gentilmente cedidos por um microempreendedor do município de Araraquara, no Estado de São Paulo. O material foi armazenado em sacos plásticos e encaminhado ao LaBEFF da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, em Ribeirão Preto/SP, onde foram lavados com água destilada para retirada de impurezas e secos em estufa de circulação de ar por 24 h a 100 °C. Após a secagem, os sabugos foram moídos em moinho de facas com peneiras de 7 e 20 mesh, denominadas ST (sabugo de 7 mesh) e S20 (sabugo 20 mesh).

3.3. Extração da xilana

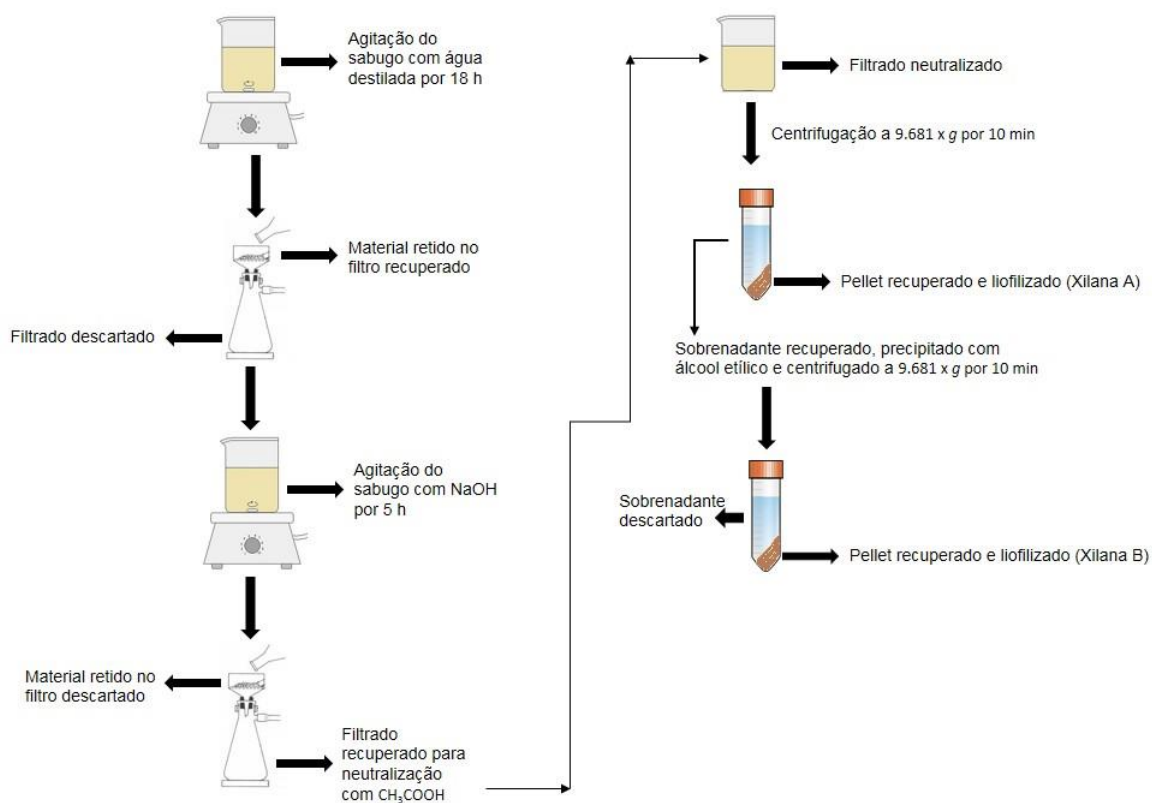
Para extração da xilana utilizou-se a metodologia descrita por Silva et al. (1998) onde, ao S20 e ao ST, foi adicionada água destilada na proporção de 1:

32,5 (m/v), e submetidos a agitação por 18 h em temperatura ambiente. Ao final da agitação, o material foi filtrado em funil de Buchner com papel de filtro Whatman nº. 1 e gaze, com auxílio da bomba a vácuo. O filtrado foi descartado e ao material retido no filtro foi adicionada solução de NaOH 4% na proporção de 1: 20 (m/v), submetidos a agitação por 5 h em temperatura ambiente, sendo filtrados posteriormente, conforme passo anterior. Após a filtração, ao filtrado foi adicionado ácido acético glacial (CH_3COOH) até atingir pH 7, sendo observada a formação de precipitado. O material retido no filtro foi descartado.

A solução contendo o precipitado foi centrifugada a $9.681 \times g$ por 10 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pellet resultante foi denominado “xilana A”. O sobrenadante foi precipitado com adição de álcool etílico na proporção de 1:3 (v/v), deixado em repouso por 15 min em temperatura ambiente e submetido à centrifugação a $9.681 \times g$ por 10 min. O pellet resultante foi denominado “xilana B”. Ambas xilanas foram liofilizadas e armazenadas em freezer para posterior análises físico-químicas bem como rendimentos obtidos da extração.

Na Figura 9 está apresentado o fluxograma do processo de extração de forma simplificada.

Figura 9. Fluxograma do processo de extração da xilana.



Fonte: Autora.

De forma resumida, 4 xilanas foram obtidas neste processo de extração, denominadas A S20, B S20, A ST e B ST.

3.4. Caracterização físico-química das xilanas

3.4.1. Análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As xilanas extraídas, bem como a xilana comercial “Birchwood” (Sigma®), foram analisadas quanto aos espectros de absorção no infravermelho.

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), com o equipamento

VERTEX 70 da Bruker por meio de reflexão total atenuada (ATR). O software utilizado foi o OPUS 7.5, resolução de 4 cm^{-1} , tempo de varredura de 64 scans e comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

3.4.2. Quantificação de proteínas das xilanas extraídas e dos extratos enzimáticos

As quantificações proteicas das xilanas extraída de sabugo de milho e dos extratos enzimáticos foram realizadas como descrito por Bradford (1976). Foi elaborada uma curva analítica utilizando Albumina de Soro Bovino (BSA), na concentração de $2,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ a $25\text{ }\mu\text{g/mL}$, como padrão. A absorvância foi determinada em $\lambda = 595\text{ nm}$. As proteínas foram expressas em mg/mL .

3.4.3. Quantificação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

A quantificação de fenóis totais das xilanas foi realizada seguindo a metodologia de Rao et al. (2018), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. O método foi previamente padronizado por curva analítica de ácido gálico de $1,87\text{ }\mu\text{g/mL}$ a $12,5\text{ }\mu\text{g/mL}$. A reação foi composta por $125\text{ }\mu\text{L}$ de amostra, $125\text{ }\mu\text{L}$ do reagente Folin-Ciocalteu e $500\text{ }\mu\text{L}$ de água destilada. Após 6 min de incubação no escuro, a temperatura ambiente, foram adicionados $1,5\text{ mL}$ de carbonato de sódio (7% m/v) e 1 mL de água destilada. Após 90 min de incubação no escuro a temperatura ambiente, a absorvância foi lida em $\lambda = 725\text{ nm}$ em espectrofotômetro. A concentração de fenóis totais foi expressa em mg/mL .

3.5. Produção enzimática em Fermentação em Estado Sólido (FES)

Para a Fermentação em Estado Sólido (FES) com *A. labruscus* ITAL 22.223, utilizou-se como substrato o farelo de trigo, adquirido no comércio local. Os cultivos em FES foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 mL

contendo 5 gramas de substrato umedecidos com água de torneira na proporção de 1:2 (m/v), com umidade ajustada na faixa de 60 a 65%. Os meios de cultivos foram autoclavados a 1,5 atm por 30 min a 120 °C e, posteriormente, inoculados. Para a inoculação, o meio de manutenção (BDA inclinado) contendo o crescimento fúngico foi adicionado de 10 mL de água destilada estéril, agitado e submetido a raspagem do microrganismo com alça de platina, obtendo-se a suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/mL, de acordo com contagem realizada em contador automático TC20™ (Biorad®). Ao meio de cultivo em FES adicionou-se 1 mL da suspensão de esporos, obtendo-se uma concentração de 2×10^6 esporos/g de substrato. Todo procedimento foi realizado em fluxo laminar para manter a esterilidade e evitar contaminações. Os experimentos foram feitos em triplicatas. Os cultivos foram mantidos em estufa a 25 °C por 7 dias.

Para obtenção do extrato enzimático, os cultivos foram retirados da estufa após o período de incubação, acrescidos de 50 mL de água destilada à temperatura de 4 °C e levados à agitação em shaker orbital à 200 rpm por 30 min à 4 °C. Posteriormente, o material foi filtrado com auxílio de bomba à vácuo, utilizando papel de filtro Whatman nº1 e gaze em um funil Buchner. O filtrado livre de células obtido foi utilizado para a dosagem de proteínas e determinação das atividades enzimáticas. O resíduo retido no filtro foi descartado.

3.6. Precipitação da xilanase

Para precipitação, o filtrado enzimático bruto foi saturado com 60% (m/v) de sulfato de amônio, adicionado aos poucos. A solução foi mantida sob leve agitação a 4 °C por 15 h. Após esse período, a solução foi submetida à centrifugação por 10 min a $9.681 \times g$. O *pellet* foi ressuscitado em água destilada e dialisado contra água destilada por 24 h a 4 °C, realizando a total de 6 trocas de água.

3.7. Determinação da atividade xilanásica

A determinação da atividade xilanásica foi feita utilizando o método dos açúcares redutores (MILLER, 1959) com modificação. Para tanto, foram acondicionados em tubos de ensaio 0,1 mL de substrato xilana Birchwood (Sigma®) 1% (m/v), xilanas extraídas de sabugo de milho, (A S20, B S20, A ST, B ST) 1% e 5% (m/v) e xilana ABST (mistura de 1:1 m/m de xilana A ST e xilana B ST) 1% e 5% (m/v), separadamente, em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5 e colocados em banho termostático a 55 °C para aquecer previamente. Após o aquecimento, foi adicionado 0,1 mL da amostra enzimática em cada tubo, agitando-se cuidadosamente. As reações foram conduzidas em banho termostático a 55 °C durante 5 min. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela adição de 0,1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para o branco, foi adicionado 0,1 mL de substrato, 0,1 mL de DNS e, posteriormente, 0,1 mL da amostra enzimática. Após adição do DNS, os tubos foram aquecidos a 100 °C durante 5 min e em seguida resfriados em banho de gelo. As amostras foram acrescidas de 1,7 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Para cálculo da atividade enzimática foi utilizada uma curva analítica de xilose de 0,2 mg/mL a 1 mg/mL, previamente preparada. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

Adicionalmente, foi realizado a avaliação da hidrólise enzimática dos substratos xilana comercial e xilanas extraídas de sabugo de milho por xilanase purificada de *Bacillus subtilis*, para fins de comparação com a hidrólise pela xilanase de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223. Para análise, utilizou-se o mesmo protocolo descrito no parágrafo anterior.

3.8. Caracterização da xilanase livre

Foram determinadas as melhores condições para atividade enzimática da enzima livre precipitada frente a temperatura e ao pH de reação, termoestabilidade e estabilidade ao pH.

Para determinação da temperatura ótima de atividade xilanásica, a reação enzimática foi conduzida de 40 °C a 80 °C em pH 5,5, como descrito no item 3.7. Para determinação do melhor pH de atividade xilanásica, a reação enzimática foi conduzida sob temperatura ótima, em diferentes valores de pH (3 a 7,5), sendo utilizado tampão Fosfato Citrato (McILVAINE, 1921) 50 mmol L⁻¹.

Para determinação da termoestabilidade das xilanases, as amostras precipitadas foram incubadas em diferentes temperaturas (45-65 °C) por diferentes períodos (20 min a 24 h), sendo retiradas alíquotas a cada 10 min para determinação da atividade enzimática como descrito no item 3.7, sob condições de temperatura e pH ótimo.

Para determinação da estabilidade ao pH das xilanases, as amostras precipitadas foram incubadas em diferentes valores de pH (3-7), utilizando tampão Fosfato Citrato (McILVAINE, 1921) 50 mmol L⁻¹., sendo retiradas alíquotas em 1 h, 3 h e 24 h para análise da atividade enzimática como descrito no item 3.7, sob condições de temperatura e pH ótimo.

3.9. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise qualitativa dos produtos de hidrólise obtidos das xilanas extraídas, pela ação das enzimas livres, foi feita por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel uma solução constituída por butanol: etanol: água destilada (5:3:2; v/v/v). A placa foi revelada com uma solução de orcinol 0,2% em ácido sulfúrico: metanol (1:9 v/v). Os padrões utilizados foram xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose, glicose e celobiose, todos na concentração de 0,1 mg/mL, sendo aplicados 10 µL de cada padrão e amostras na placa.

3.10. Imobilização

A xilanase precipitada foi imobilizada empregando-se os métodos de encapsulação por alginato de sódio, e adsorção em resina CM-Sephadex, resina DEAE-Sephadex A25 e DEAE-Celulose. O processo de imobilização foi acompanhado por meio da determinação da atividade enzimática e da quantificação de proteínas do sobrenadante.

3.10.1. Encapsulação em alginato de sódio reticulado com CaCl_2 e MnCl_2

A solução de alginato de sódio 1,5% (m/v) foi preparada em água destilada e agitada por 2 h para dissolução. Em seguida, 6,7 mL da solução de alginato foram misturados com 2,0 mL de xilanase precipitada, e suavemente agitado por 15 min a 4 °C. A suspensão foi gotejada, com auxílio de uma seringa, na solução CaCl_2 (0,1 mol L⁻¹), previamente preparada em água destilada gelada. As cápsulas formadas foram mantidas em agitação suave na solução CaCl_2 por 10 min a 4 °C. Em seguida, foram separadas por peneiramento e lavadas com tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5,0). O mesmo procedimento foi realizado substituindo CaCl_2 por MnCl_2 (0,1 mol L⁻¹). As cápsulas foram armazenadas em tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5,0) a 4 °C e utilizadas para determinação da atividade enzimática. Como controle, foi utilizado o alginato de sódio 1,5% (m/v) reticulado com CaCl_2 ou com MnCl_2 sem adição da solução enzimática.

3.10.2. Adsorção em resina CM Sephadex

Um grama de resina CM Sephadex foi equilibrado em 20 mL de tampão ácido cítrico 10 mmol L⁻¹ pH 3,0 e pH 4,0, e agitado em temperatura ambiente por 2 h. Após este procedimento, a suspensão foi mantida em repouso para decantar a resina e, em seguida, 15 mL do tampão foram removidos. Para o

processo de imobilização, 10 mL de extrato bruto contendo xilanase foram adicionados a resina e a suspensão foi mantida em agitação por 24 h a 4 °C. Em seguida, o derivado foi filtrado a vácuo e lavado 3 vezes com tampão acetato de sódio (10 mmol L⁻¹ pH 3,0 e pH 4,0) para remover as proteínas não ligadas. O derivado foi armazenado a 4 °C no mesmo tampão e, posteriormente, empregado para determinação da atividade enzimática. A resina CM Sephadex, previamente equilibrada, foi utilizada como controle. Os tampões foram escolhidos de acordo com o ponto isoelétrico (pI) das xilanases de *A. kawachii* IFO 4308, descrita pelos autores Ito et al. (1992), na faixa de 3,5–6,7

3.10.3. Adsorção em resina DEAE-Sephadex A25 e DEAE-Celulose

Um grama de resina DEAE-Sephadex A25 ou DEAE-Celulose foi equilibrado com tampão acetato de sódio 10 mmol L⁻¹ pH 6,0 e no tampão Tris-HCl pH 7,0, separadamente, no volume de 20 mL para ambos. As suspensões foram agitadas em temperatura ambiente por 2 h. Após este procedimento, as suspensões foram mantidas em repouso para decantar as resinas e, em seguida, 15 mL do tampão foram removidos. Para o processo de imobilização, foram avaliados dois diferentes volumes, separadamente, de preparação enzimática: 10 mL de extrato bruto contendo xilanase e 5 mL de xilanase precipitada, sendo adicionadas às resinas equilibradas. A suspensão foi mantida em agitação por 24 h, a 4 °C. Em seguida, o derivado foi filtrado a vácuo e lavado 3 vezes com tampão acetato de sódio 10 mmol L⁻¹ pH 6,0 ou tampão Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,0 para remover as proteínas não ligadas. O derivado foi armazenado a 4 °C nos mesmos tampões e, posteriormente, empregado para determinação da atividade enzimática. As resinas DEAE-Sephadex A25 ou DEAE-Celulose, previamente equilibradas, foram utilizadas como controle. Os tampões foram escolhidos de acordo com o ponto isoelétrico (pI) das xilanases de *A. kawachii* IFO 4308, descrita pelos autores Ito et al. (1992), na faixa de 3,5–6,7

3.11. Determinação da atividade xilanásica imobilizada

Para xilanase imobilizada, a mistura de reação foi composta por 2 mL de substrato (xilana comercial ou extraídas) adicionados do derivado (1 g para enzima imobilizada em alginato de sódio; 0,1 g dos derivados CM- Sephadex, DEAE-Sephadex A25 e DEAE-Celulose, separadamente). Após 10 min de reação, alíquotas de 100 µL foram transferidas para tubos reacionais e 100 µL de DNS foram adicionados, conforme protocolo citado para xilanase livre no item 3.7.

A atividade enzimática dos derivados foi calculada de acordo com a Equação 1 e expressa em U por grama de derivado.

$$\frac{U}{g} = \frac{\text{Absorbância} \times \text{volume de reação (mL)}}{\epsilon \text{ molar} \times \text{tempo (min)} \times \text{massa do derivado (g)}}$$

Equação 1

3.12. Determinação da eficiência, rendimento e atividade recuperada após imobilização

A eficiência do processo de imobilização foi calculada por meio da quantificação de proteínas do sobrenadante após o processo de imobilização e da concentração de proteína oferecida (Equação 2).

$$PI (\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100$$

Equação 2

Onde: P_0 é concentração de proteína no tempo inicial da imobilização (oferecida), P_f é a concentração de proteína ao final da imobilização (no sobrenadante).

O rendimento da imobilização (R%) foi calculado pela relação entre a atividade inicialmente oferecida e a atividade enzimática do sobrenadante após imobilização, de acordo com a Equação 3:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade oferecida} - \text{Atividade do sobrenadante}}{\text{Atividade oferecida}} \times 100$$

Equação 3

A atividade recuperada foi calculada considerando a atividade enzimática dos derivados (CARAVANTE, 2014), de acordo com a Equação 4:

$$\text{Atividade recuperada} = \frac{\text{Atividade do derivado}}{U_{\text{esperada}}} \times 100$$

Equação 4

Em que U esperada foi determinado conforme Equação 5:

$$U_{\text{esperado}} = \left(\frac{\text{Atividade da enzima livre} \times \text{Volume da enzima usado na imobilização}}{\text{Massa do derivado usado na imobilização}} \right) \times \text{Rendimento da imobilização}$$

Equação 5

O rendimento do processo de imobilização utilizado nesta equação é na escala 0-1, onde 100% representa 1.

3.13. Caracterização enzimática parcial da xilanase imobilizada em DEAE-Celulose

Foram determinadas as melhores condições para atividade enzimática do derivado DEAE-Celulose, frente à temperatura e ao pH de reação, utilizando xilana comercial 1% (m/v) e xilana ABST 5% (m/v) como substratos.

Para determinação da temperatura ótima de atividade da xilanase imobilizada, 0,1g do derivado foi usado na reação enzimática, como descrito no item 3.11, em temperatura de 40°C a 80°C.

Para determinação do pH ótimo de atividade xilanásica, 0,1g do derivado foi usado na reação enzimática sob temperatura ótima, como descrito no item

3.11, em diferentes valores de pH (3 a 7,5), sendo que, para pH 3 a 4,5 foi utilizado tampão ácido cítrico 50 mmol L⁻¹, para pH 5 a 6 foi utilizado tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ e pH 6,5 a 7,5 utilizou-se tampão Tris HCl 50 mmol L⁻¹.

3.14. Utilização do derivado DEAE-Celulose em reator de leito fixo

Para a produção de xilose em reator utilizando o derivado, foi empregada a metodologia de Aragon (2013), modificada.

O reator de leito fixo possui dimensões de 19,5 cm de comprimento x 1 cm de diâmetro de entrada interna inferior x 2,5 cm de diâmetro de saída superior, sendo o volume útil do reator de 7,46 mL calculado de acordo com a Equação 6:

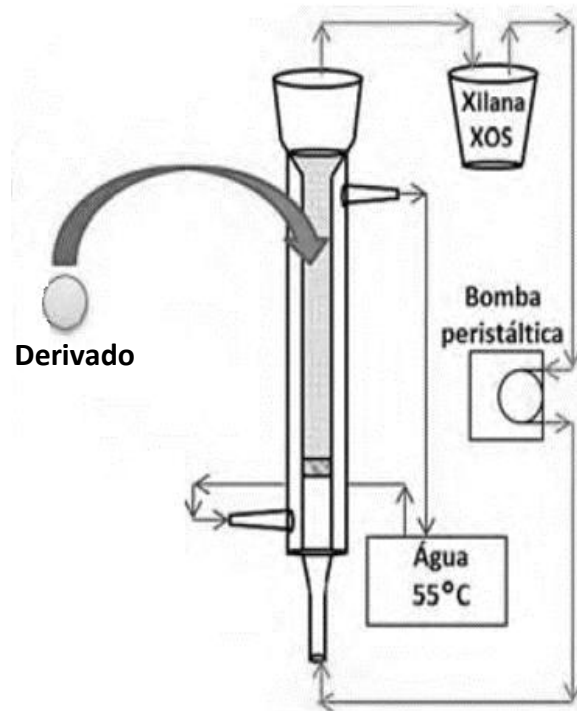
$$V = \pi \cdot (r^2) * h$$

Equação 6

Onde o V é o volume útil do reator (cm³ ou mL), π é número 3,1416, r é o raio (cm) e h é altura do cilindro interno (cm).

No reator foram colocados 0,4 g de derivado DEAE-Celulose contendo xilanase de *A. labruscus* ITAL 22.223, sendo alimentado com 80 mL de solução de xilana ABST 5% (m/v), em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 5,0. O fluxo foi mantido em 60 mL h⁻¹ com auxílio de uma bomba peristáltica. A temperatura de reação foi mantida em 55 °C com uso de um circulador de água. O modo de operação foi contínuo com recirculação, onde a xilana introduzida no reator foi direcionada novamente para o seu reservatório de origem, por 48 h sob agitação, conforme esquema da Figura 10. Amostras foram retiradas periodicamente (3 h, 24 h e 48 h) para quantificação dos açúcares redutores pelo método de Miller (1959). Para quantificação de glicose, utilizou-se o método descrito por Bergmeyer e Bernt (1974) com o kit Enzimático-Colorimétrico Glicose – PP (Gold Analisa Diagnóstica).

Figura 10. Esquema do processo de utilização do reator.



Fonte: Aragon (2013) modificado.

Para o método de Miller (1959), foi utilizada curva analítica de xilose de 0,2 mg/mL a 1 mg/mL, previamente preparada. Para o método Bergmeyer e Bernt (1974), foi utilizada curva analítica de glicose de 0,001 mg/mL a 0,04 mg/mL.

Foram calculados os parâmetros de tempo espacial e tempo de recirculação do substrato. O tempo espacial é o tempo médio gasto para uma porção de fluido percorrer o reator desde a entrada até a saída e é dada pela Equação 7

$$\tau = \frac{V}{Q}$$

Equação 7

Onde τ é o tempo espacial (min), V é o volume útil do reator (mL) e Q é a vazão/fluxo (mL.min⁻¹).

O tempo de recirculação do substrato é o tempo em que o volume total do substrato completa uma volta inteira no reator e é dado pela Equação 8.

$$TR = \frac{\tau * VS}{V}$$

Equação 8

Onde TR é o tempo de recirculação (min), τ é o tempo espacial (min), VS é o volume total do substrato (mL) e V é o volume útil do reator (mL).

Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros utilizados no experimento com o reator.

Tabela 1. Parâmetros de operação do reator.

Parâmetros	Valores adotados
Massa do derivado (g)	0,4
Volume xilana ABST (mL)	80
Vazão (mL.min ⁻¹)	1
Densidade do derivado (g/mL)	1,05
Tempo espacial (min)	7,46
Tempo de recirculação (h)	1,3

Fonte: Autora (2019).

3.15. Fermentação com a levedura *Candida tropicalis* ATCC 750

Para o pré inóculo de *C. tropicalis*, duas alçadas de células foram transferidas do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura estéril constituído de extrato de levedura (10 g L⁻¹), peptona (20 g L⁻¹) e xilose (20 g L⁻¹). O frasco foi agitado a 100 rpm por 30 h a 30 °C. Após esse período, as células da levedura

foram centrifugadas a $9.681 \times g$ por 10 min e o pellet resultante foi ressuspensionado em água destilada estéril. Essa suspensão foi utilizada para inocular os meios de cultivos. Todo o experimento foi realizado em fluxo laminar estéril.

3.16. Determinação das melhores condições de fermentação

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura composto por extrato de levedura (10 g L^{-1}), peptona (20 g L^{-1}) e xilose (20 g L^{-1} e 40 g L^{-1}) em diferentes temperaturas ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $35 \text{ }^\circ\text{C}$) por diferentes períodos (24h, 48h, 72h e 96h). Os meios foram autoclavados previamente a 1,5 atm por 30 min a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e, posteriormente, inoculados com o pré inóculo. A concentração inicial de inóculo foi padronizada em aproximadamente $0,4 \text{ g L}^{-1}$.

Para a fermentação utilizando xilose obtida através da hidrólise da xilana extraída de sabugo de milho (ABST), a mesma foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura composto por extrato de levedura (10 g L^{-1}), peptona (20 g L^{-1}) e xilose ($0,02 \text{ g L}^{-1}$) na temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por diferentes períodos (24h, 48h, 72h e 96h). A concentração de $0,02 \text{ g L}^{-1}$ foi utilizada por ser a concentração máxima obtida da hidrólise de ABST em reator enzimático. Os meios foram autoclavados como descrito anteriormente e a concentração inicial de inóculo foi padronizada em aproximadamente $0,4 \text{ g L}^{-1}$, conforme os autores Cunha, Paiva e Silva (2004).

3.17. Determinação do crescimento celular, consumo de xilose e concentração de xilitol

Alíquotas de 5 mL foram retiradas ao longo de todo o período de fermentação para avaliar o crescimento celular, que foi determinado através da pesagem da biomassa úmida e biomassa seca das leveduras, e consumo de xilose, através do método de quantificação de açúcar redutor (MILLER, 1959). O percentual do consumo de xilose foi calculado de acordo com a Equação 9.

$$\% = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100$$

Equação 9

Em que:

S_i e S_f = Concentração inicial e final de xilose, respectivamente.

A concentração de xilitol, foi determinada por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), equipado com um detector de índice de refração e uma coluna Nucleosil 100-5 NH₂ (250 mm X 4,6 mm), mantida a 60 °C. Solução de acetonitrila 82% foi empregada como fase móvel a um fluxo de 0,8 mL/min. Para as análises, foram utilizadas os padrões de xilose e glicose (10 mg/mL) e xilitol (100 mg/mL) e volume de injeção de 20 µL.

3.18. Determinação dos parâmetros da Bioconversão

De acordo com a concentração de xilose e xilitol, bem como da massa celular da levedura, foram calculados os parâmetros do processo da bioconversão conforme as seguintes equações:

1. Fator de Conversão do Substrato em Células $Y_{X/S}$ ($g_{\text{células formadas}} / g_{\text{substrato consumido}}$)

$$Y_{X/S} = \frac{X}{S} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i}$$

Equação 10

Em que:

X_i e X_f = Concentração inicial e final das células de levedura (g/L), respectivamente;

S_i e S_f = Concentração inicial e final de xilose, respectivamente.

2. Fator de Conversão de Xilose em Xilitol $Y_{P/S}$ ($g_{\text{xilitol formado}} / g_{\text{xilose consumido}}$)

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S} = \frac{Pf - Pi}{Sf - Si}$$

Equação 11

Em que:

Pi e Pf = Concentração inicial e final de xilitol (g/L), respectivamente;

Si e Sf = Concentração inicial e final de xilose (g/L), respectivamente.

3. Fator de Rendimento em Xilitol $Y_{P/X}$ ($g_{\text{xilitol formado}} / g_{\text{células formadas}}$)

$$Y_{P/X} = \frac{P}{X} = \frac{Pf - Pi}{Xf - Xi}$$

Equação 12

Em que:

Pi e Pf = Concentração inicial e final de xilitol (g/L), respectivamente;

Xi e Xf = Concentração inicial e final das células de levedura (g/L), respectivamente.

4. Produtividade Volumétrica em Células Q_X ($g_{\text{células formadas}} / L.h$)

$$Q_X = \frac{X}{t} = \frac{Xf - Xi}{tf - ti}$$

Equação 13

Em que:

Xi e Xf = Concentração inicial e final das células de levedura (g/L), respectivamente; ti e tf = Tempo inicial e final da fermentação (h), respectivamente.

5. Consumo Volumétrico de Xilose Q_S ($g_{\text{xilose consumida}} / L.h$)

$$Q_S = \frac{S}{t} = \frac{S_f - S_i}{t_f - t_i}$$

Equação 14

Em que:

S_i e S_f = Concentração inicial e final de xilose (g/L), respectivamente;

t_i e t_f = Tempo inicial e final da fermentação (h), respectivamente.

6. Produtividade Volumétrica em Xilitol Q_P ($g_{\text{xilitol formado}} / L.h$)

$$Q_P = \frac{P}{t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i}$$

Equação 15

Em que:

P_i e P_f = Concentração inicial e final de xilitol (g/L), respectivamente;

t_i e t_f = Tempo inicial e final da fermentação (h), respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de xilanas do sabugo de milho

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, é possível observar que os maiores rendimentos de extração das xilanas foram obtidos para a xilana B S20 e xilana A ST, respectivamente.

Tabela 2. Rendimentos das xilanas extraídas, em relação à matéria bruta do sabugo de milho.

Xilanas extraídas	Rendimento (% m/m)
Xilana A S20	5,2
Xilana B S20	11,3
Xilana A ST	10,8
Xilana B ST	8,9

S20- sabugo 20 mesh; ST- sabugo 7 mesh

Fonte: Autora.

Silva et al. (1998) obtiveram rendimentos de xilana extraída de sabugo de milho de 4,94% (m/m) para xilana A e 14,84% (m/m) para xilana B em relação à matéria bruta. Os resultados obtidos neste trabalho para xilana A e B de S20 foram próximos ao reportado por esses autores. Para as xilanas ST, os rendimentos foram 2,1 vezes maiores para xilana A e 1,6 vezes menor para xilana B.

A similaridade dos resultados obtidos para as xilanas S20 com os resultados reportados por Silva et al. (1998) pode ser, possivelmente, explicado pelo fato das partículas serem homogêneas, visto que estas aumentam a área de contato entre o material vegetal e o solvente extrator (PRISTA; ALVES; MORGADO, 2008). No entanto, nem sempre há um aumento na eficiência no processo extrativo, pois partículas muito pequenas tendem a formar uma camada compacta de pó, o que dificulta a penetração do solvente (VASCONCELOS et al., 2005), como pode-se observar na diferença de rendimento entre as xilanas A de S20 e ST, onde as partículas de ST são maiores que as de S20, obtendo-se rendimento de 2,07 vezes maior para xilana A ST.

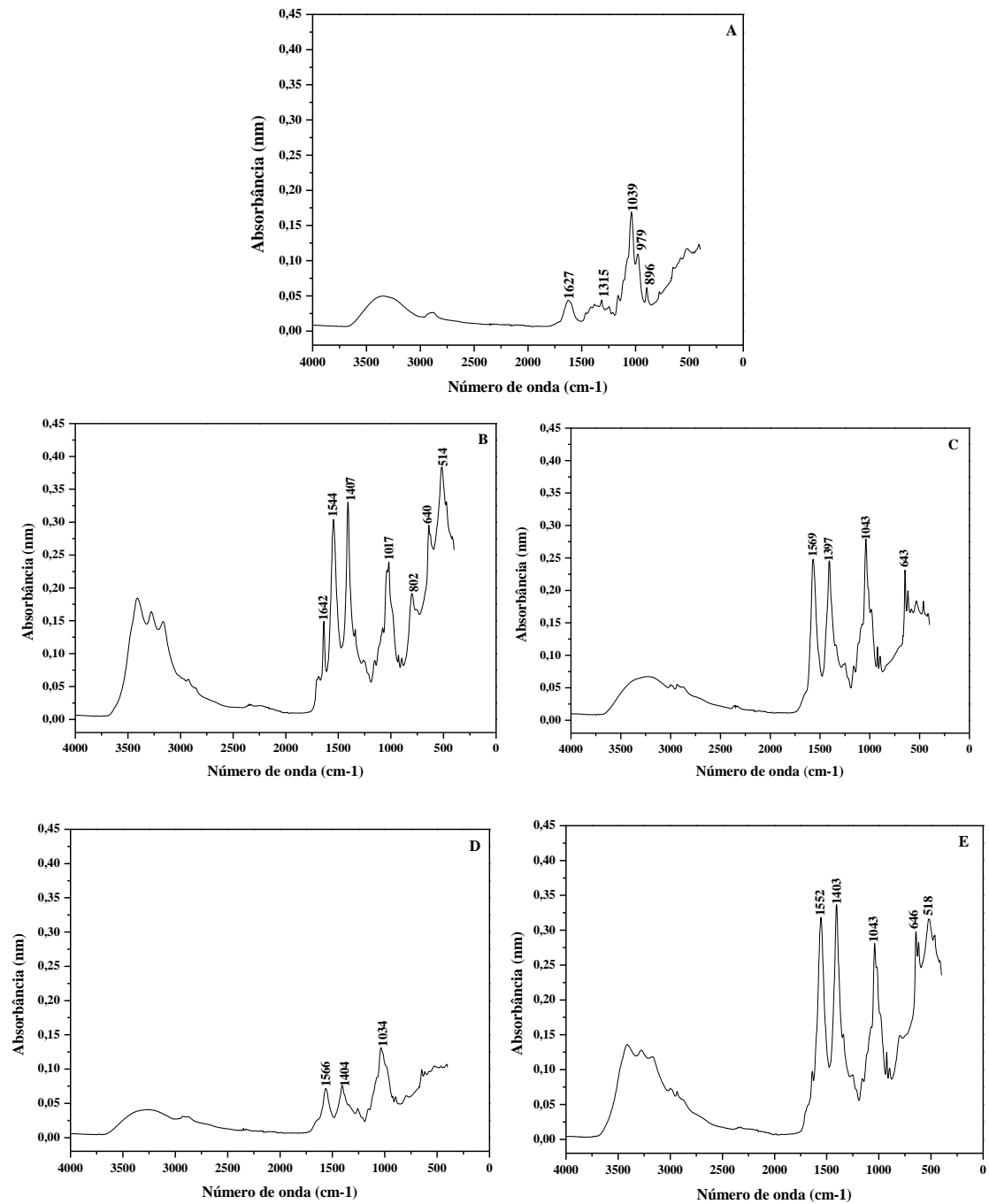
Ebringerova et al. (1998) realizaram extração de xilana de sabugo de milho utilizando metodologia semelhante (extração com NaOH e precipitação com etanol), e obtiveram rendimento total de xilana de 13,5% (m/m), resultado inferior aos obtidos neste trabalho, somando os rendimentos das xilanas A e B para S20 (16,5% m/m) e ST (19,7% m/m).

4.2. Caracterização físico-química das xilanas

4.2.1. Análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho estão apresentados na Figura 11.

Figura 11. Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Xilana Birchwood (A); Xilana A S20 (B); Xilana A ST (C); Xilana B S20 (D); Xilana B ST (E).



Fonte: Autora.

Nos espectros de absorção é possível analisar semelhanças de picos para as xilanas extraídas do sabugo de milho e para a xilana comercial utilizada como padrão.

Na xilana comercial (Figura 11 A), nota-se a presença de um pico intenso em 1039 cm^{-1} que, segundo Silva et al. (1998), é referente às vibrações do anel glicosídico, deformação angular C-O-H, deformação axial C-O e C-O-C, apresentando perfil semelhante à das arabinoxilanas. Esse mesmo pico pode ser observado nos espectros das xilanas A S20 (1017 cm^{-1}), xilana A ST (1043 cm^{-1}), xilana B S20 (1034 cm^{-1}), e xilana B ST (1043 cm^{-1}).

Nos espectros das xilanas extraídas nota-se um pico em torno de 1544 cm^{-1} para xilana A S20 (Figura 11 B), 1569 cm^{-1} para xilana A ST (Figura 11 C), 1566 cm^{-1} para xilana B S20 (Figura 11 D) e 1552 cm^{-1} para xilana B ST (Figura 11 E), que pode ser atribuído à lignina residual no polissacarídeo (deformação axial C=C de anel aromático), que estaria presa ao polissacarídeo por ligações físicas ou químicas (SILVA et al., 1998).

As bandas largas centradas, em todos os espectros, em torno de 3500 cm^{-1} , é atribuída à deformação axial O-H; bandas em 1627 cm^{-1} , no espectro A, e 1642 cm^{-1} , no espectro B, à deformação angular H-O-H característica de água; bandas próximas a 1415 cm^{-1} , nos espectros da Figura 11 B, Figura 11 C, Figura 11 D e da Figura 11 E (1407 cm^{-1} , 1397 cm^{-1} , 1404 cm^{-1} e 1403 cm^{-1} , respectivamente) referem-se à deformação angular de CH_2 , que é considerada uma característica da celulose (ANDRADE et al., 2014); banda em 896 cm^{-1} , no espectro da Figura 11 A, refere-se à deformação C-H e as bandas 640 cm^{-1} , 643 cm^{-1} e 646 cm^{-1} , nos espectros da Figura 11 B, Figura 11 C e da Figura 11 E, respectivamente, referem-se à deformação angular O-H (SILVA et al., 1998).

4.2.2. Quantificação de proteínas e fenóis totais das xilanas extraídas

A quantificação de proteínas e fenóis totais das xilanas extraídas e da xilana comercial é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Quantificação de proteínas e fenóis da xilana comercial das xilanas extraídas do sabugo de milho.

Xilanas	Proteína (%)	Fenóis Totais (%)
Xilana Birchwood	0,018*	0,014*
Xilana A S20	0,26*	0,055*
Xilana B S20	0,11*	0,048*
Xilana A ST	0,40*	0,080*
Xilana B ST	0,43*	0,090*

*desvio padrão < 0,0001

Fonte: Autora.

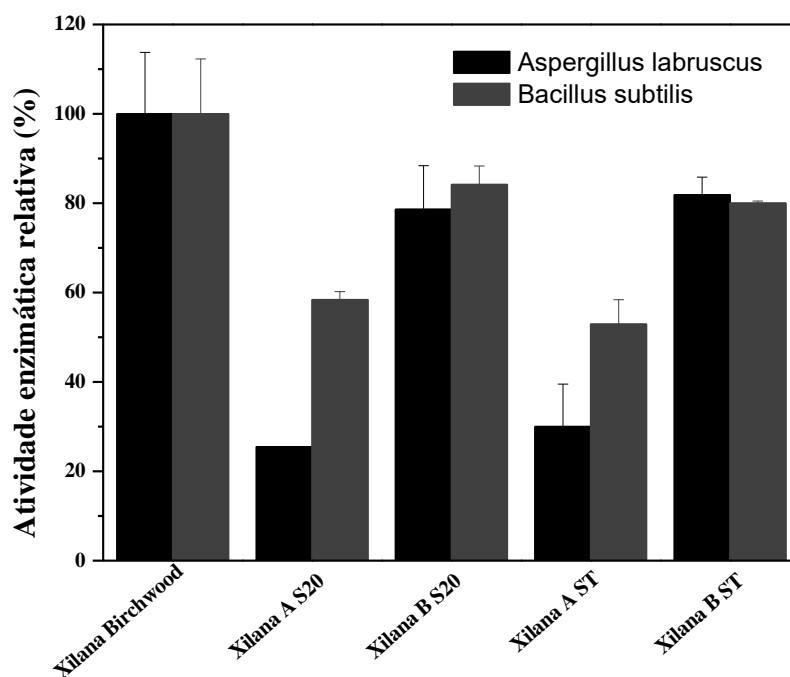
É possível verificar que a concentração de proteínas na xilana comercial Birchwood é inferior se comparada com as xilanas extraídas, o que é esperado visto que o grau de pureza da xilana comercial é elevado. No entanto, o grau de contaminação por proteínas nas xilanas extraídas também foi baixo, corroborando com o estudo de Melo-Silveira et al. (2012), que obtiveram 0,4% de proteína na xilana extraída de sabugo de milho, sendo considerado um ponto positivo para o método de extração utilizado (associação de tratamento alcalino e ultrassom).

No que diz respeito à concentração de fenóis, observa-se que os valores obtidos para as xilanas de sabugo de milho foram superiores em relação à xilana comercial, isso porque, segundo Melo-Silveira et al. (2012), polissacarídeos extraídos de qualquer fonte vegetal podem apresentar variações de contaminações, a depender do método de extração desenvolvido. Os mesmos autores observaram que a concentração de fenóis totais na xilana extraída de sabugo de milho foi de 0,01%, utilizando o solvente orgânico metanol para a precipitação, promovendo uma maior diminuição da solubilidade dos polissacarídeos, diferente do solvente orgânico utilizado no presente estudo (etanol). Quanto menor for a contaminação, seja proteica ou de compostos fenólicos, em relação a quantidade de polissacarídeo, melhor e mais eficiente é o método de extração empregado (MELO-SILVEIRA et al., 2012).

4.3. Hidrólise enzimática das xilanas comercial e extraídas

O potencial hidrolítico da xilanase contida no extrato bruto obtido do cultivo de *A. labruscus* e da xilanase purificada de *B. subtilis*, sobre as xilanas extraídas e a xilana comercial Birchwood (Sigma®), é apresentado na Figura 12.

Figura 12. Atividade enzimática relativa das xilanas dos microrganismos *A. labruscus* e *B. subtilis*; 100% corresponde a $16,06 \pm 0,87$ U/g de substrato e $3,44 \pm 0,42$ U/mL, respectivamente.



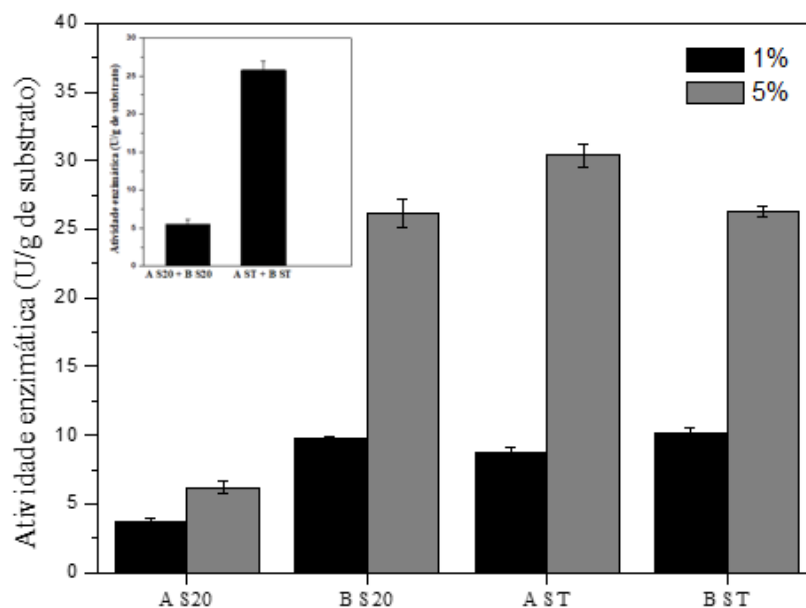
Fonte: Autora.

Nota-se que as xilanas B, tanto de S20 quanto de ST, foram melhores hidrolisadas por ambas enzimas e os resultados obtidos são próximos, em termos de atividade enzimática, com a xilana comercial. Uma possível explicação para atividade enzimática inferior sobre as xilanas A pode ser a possível presença residual de acetato de sódio, formado pelo processo de neutralização (SILVA, 2016). Resíduos de sais podem interferir na atividade, pois as inibições decorrem do fato de que as enzimas podem ser moduladas pelas interações de cátions com resíduos de aminoácidos ao longo de toda a molécula. Estas interações podem aumentar (modulação positiva) ou diminuir

(modulação negativa) a atividade enzimática ao interagir com a amina ou o grupo ácido carboxílico dos aminoácidos (MAESTRELLO; GUIMARÃES, 2018; DAMASO, 2002; ISHIDA et al., 1980).

Na Figura 13 observa-se que a hidrólise das xilanas extraídas na concentração de 5% (m/v) foi superior quando comparada com a hidrólise das xilanas na concentração de 1%, indicando que esse aumento na concentração do substrato disponível não afetou a taxa de reação, proporcionando, deste modo, o aumento da atividade enzimática. Portanto, a concentração de 5% m/v foi escolhida e utilizada nos estudos de caracterização da enzima. Visando posterior aplicação das enzimas imobilizadas em reator para hidrolisar as xilanas extraídas, avaliou-se também a ação da xilanase utilizando a combinação entre a xilana A S20 e a B S20 (Figura 13, inserto), bem como a combinação entre a xilana A ST e a B ST, na proporção de 1:1 (m/m) como substratos.

Figura 13. Hidrólise das xilanas A S20, B S20, A ST e B ST nas concentrações de 1% e 5% (m/v) e das misturas da xilanas A S20 + B S20 e A ST + B ST, nas concentrações de 5% (m/v) (inserto).



Fonte: Autora.

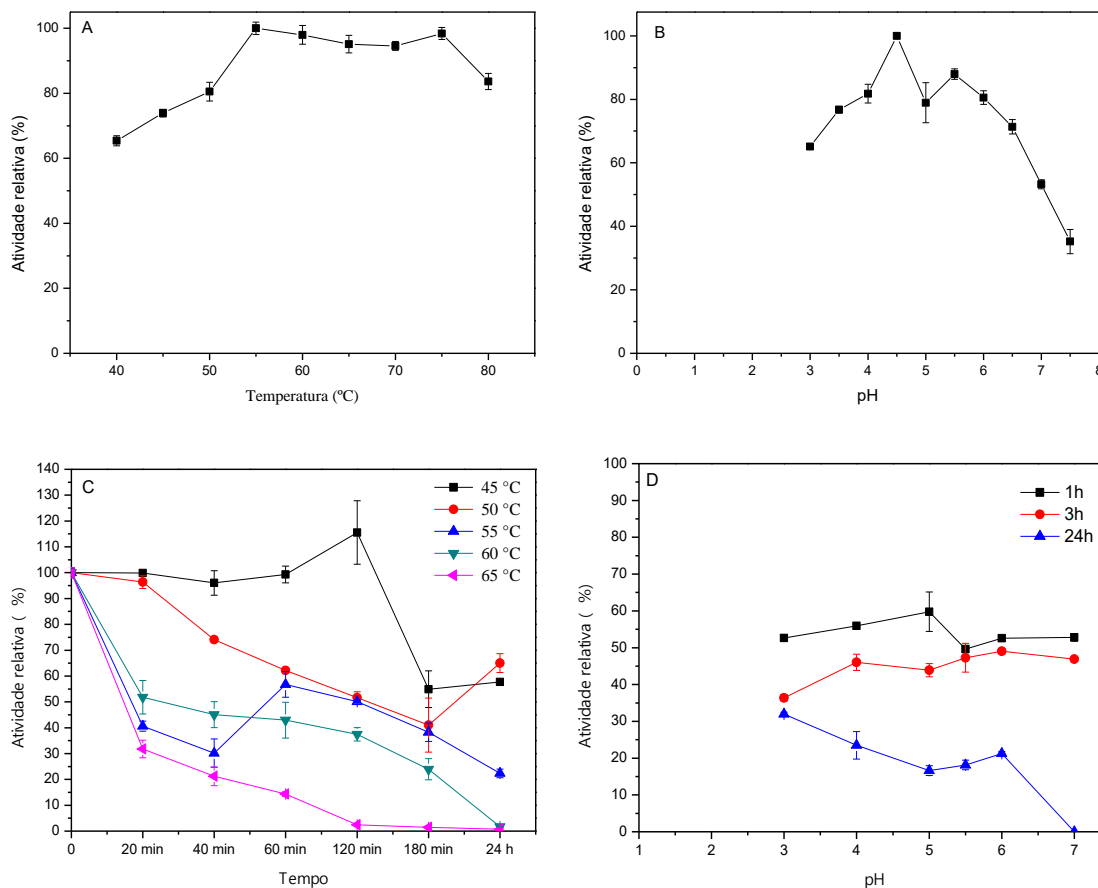
Apesar da xilana B S20 ter sido hidrolisada consideravelmente, usando a combinação das xilanas A S20 e B S20 como substrato, a atividade enzimática foi menor. Com relação às atividades sobre as xilanas A ST e B ST, observa-se os maiores valores de atividade xilanásica para os substratos separadamente e, quando combinadas, não houve aumento na atividade. Assim, optou-se por escolher a combinação A ST + B ST, denominada a partir deste momento como xilana ABST, para continuar os experimentos, considerando o aumento da atividade enzimática e o maior rendimento de extração das xilanas juntas (19,7% m/m).

4.4. Caracterização da enzima livre

Foi realizada a caracterização da enzima livre precipitada, utilizando a xilana comercial 1% (m/v) como substrato reacional, como apresentado na Figura 13.

Nota-se que a maior atividade enzimática, após precipitação foi obtida na faixa de 55°C a 75°C, avaliando a variação de temperatura entre 40 °C e 80 °C (Figura 14 A), confirmando o observado por Maestrello e Guimarães (2018), que foi de temperatura ótima de 55 °C.

Figura 14. Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade da xilanase livre precipitada, termoestabilidade (C) e estabilidade ao pH (D), utilizando o substrato xilana comercial. Onde 100% representa $91,76 \pm 1,76$ U/g de substrato para A e C e $324, \pm 1,93$ U/g de substrato para B e $190,04 \pm 14,68$ U/g de substrato para D, sem incubar a enzima.



Fonte: Autora.

Analisando estudos semelhantes aos de Maestrello e Guimarães (2018), os autores Betini et al. (2009) obtiveram resultados de temperatura ótima de atividade xilanásica para *Aspergillus niveus* na faixa de 55-65°C, quando cultivado em FES na presença de farelo de trigo e Carmona et al. (1997) obtiveram temperatura ótima de atividade de 55°C para a xilanase produzida por *Apergillus versicolor* quando cultivado em meio Vogel suplementado com farelo de trigo. Farinas et al. (2010) obtiveram, para a xilanase de *Aspergillus niger*,

temperatura ótima de 55°C quando o fungo foi cultivado em FES na presença de farelo de trigo. Os autores Ahmad, Butt e Riaz (2013) analisaram a influência da temperatura na atividade de xilanases de *A. niger* quando cultivado em farelo de trigo e obtiveram os melhores resultados na temperatura de 60°C. Xilanases extracelulares produzidas por *Aspergillus caespitosus* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar apresentaram temperatura ótima na faixa de 50-55°C (SANDRIM et al., 2005).

O melhor valor de pH para atividade xilanásica foi 4,5 (Figura 14 B), observando, também, pico secundário de atividade em pH 5,5, similar ao valor reportado pelos autores Maestrello e Guimarães (2018) para a mesma enzima, sugerindo a presença de isoformas. Sandrim et al. (2005) descreveram valor de pH 5,5 para a xilanase de *A. caespitosus*, enquanto que Betini et al. (2009) obtiveram a faixa de pH 5,0 a 5,5 para a xilanase de *A. niveus* e pH 5,5 – 6,0 para *A. niger*.

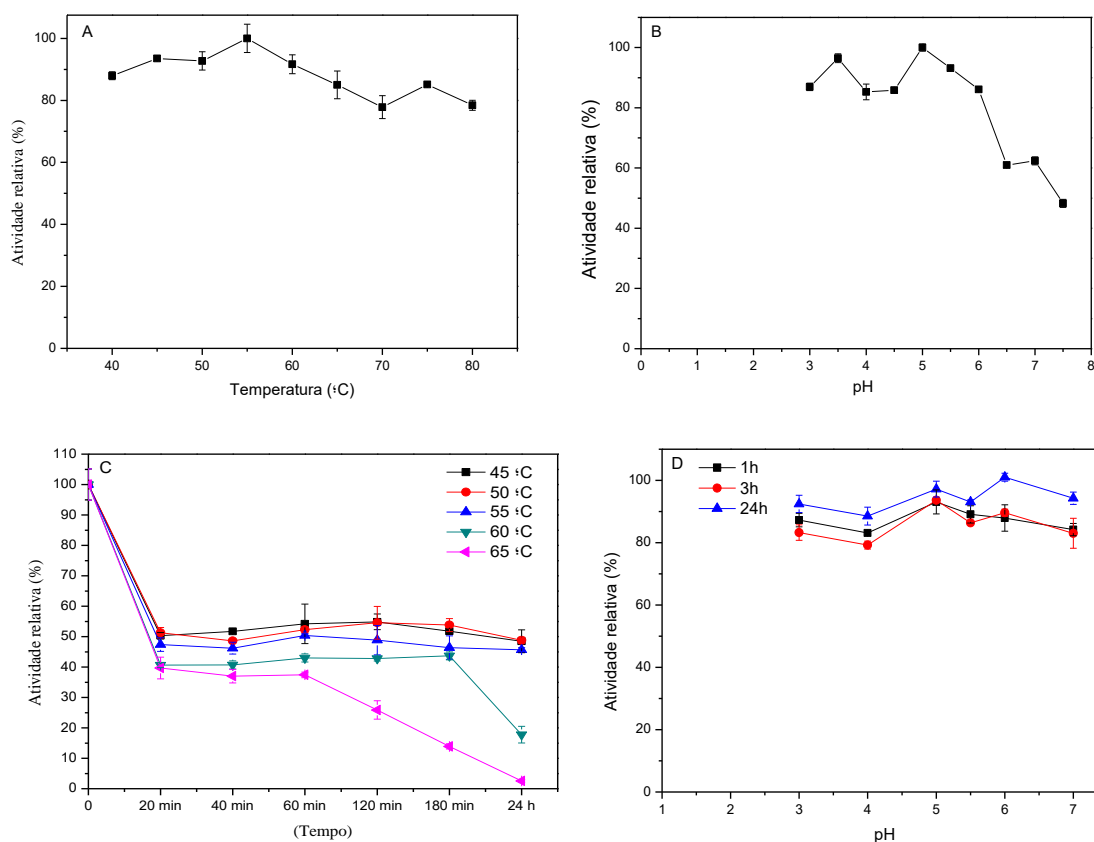
Com relação a termoestabilidade (Figura 14 C) a enzima mostrou-se estável na temperatura de 45 °C por até 120 min. Após esse período, queda da atividade pode ser observada, mas ainda manteve o seu t_{50} (tempo em que 50% da atividade enzimática é mantida) em 24 h. A 50 °C apresentou t_{50} de 120 min. Nas demais temperaturas a estabilidade da enzima foi reduzida já em tempos menores. A xilanase de *Aspergillus casielus* foi estável na temperatura de 45 °C, perdendo apenas 18% de sua atividade aos 90 min (KRONBAUER et al., 2007) e a de *A. fumigatus* SK1 foi estável a 40 °C, ficando a atividade enzimática acima de 80% por 120 min (ANG et al., 2013). A xilanase de *Aspergillus awamori* IOC-3914 foi estável entre 30 °C e 40 °C, mantendo sua atividade acima de 90% por 240 min (AMORIM et al., 2017).

Ao se tratar da estabilidade ao pH (Figura 14 D), a enzima manteve seu t_{50} por 1 h na faixa de pH 3 a 5. No tempo de 3 h, a enzima manteve sua atividade acima dos 35% para todos os valores de pH analisados. Quando incubada por 24 h, a atividade manteve-se entre 10% e 30% entre pH 3 e 6, não apresentando atividade quando mantida em pH 7. Amorin et al. (2017) verificaram que a xilanase de *A. awamori* IOC-3914 foi estável nos valores de pH 5-7 por um período de até 3 h de incubação. Segundo Polizeli et al. (2005), a maioria das

xilanases de diferentes espécies de *Aspergillus* é estável entre pH 4 e 6, corroborando com os resultados obtidos para xilanase de *A. labruscus*.

Foi realizada, também, a caracterização da enzima livre utilizando a xilana ABST (5%, m/v) como substrato, como apresentado na Figura 15.

Figura 15. Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade da xilanase livre precipitada, termoestabilidade (C) e estabilidade ao pH (D), utilizando o substrato ABST. Onde 100% representa $25,77 \pm 1,76$ U/g de substrato para A, $52,20 \pm 0,61$ U/g de substrato para B e $57 \pm 2,26$ U/g de substrato para C e D, sem incubar a enzima.



Fonte: Autora.

Nota-se que a temperatura ótima de reação (Figura 15 A) foi mantida de 45°C a 60 °C, como observado para a atividade na presença da xilana comercial

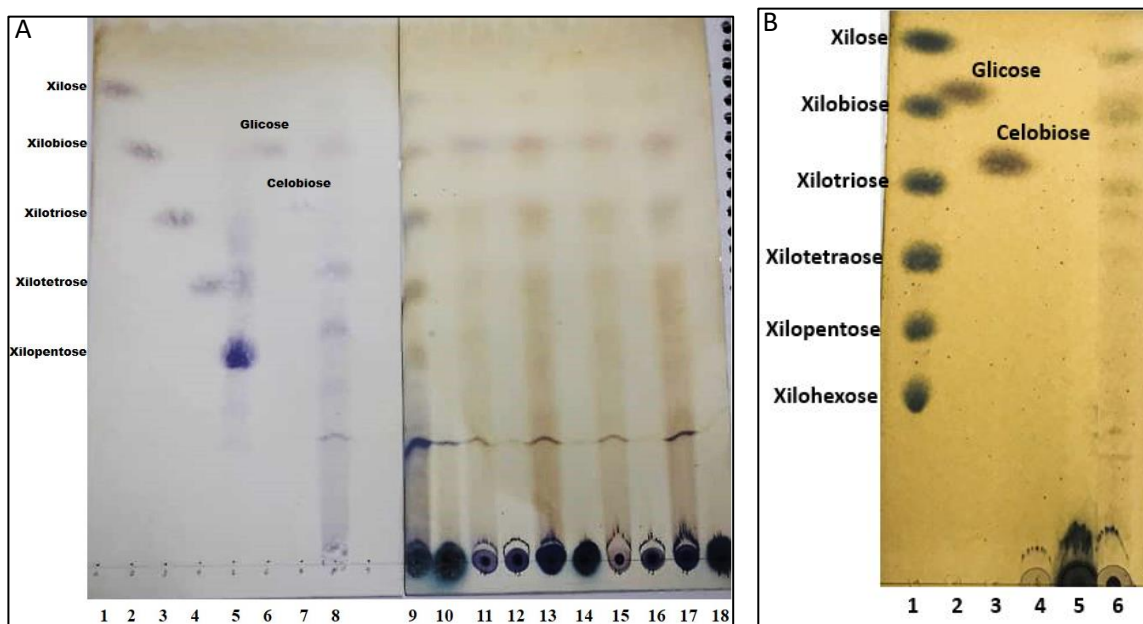
como substrato (Figura 14 A). Com relação ao pH ótimo de reação (Figura 15 B), dois picos de atividade enzimática podem ser observados, sendo um no pH 3,5 e outro no pH 5,0, sugerindo a presença de isoformas. Todas as faixas de temperatura e pH observados estão em concordância com os dados reportados na literatura para atuação da xilanase.

Com relação a termoestabilidade (Figura 15 C), o t_{50} foi de aproximadamente de 20 min nas temperaturas de 45°C e 50°C, sendo a atividade mantida em torno de 50% da inicial até 24 h. Na temperatura de 55°C a atividade foi mantida acima dos 45% por até 24 h; à 60°C, a atividade foi mantida acima dos 40% por 180 min e quando avaliada à 65°C, a mesma permaneceu em 40% por 60 min. A termoestabilidade da enzima na presença da xilana ABST foi menor quando comparada à obtida na presença da xilana comercial (Figura 14 C), sugerindo que a presença de contaminantes na xilana ABST pode ter interferido na atividade enzimática. Na análise de estabilidade ao pH (Figura 15 D) a enzima manteve sua atividade acima dos 80% ao longo de todo o período de incubação para todos os valores de pH analisados.

4.5. Análise dos produtos de hidrólise das xilanas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na Figura 16 é possível observar o perfil em CCD para os produtos de hidrólise das xilanas.

Figura 16. Cromatografia em Camada Delgada para os produtos de hidrólise das xilanas extraídas. Em A) 1 – Xilose; 2 – Xilobiose; 3 – Xilotriose; 4 – Xilotetraose; 5 – Xilopentose; 6 – Glicose; 7 – Celobiose; 8 – Extrato bruto (controle); 9 – Xilana Birchwood hidrolisada; 10 – Xilana Birchwood (controle); 11 – Xilana A 20 hidrolisada; 12 – Xilana A 20 (controle); 13 – Xilana B 20 hidrolisada; 14 – Xilana B 20 (controle); 15 – Xilana A ST hidrolisada; 16 – Xilana A ST (controle); 17 – Xilana B ST hidrolisada e 18 – Xilana B ST(controle). Em B) 1 – xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose e xilohexose; 2- Glicose; 3 – Celobiose; 4 - Extrato bruto (controle); 5 - Xilana ABST (controle); 6 – Xilana ABST hidrolisada.



Fonte: Autora.

A hidrólise da xilana comercial Birchwood (raia 9 da Figura 16 A) levou a obtenção dos XOS xilotriose, xilotetraose e xilopentose, bem como de xilobiose e xilose. Nas demais xilanas hidrolisadas (raias 11, 13, 15 e 17) há a nítida presença de xilotriose e xilobiose. No entanto, é preciso considerar que xilobiose e glicose (raias 2 e 6, respectivamente) encontram-se em posições semelhantes na placa, dificultando a identificação qualitativa destes compostos nas xilanas hidrolisadas. A hidrólise da xilana ABST (raia 6 da Figura 16 B) levou a obtenção de xilose, xilobiose e xilotriose.

Os padrões de glicose e celobiose foram incluídos no CCD devido à presença de picos nos espectros de FTIR (Figura 11) característicos de celulose. Em recentes estudos relatados pelos autores Maestrello e Guimarães (2018), foi constatada a produção de enzimas celulolíticas por *A. labruscus*, sendo elas responsáveis pela hidrólise da celulose e, conseqüentemente, liberação destes compostos (glicose e celobiose) no meio reacional.

Os arrastes observados na análise dos produtos de hidrólise das xilanas (raias 11, 13, 15 e 17 da Figura 16 A e raia 6 da Figura 16 B) obtidas do sabugo de milho dificultou a visualização das bandas de xilotetraose e xilopentose.

Por meio das análises de CCD, pode-se concluir alguns aspectos sobre as enzimas que atuam nesta hidrólise. Alguns trabalhos relatam que a ocorrência de oligossacarídeos, como xilobiose e xilotriose, como produto final da hidrólise da xilanas, caracteriza uma hidrólise do tipo endo, ou seja, das ligações internas da cadeia principal da xilana (SILVA et al., 2015; VERMA; ANAND; SATYANARAYANA; 2013; WU et al., 2013), indicando a presença da enzima endo- β -1,4-xilanase no extrato bruto de *A. labruscus*.

Visando utilização das xilanase de *A. labruscus* para hidrólise da xilana ABST em reator enzimático, bem como a melhoria de suas propriedades, foi realizada a imobilização dessa enzima em diferentes suportes.

4.6. Imobilização

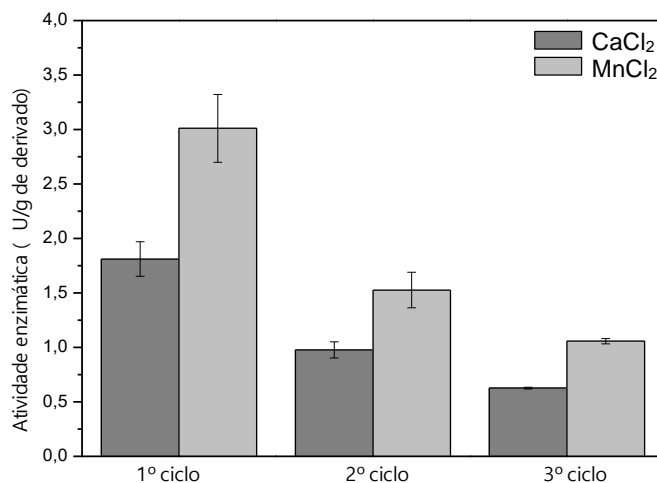
4.6.1. Imobilização em alginato de sódio

A atividade enzimática dos derivados obtidos com alginato de sódio 3% (m/v), utilizando CaCl_2 e MnCl_2 , mostraram que os suportes foram capazes de reter a enzima encapsulada, apresentando 3 ciclos de reuso (Figura 17).

Geralmente, protocolos de imobilização com alginato de sódio utilizam CaCl_2 como agente reticulante e até o momento não foram encontrados relatos na literatura sobre a utilização de MnCl_2 como reticulante. O derivado obtido com MnCl_2 destacou-se em relação ao obtido com CaCl_2 , apresentando atividade

enzimática aproximadamente 1,6 vezes maior. Provavelmente este resultado deve-se a influência dos sais na atividade enzimática, como reportado por Maestrello e Guimarães (2018) que descreveram perda de 50% da atividade da xilanase na presença de CaCl_2 e 18% com o uso de MnCl_2 .

Figura 17. Atividade enzimática da xilanase imobilizada em alginato de sódio por diferentes ciclos.



Fonte: Autora.

Observa-se que no 2º e no 3º ciclo reacional a atividade enzimática caiu cerca de 50% e 65%, respectivamente, considerando ambos os derivados. Bibi, Qader e Aman (2015) imobilizaram a xilanase de *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29 em alginato de sódio 3% (m/v) reticulado com CaCl_2 e obtiveram 5 ciclos de reuso, sendo que no 5º ciclo a atividade enzimática foi reduzida em 80%, enquanto que Mishra et al. (2017), imobilizando a xilanase comercial, obtiveram 4 ciclos, sendo que 50% da atividade enzimática estava mantida no 4º ciclo. Kumar et al. (2017) relataram que a imobilização da xilanase purificada de *Bacillus licheniformis* proporcionou 5 ciclos de reuso, sendo que 80% da atividade foi diminuída no 5º ciclo.

Entre um ciclo e outro foram realizadas 3 lavagens das esferas de alginato com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 5,0, gelado, para retirada de substrato e assim poder ser iniciado um novo ciclo. A razão para a diminuição da atividade enzimática pode se dar pelas lavagens excessivas após cada ciclo, ocasionando a lixiviação das enzimas das esferas de alginato devido ao tamanho

dos poros formados da matriz de alginato, dificultando a retenção da enzima (BRUGNARI et al., 2018; KUMAR; GAUTAM; DUTTI et al., 2016; REHMAN et al., 2013; ADHAM et al., 2010).

Para a xilanase de *A. labruscus*, a utilização de alginato de sódio 3% (m/v) como matriz para a imobilização não apresentou resultados semelhantes aos reportados na literatura, sendo necessário estudos mais aprofundados sobre estes agentes reticulantes, bem como a concentração dos agentes. Sendo assim, não foram realizados testes com a enzima imobilizada em alginato de sódio para a hidrólise das xilanas extraídas do sabugo de milho.

4.6.2. Imobilização em resina CM Sephadex, DEAE- Sephadex A25 e DEAE-Celulose por adsorção

Na Tabela 4 podemos observar o rendimento e a eficiência dos procedimentos de imobilização da xilanase (extrato bruto) em resinas CM-Sephadex, DEAE-Sephadex e DEAE-Celulose em diferentes valores de pH, bem como a atividade recuperada no derivado. Para análise do rendimento e atividade recuperada, as reações enzimáticas foram feitas utilizando xilana comercial como substrato.

Tabela 4. Imobilização de xilanase livre em extrato bruto (sem processo de precipitação) de *A. labruscus* por adsorção em resinas após 24 h.

Suporte	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)	Atividade U/g de derivado
CM- Sephadex pH 3,0	44,00 ± 3,7	91,32 ± 0,62	1,39 ± 0,92	0,34 ± 0,21
CM- Sephadex pH 4,0	51,02 ± 8,3	89,99 ± 0,62	3,62 ± 0,61	1,24 ± 0,44
DEAE- Sephadex pH 6,0	43,60 ± 5,5	95,52 ± 0,11	36,58 ± 1,0	5,85 ± 0,86
DEAE- Sephadex pH 7,0	26,90 ± 0,20	94,60 ± 2,80	51,16 ± 7,5	7,67 ± 1,08
DEAE- Celulose pH 6,0	35,17 ± 1,80	93,71 ± 0,32	44,12 ± 0,21	4,21 ± 0,72
DEAE- Celulose pH 7,0	47,82 ± 0,75	95,96 ± 0,41	55,74 ± 2,37	9,71 ± 2,64

Fonte: Autora.

No que diz respeito as cargas das proteínas, sabe-se que quando uma proteína é exposta a um pH inferior ao seu pI, esta adquire carga positiva, pois os grupos funcionais tendem a ficar protonados (captam H⁺). Se o pH for superior ao pI, a carga total é negativa, pois os grupos funcionais tendem a estar predominantemente desprotonados (perdem H⁺) (SILVA e SILVA, 2010). A resina CM-Sephadex é carregada negativamente, enquanto que as resinas DEAE-Sephadex e DEAE-Celulose são carregadas positivamente.

Na literatura encontra-se descrita uma ampla faixa de pI para as xilanases fúngicas. Os autores Frederick et al. (1985) descreveram pI igual a 9 para xilanase do fungo *A. niger*. Já os autores Wong et al. (1988) obtiveram pI para xilanase deste mesmo fungo variando de 3,6 a 9. Para o fungo *A. kawachii* IFO 4308, o pI das xilanases foi de 3,5 – 6,7 (ITO et al, 1992). Duas xilanases de *A. sojae* apresentaram pI de 3,5 e 3,75 de acordo com Kimura, Sasahar e Tajima (1995).

Considerando, supostamente, que o pI da xilanase de *A. labruscus* encontra-se em uma faixa entre 3 e 5, ao equilibrar a resina CM-Sephadex com tampão ácido cítrico pH 3,0 e pH 4,0, conferimos carga positiva às enzimas para que estas se liguem à resina negativa. Ao equilibrar as resinas DEAE-Sephadex e DEAE-Celulose com tampão acetato de sódio (pH 6,0) e tris-HCl (pH 7,0), conferimos carga negativa às enzimas para que estas consigam se ligar a resina carregada positivamente. Entretanto, Mastrello e Guimarães (2018) reportaram atividade enzimática relativa de 5% e 20% para a xilanase de *A. labruscus* mantida no pH 3,0 e 4,0, respectivamente. Além disso, descreveram a manutenção de apenas 35% da atividade nestes valores de pH após 24 h de incubação. Nos pH 6,0 e 7,0, a atividade enzimática relativa foi de 60% e 40%, respectivamente, com manutenção de 40-50% da atividade quando mantida nestes valores de pH por 24 h. Isto pode explicar a baixa atividade recuperada da enzima nos derivados, quando expostas em pH ácidos.

Nota-se que na imobilização com CM-Sephadex a eficiência, a atividade recuperada e a atividade dos derivados foram menores quando comparadas com as resinas DEAE-Sephadex e DEAE-Celulose (Tabela 4), muito provavelmente por conta da menor resistência das enzimas quando submetidos aos valores de pH utilizados para equilibrar as resinas. Objetivando aumentar o rendimento e a

eficiência da imobilização, optou-se por realizar a imobilização das enzimas precipitadas nas resinas DEAE-Sephadex e DEAE-Celulose, ambas equilibradas em pH 7,0.

Na Tabela 5 podemos observar os dados de rendimento, eficiência e atividade recuperada das xilanases precipitadas imobilizadas no período de 24 h, utilizando a xilana comercial e xilana extraída de sabugo de milho (ABST) como substratos.

Tabela 5. Imobilização da xilanase produzida por *A. labruscus* e precipitada, em resinas DEAE-Sephadex e DEAE-Celulose pH 7,0 após 24h.

Xilanas	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)	Atividade U/g de derivado
DEAE-Sephadex				
Comercial	99,65 ± 0,08	98,79 ± 0,32	11,04 ± 0,97	8,94 ± 0,71
ABST	91,88 ± 1,23	98,17 ± 0,02	22,47 ± 1,48	6,81 ± 0,14
DEAE-Celulose				
Comercial	95,84 ± 1,38	99,40 ± 0,83	81,32 ± 1,81	15,14 ± 1,38
ABST	93,11 ± 2,81	97,35 ± 0,24	100,94 ± 2,78	11,26 ± 0,37

Fonte: Autora.

O rendimento de imobilização aumentou cerca de 3,7 vezes quando comparado com os dados apresentados na Tabela 4 para resina DEAE-Sephadex em pH 7,0, e 2 vezes para a resina DEAE-Celulose em pH 7,0, utilizando xilana comercial como substrato. É possível que isto tenha ocorrido devido a etapa adicional de precipitação das enzimas, já que este procedimento é uma forma capaz de atingir um certo grau de purificação, fazendo com que as enzimas sejam pré-concentradas, promovendo a separação delas da maioria dos compostos do meio. Este rendimento indica que as enzimas foram imobilizadas em quase toda a sua totalidade, sendo também melhorada a eficiência de imobilização.

Em termos de atividade recuperada, a imobilização em DEAE-Celulose destacou-se por apresentar cerca de 80% de atividade recuperada da enzima,

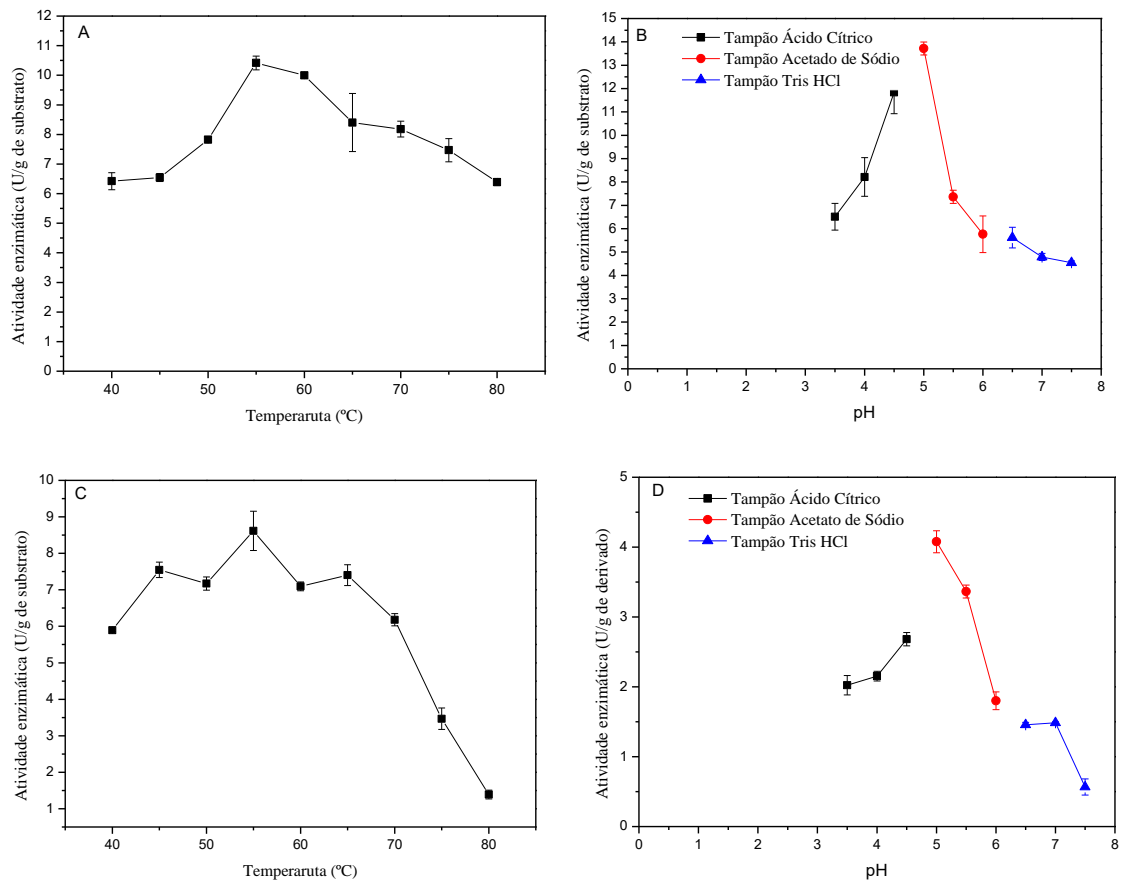
quando analisada com substrato comercial e de 100% quando avaliada frente ao substrato ABST, indicando que a técnica de adsorção foi eficiente, uma vez que esta técnica promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, já que esta é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável (ZHOU et al., 2012), ou seja, depende de onde encontram-se as cargas dos aminoácidos da proteína que sejam contrárias as cargas da resina para que ocorra a interação enzima-suporte. O mesmo não foi observado para a resina DEAE-Sephadex, onde houve baixa atividade recuperada. Uma possível explicação para a baixa recuperação da atividade enzimática é que algumas enzimas podem ter sido ligadas à resina de forma que o sítio ativo tenha ficado comprometido ou restringido do acesso ao substrato presente no meio reacional.

Guerfali et al. (2009) obtiveram 75,3 % de rendimento de imobilização, 71% de eficiência e 97,1% de atividade recuperada para β -xilosidase de *Talaromyces thermophilus* imobilizada em DEAE-Celulose. Já os autores Benassi et al. (2013), imobilizaram β -xilosidase de *A. niger* em DEAE-Sepharose e obtiveram 87% de eficiência e 80% de atividade recuperada. Diante do exposto, os resultados obtidos para xilanase de *A. labruscus* imobilizada em DEAE-Celulose foram superiores ao encontrado na literatura mencionada. Assim, foi realizada a caracterização enzimática da xilanase imobilizada em ambas resinas, bem como potencial de reuso dos derivados.

4.6.3. Caracterização enzimática da xilanase imobilizada em DEAE-Celulose e DEAE-Sephadex

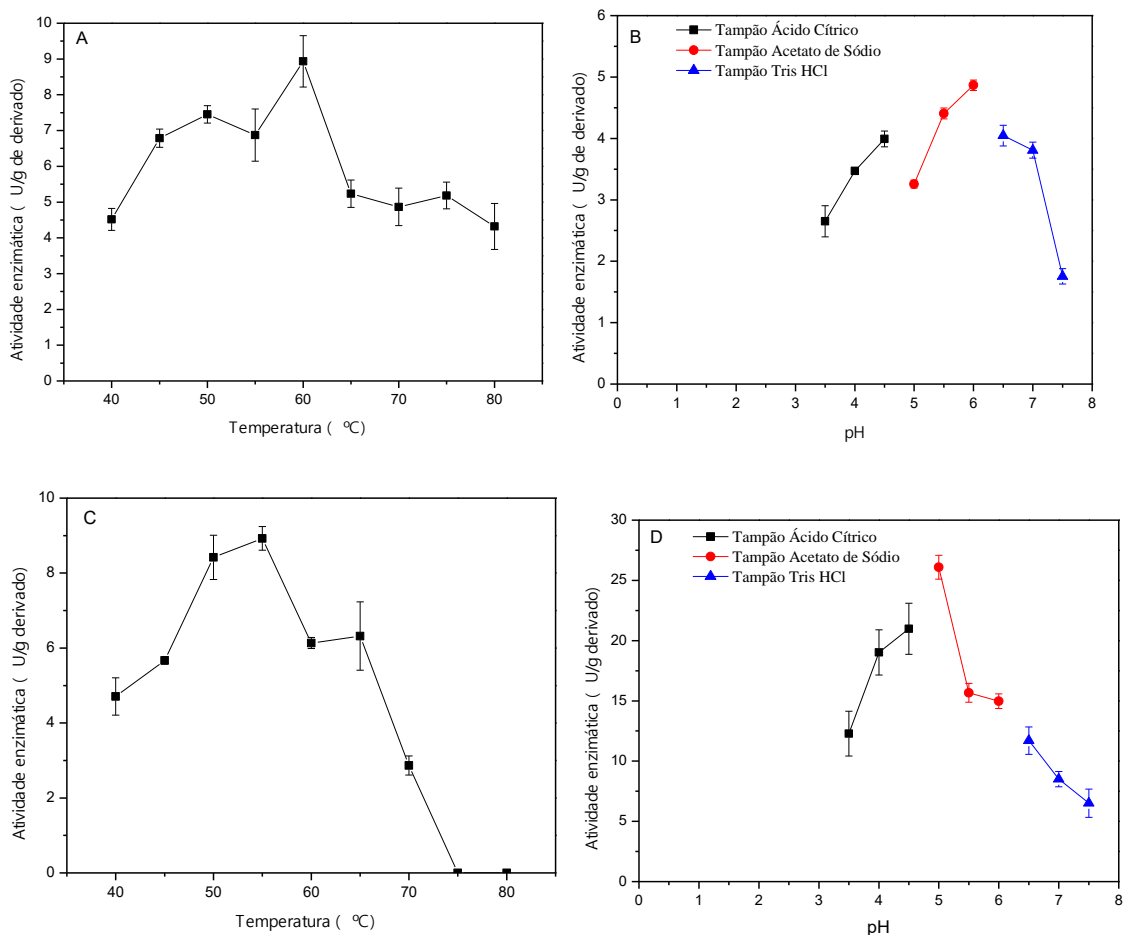
Foi realizada a caracterização da atividade xilanásica dos derivados obtidos com DEAE-Celulose e DEAE-Sephadex frente à temperatura e ao pH de reação, utilizando a xilana comercial e a xilana ABST como substratos, conforme apresentado nas Figura 18 e 19.

Figura 18. Influência da temperatura (A, C) e do pH (B, D) na atividade da xilanase imobilizada em DEAE-Celulose, utilizando xilana comercial (A e B) e xilana ABST (C e D) como substratos.



Fonte: Autora.

Figura 19. Influência da temperatura (A e C) e do pH (B e D) na atividade da xilanasase imobilizada em DEAE-Sephadex, utilizando xilana comercial (A e B) e xilana ABST (C e D) como substratos.



Fonte: Autora.

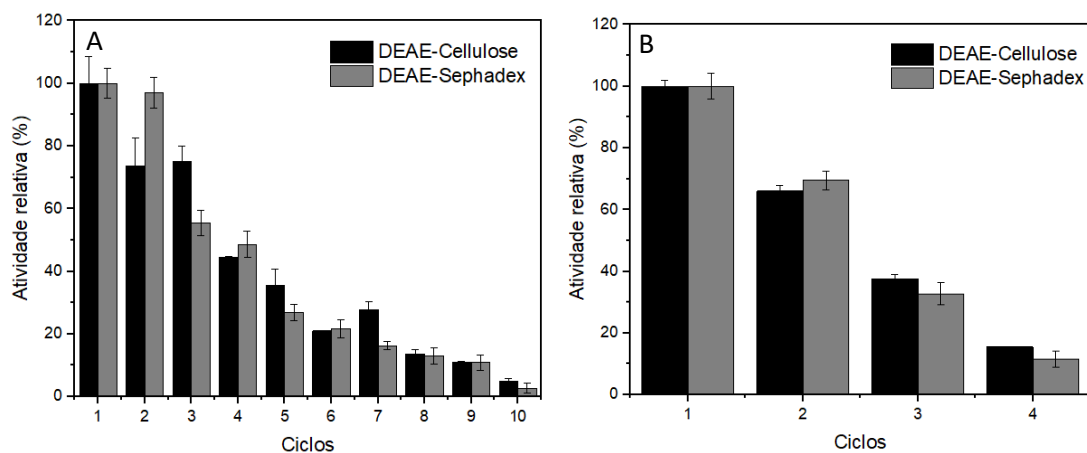
De acordo com a Figura 18, a temperatura ótima de reação da enzima imobilizada em DEAE-Celulose, na presença da xilana comercial (Figura 18 A) como substrato, foi na faixa de 55 – 60 °C, enquanto que para o imobilizado em DEAE-Sephadex foi de 60 °C (Figura 19 A). Para a xilana ABST, a temperatura ótima de reação foi observada em 55 °C para ambos os derivados (Figura 18 C e 19 C). Considerando a influência do pH ótimo, a maior atividade para o derivado DEAE-Celulose, foi em pH 5,0 para ambos substratos. Para o derivado em DEAE-Sephadex foi de pH 6,0 na presença de xilana comercial e pH 5,0 para

a xilana ABST (Figura 18 B e 19 C). As sutis diferenças nas faixas de temperatura e pH ótimo de reação sugerem que os derivados podem sofrer pequenas alterações frente aos substratos comercial e ABST, o que é esperado, uma vez que o substrato comercial apresenta grau de pureza superior, se comparado com ABST. Kapoor e Kuhad (2007) imobilizaram a xilanase de *Bacillus pumilus* em resina Q-Sepharose por método de adsorção e avaliaram a temperatura e pH ótimos de reação, encontrando valores de 63°C e 6,5, respectivamente, indicando que os dados observados para xilanase de *A. labruscus* imobilizada em ambas as resinas estão de acordo com a literatura para o mesmo método de imobilização utilizado.

4.6.4. Reuso dos derivados

Avaliou-se, ainda, os reuso dos derivados com temperatura e pH ótimos de reação, como mostrado na Figura 20.

Figura 20. Reuso dos derivados DEAE-Celulose e DEAE-Sephadex, utilizando Xilana comercial (A), onde 100% representa $6,03 \pm 0,29$ U/g de derivado e xilana ABST (B), onde 100% representa $7,92 \pm 0,31$ U/g de derivado.



Fonte: Autora.

Observa-se que foi possível utilizar os derivados obtidos com ambas resinas por até 10 ciclos, tendo a xilana comercial como substrato (Figura 20 A). Nota-se, também, que a atividade enzimática caiu para aproximadamente 50% no 4º ciclo utilizando ambas resinas, diferindo do observado frente ao substrato xilana ABST (Figura 20 B). Nessas condições a atividade enzimática caiu para aproximadamente 40% e 35% no 3º ciclo para resina DEAE-Celulose e DEAE-Sephadex, e para 20% e 10% no 4º ciclo, respectivamente. Heinen et al. (2017) avaliaram o reuso de xilanase de *Aspergillus tamaris* Kita imobilizada em resina CM-Celulose e conseguiram conduzir 5 ciclos catalíticos, sendo que no 4º ciclo a atividade caiu para 42%, valores próximos ao encontrado neste estudo para os derivados DEAE-Celulose e DEAE-Sephadex. Contudo, para dar continuidade aos experimentos, optou-se por utilizar o derivado imobilizado em DEAE-Celulose por apresentar maior rendimento de imobilização, bem como maior atividade recuperada (Tabela 5).

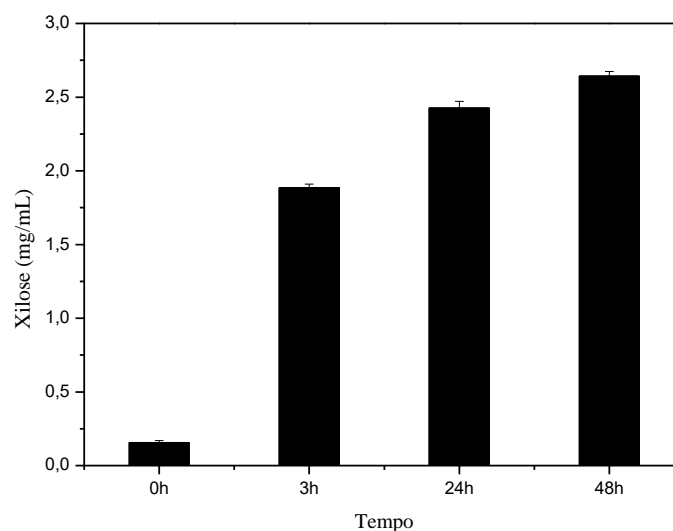
As análises realizadas com a xilana comercial são somente para fins de comparação com as xilanas extraídas do sabugo de milho, visto que um dos objetivos do trabalho foi reutilizar este resíduo lignocelulósico e convertê-lo em bioprodutos, como xilitol. Desta forma, os experimentos seguintes foram realizados utilizando somente a xilana ABST.

4.7. Utilização do derivado em reator de leito fixo

Foi avaliada a hidrólise da xilana ABST (5% m/v) pelo derivado DEAE-Celulose em reator de leito fixo, mantidas as condições ótimas de temperatura e pH de reação.

Na Figura 21 observa-se a produção de xilose, em função do tempo de conversão da xilana ABST pelo derivado em reator de leito fixo. Após 48 h de reação foi obtido aproximadamente 2,7 mg/mL de xilose.

Figura 21. Produção de xilose pelo derivado DEAE-Celulose em reator de leito fixo, usando xilana ABST como substrato.



Fonte: Autora.

Maestrello e Guimarães (2018) demonstraram que *A. labruscus* produz, além de enzimas hemicelulolíticas, enzimas celulolíticas quando cultivado em FES na presença de farelo de trigo, as quais são capazes de converter a celulose em monômeros de glicose.

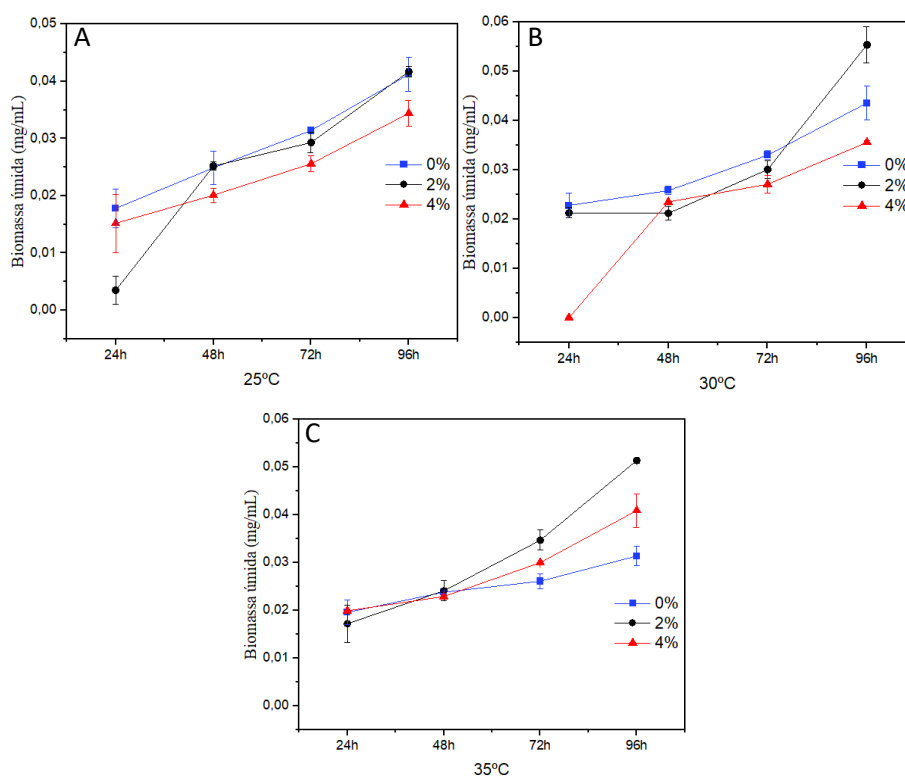
Com isso, sabendo que as xilanas extraídas de sabugo de milho apresentam resíduos de celulose, como indicado pelos espectros de FTIR, é possível que tenha ocorrido a hidrólise também da celulose presente na xilana ABST, uma vez que algumas celulasas podem também ter sido imobilizadas. As celulasas de fungos do gênero *Aspergillus* apresentam, de forma geral, ponto isoelétrico de 3,90 e 4,52, como as da co-cultura *A. niger-oryzae*, relatadas por Ahlgren, Eriksson e Vesterberg (1967) e de 3,67 de *A. niger*, segundo Okada (1985), facilitando a ligação das mesmas à resina DEAE-Celulose. Sendo assim, foi realizada análise quantitativa de glicose pelo método de Bergmeyer e Bernt (1974), utilizando o kit Enzimático-Colorimétrico, observando concentração de glicose abaixo de $0,055 \pm 0,002$ mg/mL ao longo de todo o período, cerca de 49 vezes menor que a quantificação de xilose, indicando influência irrelevante de uma possível atividade celulolítica. Desta forma, os resultados da utilização do derivado em reator foram satisfatórios e a xilose obtida da hidrólise da xilana foi

utilizada para os experimentos de fermentação com *Candida tropicalis* ATCC 750, na produção de xilitol.

4.8. Fermentação com levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 utilizando xilose comercial

Para os ensaios fermentativos com a levedura *Candida tropicalis* ATCC 750, foi determinada as melhores condições de cultivo com relação a influência do tempo e temperatura de cultivo e concentração de xilose comercial considerando o crescimento fúngico (biomassa úmida). Na Figura 22 estão apresentados os resultados obtidos após 96h de cultivo. Na Tabela 6 pode-se acompanhar o consumo de xilose para os cultivos contendo 2% e 4% de xilose (m/v).

Figura 22. Crescimento da levedura *Candida tropicalis* ATCC 750, cultivada a 25 °C (A), 30 °C (B) e 35 °C (C), utilizando 2% e 4% (m/v) de xilose como substrato por diferentes períodos.



Fonte: Autora.

Nota-se que em todas as temperaturas de cultivos analisadas houve crescimento celular (Figura 22 A, B e C), mesmo naqueles sem a adição da xilose. Na temperatura de 25 °C (Figura 22 A) a levedura cresceu cerca de 2 vezes entre 24h e 96h para análise com 0% e 4% de xilose, enquanto que, para 2%, a levedura cresceu cerca de 11 vezes. Com relação a consumo de xilose (Tabela 6), nas primeiras 24h, a levedura consumiu cerca de 40% de xilose, quando cultivada em meio contendo 2% de xilose, chegando ao consumo total de aproximadamente 95% ao final de 96h. Já para o cultivo contendo 4% de xilose, a levedura consumiu 30% nas primeiras 24h e, ao final de 96h, consumiu 75% da xilose contida no meio.

Tabela 6. Consumo de xilose (%) na fermentação com *C. tropicalis* ATCC 750.

Temperatura	Tempo	Xilose 2% (m/v)	Xilose 4% (m/v)
25°C	24h	40,18 ± 0,67	30,99 ± 3,22
	48h	50,93 ± 6,97	40,11 ± 1,78
	72h	69,98 ± 2,25	51,68 ± 4,50
	96h	94,69 ± 7,35	75,52 ± 6,64
30°C	24h	47,72 ± 1,10	28,83± 7,79
	48h	65,14 ± 0,52	50,79± 0,05
	72h	83,18± 0,73	64,62± 0,84
	96h	90,48± 0,08	84,01± 0,05
35°C	24h	46,87 ± 0,94	34,08 ± 0,78
	48h	70,00 ± 3,37	58,81 ± 3,19
	72h	85,86 ± 0,39	68,94 ± 4,76
	96h	89,90 ± 0,16	87,90 ± 1,37

Fonte: Autora.

Quando cultivada a 30 °C (Figura 22 B), na presença de 4% de xilose, a levedura não apresentou crescimento quantificado nas primeiras 24h, se desenvolvendo nas horas seguintes. Contudo, ao avaliar o consumo de xilose (Tabela 6), a mesma apresentou consumo de 28% nas primeiras 24h. O crescimento e o consumo de xilose nesta condição de cultivo (4% e 24h) foram cerca de 1,5 vez menores se comparada o cultivo contendo 2% de xilose.

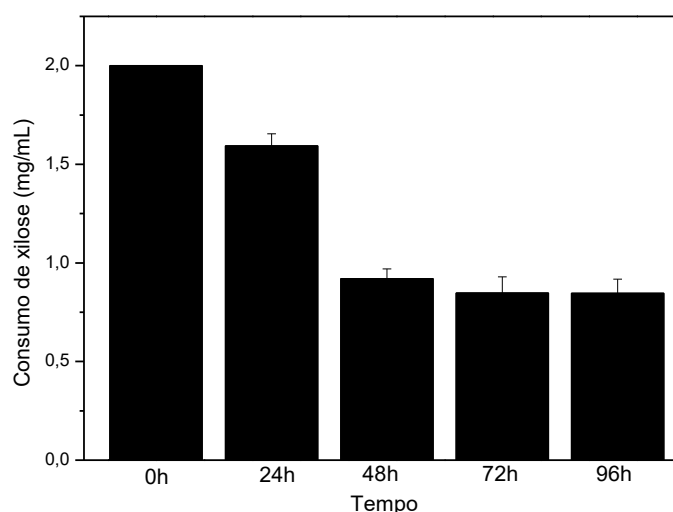
Na temperatura de 35 °C (Figura 22 C), a levedura teve seu crescimento aumentado entre 24h e 96h de 1,6, 2,8 e 2 vezes para os cultivos de 0%, 2% e 4%, respectivamente. Em relação ao consumo de xilose (Tabela 9), em 48 h, a levedura consumiu cerca de 70% quando cultivada em 2% de fonte de carbono, 85% em 72h e atingiu consumo máximo de 90% em 96 h. Em relação ao cultivo de 4%, a levedura consumiu 58% de xilose em 48h, 68% em 72 h e atingiu o consumo máximo de 87% em 96h. Tamburini et al. (2015) relataram que, quando cultivada entre 28°C e 37°C, *C. tropicalis* DSM 7524 consumiu mais 90% da xilose contida no meio após 56h de fermentação. De acordo com Queiroz (2019), *C. tropicalis* cultivada em meio semi-definido contendo xilose 3% como fonte de carbono, consumiu toda a xilose em 60 h de fermentação a 30 °C. Os resultados

obtidos estão de acordo com os relatados na literatura, portanto, foi determinada que as melhores condições de cultivo para essa levedura foram de 72 h de cultivo com 2% (m/v) de xilose na temperatura de 35 °C, a 100 rpm. Sendo assim, a fermentação de *C. tropicalis* na presença da xilose obtida da hidrólise de ABST foi conduzida sob as melhores condições de cultivo estabelecidas.

4.8.1. Fermentação com *C. tropicalis* ATCC 750 utilizando xilose obtida da xilana de sabugo de milho.

Foram realizadas as fermentações com *C. tropicalis* utilizando xilose obtida da hidrólise de ABST em reator enzimático, avaliando o consumo da xilose ao longo de 96 h, como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23. Consumo de xilose obtida da hidrólise de ABST usada como fonte de carbono na fermentação por *C. tropicalis* ATCC 750, conduzida a 35 °C por 96 h.



Fonte: Autora.

Nota-se que nas primeiras 24 h a levedura consumiu 23% da xilose disponibilizada e chegando a consumir 58% em 48 h de fermentação, não observando alterações significativas ao final de 96 h. Análises via HPLC indicaram a produção de xilitol em 48 h, na concentração de 1,02 mg/mL. Na

Tabela 7 podemos observar os parâmetros da bioconversão da xilose (extraída da xilana ABST) em xilitol por *C. tropicalis*.

Tabela 7. Parâmetros de bioconversão da xilose extraída de sabugo de milho pela levedura *C. tropicalis*.

Parâmetros	
Tempo de fermentação (h)	48
Consumo de xilose (%)*	58
Concentração celular (g/L)*	24
Concentração de xilitol (g/L)*	1,02
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,87
$Y_{X/S}$ (g/g)	20,34
$Y_{P/X}$ (g/g)	0,043
Q_X (g/L.h)	0,49
Q_S (g/L.h)	0,024
Q_P (g/L.h)	0,021

* = concentração máxima em 48 h.

** = resultados obtidos a partir da média dos experimentos em triplicata.

Observa-se que o conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) foi de 0,87 g/g e a produtividade volumétrica do xilitol Q_P foi de 0,021 g/L.h. Alguns trabalhos na literatura, como o de *C. tropicalis*, estudada por Oh e Kim (1998), cultivada por 20 h, com concentração de 50 g/L de xilose, apresentou $Y_{P/S}$ de 0,76 g/g, Q_P de 1,91 g/L.h. Mussato e Roberto (2005), relataram a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, quando submetida a fermentação por 24 h e concentração de xilose de 20 g/L, obtendo $Y_{P/S}$ de 0,70 g/g, Q_P de 0,45 g/L.h e consumo de xilose de 78,7%, enquanto que para López-Linares et al. (2018), a mesma espécie, cultivada por 48 h e concentração de xilose de 30 g/L, apresentou $Y_{P/S}$ de 0,57 g/g, Q_P de 0,14 g/L.h. Sampaio et al. (2008) avaliaram a produção de xilitol pela levedura *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* em fermentação por 24 h, na presença de 10 g/L de xilose, obtendo $Y_{P/S}$ de 0,54 g/g, Q_P de 0,24 g/L.h.

Considerando os resultados apresentados na Tabela 7, a conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) pela *C. tropicalis* está próximo aos estudos para leveduras do mesmo gênero. Entretanto, para a análise da produtividade volumétrica do xilitol (Q_P), o valor obtido apresenta-se cerca de 20 vezes menor quando comparada com a levedura *C. guilliermondii* estudada por Mussato e Roberto (2005), 6 vezes menor em relação a levedura estudada por López-Linares et al. (2018) e 90 vezes menor em relação a *C. tropicalis* estudada por Oh e Kim (1998). Este resultado sugere que a produtividade tem relação e proporcionalidade com a concentração de xilose disponível no meio fermentativo, uma vez que a *C. tropicalis* foi cultivada na presença de 2 g L^{-1} de xilose.

Estes resultados demonstram, portanto, que a *C. tropicalis* foi capaz de produzir xilitol a partir da xilose obtida da hidrólise da xilana de sabugo de milho, de forma satisfatória e dentro dos parâmetros esperados de desenvolvimento e capacidade da levedura.

5. CONCLUSÕES

Os estudos desenvolvidos propiciaram extração de xilana de sabugo de milho, bem como sua caracterização físico-química, onde foi possível identificar, através dos cromatogramas de espectro de infravermelho, picos característicos de arabinoxilanas. A baixa contaminação de proteínas e fenóis nas xilanas extraídas indicaram que o método de extração foi eficiente.

Foi possível constatar que as xilanases de *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223, produzidas em FES, foram capazes de hidrolisar as xilanas extraídas do sabugo de milho, obtendo-se xilose, xilobiose e xilotriose.

Visando a melhoria das propriedades enzimáticas, a xilanase de *A. labruscus* foi imobilizada em diferentes suportes, com melhor resultado obtido com o uso de DEAE-Celulose. O derivado DEAE-Celulose foi utilizado em reator de leito fixo, hidrolisando eficientemente a xilana ABST extraída de sabugo de milho.

A xilose então obtida foi utilizada em fermentação com *Candida tropicalis* ATCC 750, com sua conversão em xilitol, um produto de grande interesse para diferentes setores industriais. O presente trabalho revelou o potencial biotecnológico da utilização de sabugo de milho para produção de subprodutos de alto valor agregado, como o xilitol.

6. REFERÊNCIAS

ADHAM, N. Z.; AHMED, H. M.; NAIM, N. Immobilization and stability of lipase from *Mucor racemosus* NRRL 3631. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 332–339, 2010.

ADHIKARI, S.; PRAMANIK, N. Application of immobilized enzymes in the food industry. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 711-721, 2019.

AGRAWAL, R.; VERMA, A.; SINGHANIA, R. R.; VARJANI, S.; DONG, C. D.; PATEL, A. K. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, 2021.

AHLGREN, E.; ERIKSSON, K. E.; VESTERBERG, O. Characterization of cellulases and related enzymes by isoelectric focusing, gel filtration and zone electrophoresis. I. Studies on *Aspergillus* enzymes, **Acta Chemical Scandinavica**, v. 21, p. 937, 1967.

AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; RIAZ, M. Partial purification and characterization of xylanase produced from *Aspergillus niger* using wheat bran. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 50, n. 3, p. 433-437, 2013.

ALAGOZ, D.; VARAN, N. E.; TOPRAK, A.; YILDIRIM, D.; TUKEL, S. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of xylanase on differently functionalized sílica gel supports for orange juice clarification. **Process Biochemistry**, v. 113, p. 270-280, 2022.

ALBUQUERQUE, T. L.; DA SILVA, I. J.; DE MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: a review. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1779–1789, 2014.

AMORIM, G. M.; OLIVEIRA, A. C.; GUATARRA, M. L. E.; GODOY, M.; FREIRE, D. M.G. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 34-41, 2017.

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1293-1302, 2013.

ANG, S. K.; SHAZE, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil pal trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1293-1302, 2013.

ANWAR, F. BHANGER, M. I.; YASMEEN, S. Antioxidant activity of some natural extracts in corn oil. In N. Murata, M. Yamada, I. Nishida, H. Okuyama, J. Sekiya, & W. Hajime (Eds). **Advances Research of Plant Lipid**, p. 24-27, 2003.

ARAGON, C. C. SANTOS, A. F.; RUIZ-MATUTE, A. I.; CORZO, N.; GUISAN, J. M.; MONTI, R.; MATEO, C. Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized-stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 8-14, 2013.

ARCHER, D. B. Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 478–483, 2000.

ASHKAN, Z.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; JAMLIDOOST, M.; TASHAKOR, A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 708-721, 2021.

BAJAJ, B.K.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 330–337, 2012.

BAJPAI, P. In: Sources, production, and classification of xylanases, Xylanolytic Enzyme Academic Press (Imprint Elsevier), Tokyo, 2014, p. 43–52.

BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p. 241-251, 1988.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.

BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, n. 2-3, p. 171-188, 1992.

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

BENASSI, V. M.; SILVA, T. M.; PESSELA, B. C.; GUIBAN, J. M.; MATEO, C.; LIMA, M. S.; JORGE, J. A., POLIZELI, M. L. T. M. Immobilization and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 93-101, 2013.

BENNETT, J. W. (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. In: Machida, M. and Gome, K., Eds., *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E., Malate dehydrogenase UV-assay. In: H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim; Academic Press, New York, p. 613–617, 1974.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Malate dehydrogenase UV-assay. In: H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim; Academic Press, New York, p. 613–617, 1974.

BETINI, J. H. A.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T.M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 32, p. 819-824, 2009.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Res**, n. 42, p. 252-258, 2014.

BIBI, Z.; QADER, S. A.; AMAN, A. Calcium alginate matrix increases the stability and recycling capability of immobilized endo- β -1,4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 819-827, 2015.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academia of Science**, v. 72, p. 51-56, 1992.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, 286–290, 1985.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; GUO, S.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X. State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: A review from immobilization to implementation view point. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 893–901, 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed. Totowa: Humana Press, Cap. 2, p. 15-30, 2006.

BRUGNARI, T.; PEREIRA, M. G.; BUBNA, G. A.; FREITAS, E. N.; CONTATO, A. G.; CORREA, R. C. G.; CASTOLDI, R.; SOUZA, C. G. M.; POLIZELI, M. L. T.

M., BRACHT, A.; PERALTA, R. M. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 1346–1351, 2018.

BURLACU, A.; CORNEA, C.; ISRAEL-ROMING, F. Screening of xylanase producing microorganisms. **Reserach Journal of Agricultural Science**, v. 48, n. 2, 2016.

CAPETTI, C. C. M.; VACILOTTO, M. M.; DABUL, A. N. G.; SEPULCHRO, A. G. V.; PELLEGRINI, V. O. A.; POLIKARPOV, I. Recent advances in the enzymatic production and applications of xylooligosaccharides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 169, 2021.

CARAVANTE, A. L. C. Uso de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho para produção de açúcar invertido. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). UNESP, Araraquara, 2014.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CARMONA, E. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; MONTEIRO, R. T. R.; JORGE, J. A. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **Journal of Basic Microbiology**, n. 37, v. 6, p. 387-394, 1997.

CHAUDHARY, R.; KUTHIALA, T.; SINGH, G.; RAROTRA, S.; KAUR, A.; ARYA, S.K.; KUMAR, P. Current status of xylanase for biofuel production: a review on classification and characterization. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p.1–19, 2021.

CONAB 2012 - Companhia nacional de abastecimento. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 18 jul. 2022.

CONCEIÇÃO, M. M.; TEIXEIRA, L. C. G. M. Relação entre produção de resíduos sólidos urbanos e crescimento populacional na região norte. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**, v. 14, n. 13, 2021.

COSTA FILHO, J. D. B. **Valorização de sabugo de milho: potencial para produção de etanol de segunda geração e uso de lignina residual da hidrólise enzimática como adsorvente de corante catiônico**. 2021. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

CRUZ, J. C. et al. **Milho: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília – DF, 2011.

CUNHA, H. C. M.; PAIVA, T. C. B.; SILVA, F. T. Fermentação de xilose e etanol pela levedura *Pichia stipitis* CBS 5774. In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia em reísudos e desenvolvimento sustentável – Florianópolis, Santa Catarina, 2004.

DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA Jr, N. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 333-338, 2002

DAMIS, S. I. R.; MURAD, A. M. A.; DIBA ABU BAKAR, F.; RASHID, S. A.; JAAFAR, N.R.; ILLIAS, R. M. Protein engineering of GH11 xylanase from *Aspergillus fumigatus* RT-1 for catalytic efficiency improvement on kenaf biomass hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 131, 2019.

DANTAS, V. F. S. **Potencial energético dos resíduos da cultura do milho (*Zea mays* L.) e do epicarpo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2013. 46p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2013.

De CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, 1085–1093, 2015.

DHIMAN, S. S.; SHARMA, J.; BINDU, B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanase: A review. **Bioresources**, v. 3. N. 4, 2008.

EBRINGEROVA, A.; HROMADKOVA, Z.; ALFOLDI, J.; HRIBALOVA, V. The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: Extractability, structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 231–239, 1998.

EUDES, A.; LIANG, Y.; MITRA, P.; LOQUE, D. Lignin bioengineering. **Current opinion in biotechnology**, v. 26, p. 189-198, 2014.

FARINAS, C. S. et al. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect on pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, 2010.

FERREIRA, A. S. **Estudo de propriedades microbiológicas e toxicológicas do xilitol visando a sua aplicação no controle da dermatite atópica**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

FOLEY, K. M.; VANDER-HOOVEN, D. I. B. Properties and industrial uses of corncoobs. In: POMERANZ, Y.; MUNCK, L. Cereals – a renewable resource. **The American Association of Cereal Chemists**, St. Paul, 1981.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agent of the support. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n. 7, 1360-1366, 2007.

FUNGARO, M.; FERRANTI, L. S.; MASSI, F. P.; SILVA, J. J.; SARTORI, D.; TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; IAMANAKA, B.T. *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section Nigri discovered in Brazil. **Scientific Reports**, vol. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

GABELLE, J. C.; JOURDIER, E.; LICHT, R. B.; BEN CHAABANE, F.; HENAUT, I.; MORCHAIN, J.; AUGIER, F. Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 75, p. 408–417, 2012.

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

GRUBEN B. S.; DE VRIES R. P. Advances in pectinolytic enzymes, genes and regulation in *Aspergillus*. In: Pectins and Pectinases. **Wageningen Academic Publishers**, p. 101-114, 2009.

GUERFALI, M.; MAALEJ, I.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Catalytic properties of the immobilized *Talaromyces thermophilus* β -xylosidase and its use for xylose and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 242-249, 2009.

GUIMARÃES, N. C. A.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; POLIZELI, M. L. T. M.; GIANNESI, G. C.. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **Springer Plus**, v. 2, n. 380, 2013.

GUPTA, P.K.; AGRAWAL, P.; HEDGE, P.; AKHTAR, M. S. Xylooligosaccharides and their anticancer potential: an update. In: Anticancer plants: natural products and biotechnological implements. p. 255–271, 2018.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E.; Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HEINEN, P. R.; PEREIRA, M. G.; RECHIA, C. G. V.; ALMEIDA, P. Z.; MONTEIRO, L. M. O.; PASIN, T. M.; MESSIAS, J. M.; CEREIA, M.; KADOWAKI, M. K.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Immobilized endo-xylanase of *Aspergillus tamarii* Kita: an interesting biological tool for production of xylooligosaccharides at high temperatures. **Process Biochemistry**, p.145-152, 2017.

HOARAU, M.; BADIEYAN, S.; MARSH, E. N. G. Immobilized enzymes: understanding enzyme surface interactions at the molecular level. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 15, p. 9539–9551, 2017.

HOELTZ, M. **Estudo da influência de manejos pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

HOKANSON, C.A.; CAPPUCILLI, G.; ODINECA, T.; BOZIC, M.; BEHNKE, C.A.; MENDEZ, M.; COLEMAN, W. J.; CREA, R. Engineering highly thermostable xylanase variants using an enhanced combinatorial library method. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 24 p. 597–605, 2011

HOLKER U, H. M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

IBARRURI, J.; CEBRIÁN, M.; HERNÁNDEZ, I. Valorisation of fruit and vegetable discards by fungal submerged and solid-state fermentation for alternative feed ingredients production. **Journal of Environmental Management**, v. 281, 2021.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2021. Disponível em: Acesso em: 18 jul. 2022.

ISHIDA, N.; OKUBO, A.; KAWAI, H.; YAMAZAKI, S.; TODA, S. Interaction of amino acids with transition metal ions in solution (I) solution structure of L-lysine with Co(II) and Cu(II) ions as studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, 263–270, 1980.

ITÁLIA. Food and agriculture organization of the united nations (FAO). Maize in human nutrition. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/T0395E/T0395E00.htm>>. Acesso em 18 de julho de 2022.

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

JAGTAP, S. S.; RAO, C. V. Microbial conversion of xylose into useful bioproducts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 9015-9036, 2018.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**, v. 1, p. 163-176, 1990.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 320–326, 2006.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase- a critical review. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253-64, 2008.

JIN, Y. S.; JONES, S.; SHI, N. Q.; JEFFRIES, T. W. Molecular cloning of XYL3 (D-xylulokinase) from *Pichia stipitis* and characterization of its physiological function. **Applied and Environmental of Microbiology**, v. 68, n. 3, p.1232–1239, 2002.

JOHNSEN, U.; DAMBECK, M.; ZAISS, H.; FUHRER, T.; SOPPA, J.; SAUER, U.; SCHONHEIT, P. D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27290–27303, 2009.

JORDAN, D. B.; BOWMAN, M. J.; BRAKER, J. D.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E.; LEE, C. C.; MERTENS, J. A.; WAGSCHAL, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochemical Journal**, v. 442, n. 2, p. 241–252, 2012.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 2, p. 153-156, 2004.

KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain mk001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, p. 125–138, 2007.

KAUSHAL, J.; KHATRI, M.; SINGH, G.; ARYA, S. K. A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: An elaborate review on xylanase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 1350-1361, 2021.

KIM, J.H.; HAN, K. C.; KOH, Y. H.; RYU, Y. W.; SEO, J. H. Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 16-19, 2002.

KIMURA, I.; SASAHAR, H.; TAJIMA, S. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 334–339, 1995.

KLICH, M. A. Identification of Common *Aspergillus* species. Amsterdam: Centraalbureaus voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

KONZEN, E. A.; ALVARENGA, R. C. **Fertilidade de solos**. Embrapa Milho e Sorgo, versão eletrônica, 4 ed, 2008.

KOTTER, P.; AMORE, R.; HOLLENBERG, C. P.; CIRIACY, M. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Current Genetics**, v. 18, n. 6, p.493–500, 1990.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, v. 161, p. 1-188, 1989.

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

KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M. Produção de xilanase por *Aspergillus casei* com diferentes fontes de carbono. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 207-216, 2007.

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. 3, p. 149, 2016.

LAGAERT, S.; POLLET, A.; COURTIN, C. M.; VOLCKAERT, G. β -Xylosidases and α -l-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 316–332, 2014.

LANE, S.; DONG, J.; JIN, Y-S. Value-added biotransformation of cellulosic sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 380–394, 2018.

LAROSA, C. SALERNO, M.; DE LIMA, J. S.; MERIJS MERI, R.; da SILVA M. F.; de CARVALHO L. B.; CONVERTI, A. Characterization of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 900–906, 2018.

LEE, H. The structure and function of yeast xylose (aldose) reductases. **Yeast**, v. 14, n. 11, p. 977–984, 1998.

LEITE, P.; SOUSA, D.; FERNANDES, H.; FERREIRA, M.; COSTA, A. R.; FILIPE, D.; GONÇALVES, M.; PERES, H. BELO, I.; SALGADO, J. M. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial waste. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, 2021.

LI, L.; TIAN, H.; CHENG, Y.; JIANG, Z.; YANG, S. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 6, p. 780-787, 2006.

LI, Z.; LI, X.; LIU, T.; CHEN, S.; LIU, H.; WANG, H.; SONG, Y.; LUO, X.; ZHAO, J.; ZHANG, T. The critical roles of exposed surface residues for the thermostability and halotolerance of a novel GH11 xylanase from the metagenomic library of a saline-alkaline soil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p.316–323, 2019.

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

LIMA, L. H. A. **Estudos moleculares dos genes XYL1 e XYL2 de *Candida tropicalis* visando a produção de xilitol**. 2006. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

LIMA, T. S.; BARROS, J. D. S. Avaliação do gerenciamento de resíduos sólidos através do Sistema de Indicadores de Sustentabilidade Pressão-Estado-Impacto-Reposta (PEIR) no Município de Cachoeira dos Índios, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 6, n. 14, p. 749-765, 2019.

LÓPEZ-LINARES, J. C.; ROMERO, I.; CARA, C.; CASTRO, E.; MUSSATO, S. I. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 736-743, 2018.

LU, F.; LU, M. LU, Z.; BIE, X.; ZHAO, H.; WANG, Y. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5938-5941, 2008.

LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 53-75, 2009.

MAESTRELLO, C. C.; GUIMARÃES, L. H. S. Potential of the *Aspergillus labruscus* ITAL 22.223 as a producer of cellulolytic enzymes and xylanase under solid-state fermentation. **International Journal of Scientific Reports**, v. 4, n. 6, p. 147-152, 2018.

MAKELA, M.; HILDEN, K.; VRIES, R. Degradation and modification of plant biomass by fungi. **Fungal Genomics**, p. 175-208, 2014.

MANZ, U.; VANNINEM, E.; VOIROL, F. Xylitol - Its properties and use as a sugar substitute in foods. In: Food R. A. Symp. Sugar and Sugar Replacements. London, 1973.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 158 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365–373, 2011.

MATILLA, P. T.; SVANBERG, M. J.; KNUUTTILA, M. L. E. Dietary xylitol protects against osseal changes in experimental osteoporosis. **Nutritional Aspects of Osteoporosis**, p. 157-162, 1998.

MATSUMURA, S.; SAKIYAMA, K.; TOSHIMA, K. Preparation of octyl b-D-xylobiose by xylanase-catalyzed direct transglycosylation reaction of xylan and octanol. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 17-22, 1999.

McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparisons. **Journal of Biological Chemistry**, v.49, p.185-186, 1921.

MELO-SILVEIRA, R. F.; FIDELIS, G. P.; COSTA, M. S. P. C.; TELLES, C. B. S.; DANTAS-SANTOS, N.; ELIAS, S. O.; RIBEIRO, V. B.; BARTH, A. L.; MACEDO, A. J.; LEITE, E. L. ROCHA, H. A. O. O. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. **Internacional Journal Molecular Sciences**, v.13, p. 409-426, 2012.

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

MILÉO, P. C. **Aplicações da celulose de palha de cana-de-açúcar: obtenção de derivados partindo de celulose branqueada e de biocompósitos com poliuretana obtida a partir de óleo de mamona (*Ricinus communis L.*)**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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

MISHRA, A. et al. Industrial application of glutaraldehyde active immobilized xylanase for clarification of tomato juice. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 4, n. 9, p. 71-82, 2017.

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.

MORENO, J. O. S.; FERREIRA, E. A. Avaliação das propriedades térmicas de um compósito polimérico com sabugo de milho tritura. **Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales**, v. 19, n. 3, 2018.

MOYSÉS, D. N.; REIS, V. C. B.; DE ALMEIDA, J. R. M.; DE MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 207, 2016.

MUCELIN, C. A.; BELLINI, M. Lixo em impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. **Sociedade & Natureza**, v.20, n. 1, p. 111-124, 2008.

MUSSATO, S.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2453-2460, 2005.

MUSULE, R.; ALARCÓN-GUTIÉRREZ, E.; HOUBRON, E. P.; BÁRCENAS-PAZOS, G. M.; DEL ROSARIO PINEDALÓPEZ, M.; DOMÍNGUEZ, Z.; SÁNCHEZ-VELÁSQUEZ, L. R. Chemical composition of lignocellulosic biomass in the wood of *Abies religiosa* across an altitudinal gradient. **Journal of Wood Science**, v. 62, n. 6, p. 537-547, 2016.

NAMNUCH, N.; THAMMASITTIRONG, A.; THAMMASITTIRONG, S. N. Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. **Mycology: An International Journal on Fungal Biology**, v. 12, n. 2, 2021.

NITSCHKE, B. M.; JORGENSEN, T. R.; AKEROYD, M.; MEYER, V.; RAM, A. F. J. The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: insights from the transcriptome and secretome. **BioMed Central Genomic**, v. 13, p. 380 – 403, 2012.

NUNN, C. E.; JOHNSEN, U.; SCHONHEIT, P.; FUHRER, T.; SAUER, U.; HOUGH, D. W.; DANSON, M. J. Metabolism of pentose sugars in the hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33701–33709, 2010.

OH, D. K.; KIM, S. Y. Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose in *Candida tropicalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 419-425, 1998.

OKADA, G. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, p. 1257-1266, 1985.

ÖZMAK, M. Production of activated carbon from biomass wastes, Ph.D. Thesis in Chemical Engineering, Ankara University, Ankara, Turkey, 2010.

P. MONIZ, A.L. HO, L.C. DUARTE. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylo oligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466–473, 2016.

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

PAL, A.; KHANUM, F. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1315–1322, 2011.

PANAGIOTOU, G.; CHRISTAKOPOULOS, P. NADPH-Dependent D-aldose reductases and xylose fermentation in *Fusarium oxysporum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V. 97, n. 5, p. 299-304, 2004.

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

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; HOOR-SUYKERBUYK, M. T.; VISSER, J. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 521-527, 2001.

POLIZELI, M. L.; 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, p. 577–591, 2005.

PORTER, T. M.; GOLDING, G. B. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? **New Phytologist**, v. 192, p. 775-782, 2011.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; Tecnologia farmacêutica, 4ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1996.

QASEEM, M. F.; SHAHEEN, H.; WU, A. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 144, 2021.

QUEIROZ, S. S. **Identificação e quantificação da expressão dos genes envolvidos no transporte de xilose na levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037**. 2019. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorenas, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

QUIROZ, R. D. L. C.; ROUSSOS, S.; HERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, R.; CASTILLO, F.; AGUILAR, C. N. Challenges and opportunities of the biopesticides production by solid-state fermentation: Filamentous fungi as a model. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 326–333, 2015.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 9, p. 1307–1312, 2012.

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, 2014.

RAO, S.; SANTHAKUMAR, A. B.; CHINKWO, K. A.; WU, G.; JOHNSON, S. K.; BLANCHARD, C. L. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity in sorghum grains. **Journal of Cereal Science**, v. 84, p. 103–111, 2018.

RAPER, K. B.; FENELL, D. I. The Genus *Aspergillus*. **Science**, v. 150, p. 736–737, 1965.

REHMAN, H. U.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S. A. U.; MOLINARO, A.; ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase

from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1081–1086, 2013.

ROMANO, A. G.; MOLINOS-SENANTE, M. Fatores que afetam a ecoeficiência dos serviços de resíduos municipais nos municípios da Toscana: uma investigação empírica de diferentes modelos de gestão. **Wast Management**, v. 105, n. 1, p. 384-394, 2020.

SAHA, B. C.; SAKAKIBARA, Y.; COTTA, M. A. Production of d-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 519–523, 2007.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, p. 337-353, 2015.

SALEM, K.; JABALERA, Y.; PUENTES-PARDO, J. D.; VILCHEZ-GARCIA, J.; SAYARI, A.; HMIDA-SAYARI, A.; JIMENEZ-LOPEZ, C.; PERDUCA, M. Enzyme storage and recycling: nanoassemblies of α -amylase and xylanase immobilized on biomimetic magnetic nanoparticles. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, p. 4054-4063, 2021.

SAMAPAI, F. C.; CHAVES-ALVES, V. M.; CONVERTI, A.; PASSOS, F. M. L.; COELHO, J. L. C. Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 502-508, 2008.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-266, 2004.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnological Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

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 the

potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1823-1828, 2005.

SANTOS, F. A. **Produção de celulases por *Pinicillium* sp. FSD15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho**. 2021. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2021.

SANTOS, M. S. R. **Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G**. 2014. 76p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, 2014.

SCHNEIDER, H.; LEE, H.; BARBOSA, M. D .E. F.; KUBICEK, C. P.; JAMES, A. P. Physiological properties of a mutant of *Pachysolen tannophilus* deficiente in NADPH-dependent d-xylose reductase. **Applied and Environmental of Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 2877–2881, 1989.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435. 2002

SENATORE, A.; CORRENTE, G. A; VERTERAMO, F.; DALENA, F. An overview on pretreatment processes for an efective conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol. **Advances in Bioenergy and Microfluidic Applications**, p. 41–68, 2021.

SHARMA, D.; CHAUDHARY, R.; KAUR, J.; ARYA, S. K. Greener approach for pulp and paper industry by xylanase and laccase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 2020.

SILVA C. O. G.; AQUINO, E. N.; RICART, C. A. O.; MIDORIKAWA, G. E. O.; MILLER, R. N. G.; FERREIRA FILHO, E. X. GH11 xylanase from *Emericella nidulans* eith low sensitivity to inhibition by etanol anf lignocellulose-derived phenolic compounds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 13, 2015.

SILVA, D. S. G. **Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar integrado à hidrólise enzimática da celulose residual**. 2016. 102 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

SILVA, N. L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e Caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v, 2, p. 25-33, 1998.

SILVEIRA, R. F. M. **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009.

SIPINELLI, D.; FATARELLA, E.; MICHELE, A. D.; POGNI, R. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 218-223, 2013.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205- 218, 2003.

SOUZA, L. T. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: Rodrigo R. Resende (organizador). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, Cap. 15, p. 529-568, 2016.

SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In: **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass – Techniques, applications and commercialization**. InTech, 2013. cap. 9, p. 207- 247.

SPAGNA, G.; RAMAGNOLI, D.; ANGELA, M.; BIOCHI, G.; PIFFERI, P. G. A simple method for purifying glycosidase: α -L-arabi-nofuranosidase and β -D-

glucopyranosidase from *A. niger* to increase the aroma of wine. I. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 22, p. 298–304, 1998.

STEENWYK, J.L.; SHEN, X.; LIND, A. L.; GOLDMAN, G. H.; ROKAS, A. A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **American Society for Microbiology**, v. 10, n. 4, 2019.

STEPHEN DAHMS, A. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 60, n. 4, p.1433–1439, 1974.

STRICKER, A. R., MACH, R. L., DE GRAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 78, p. 211–220, 2008.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanase: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-64, 2007.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 39-67, 1997.

TALJA, R. A.; ROOS, Y. H. Phase and state transition effects on dielectric, mechanical, and thermal properties of polyols. **Thermochimic Acta**, v.380, n.2,14, p.109-121, 2001.

TAMBURINI, E.; COSTA, S.; MARCHETTI, M. G.; PEDRINI, P. Optimized production of xylitol from xylose using a hyper-acidophilic *Candida tropicalis*. **Biomolecules**, v. 5, p. 1979-1989, 2015.

TARDIOLI, P. W.; VASCONCELLOS, V. M.; FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; GIORDANO, R. L. C.; FARINAS, C. S. Estudo comparativo da termoestabilidade de enzimas produzidas por fungos filamentosos em cultivo submerso e combinado. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, 2014.

TERRASAN, C. R. F.; ROMERO-FERNÁNDEZ, M.; ORREGO, A. H.; OLIVEIRA, S. M.; PESSELA, B. C.; CARMONA, E. C.; GUIBAN, J. M. Immobilization and stabilization of beta-xylosidase from *Penicillium janczewskii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, p. 349-366, 2017.

THOMAS, L.; SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Production of an alkaline xylanase from recombinant *Kluyveromyces lactis* (KY1) by submerged fermentation and its application in bio-bleaching. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 24–30, 2015.

TRAKARNPAIBOON, S.; SRISUK, N.; PYACHOMKWAN, K.; SAKAI, K.; KITPREECHAVANICH, V. Enhanced production of raw starch degrading enzyme using agro-industrial waste mixtures by thermotolerant *Rhizopus microsporus* for raw cassava chip saccharification in ethanol production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 47, 2017.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; KOSKELA, M.; NIEMELA, M. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial. **British Medical Journal**, v. 313, p. 1180-1184, 1996.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; NIEMELA, M. A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. **Pediatrics**, v. 102, p. 879-884, 1998.

VAN PEIJ, N.; GIELKENS, M. M. C.; VIREN, R. P.; VISSER, J.; GRAAFF, L. H. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3615– 3619, 1998.

VARDAKOU, M.; DUMON, C.; MURRAY, J. W.; CHRISTAKOPOULOS, P.; WEINER, D. P.; JUGE, N.; LEWIS, R.; GILBERT, H. J.; FLINT, J. E. Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanases. **Journal of Molecular Biology**, v. 375, n. 5, p. 1293-1305, 2008.

VARGA, J.; JUHÁSZ, Á.; KEVEI, F.; KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 627-640, 2004.

VASHISHTA, B. R.; SINHA, A. K. Botany For degree students fungi. S. **Chand & Company LTD-New Delhi**, p. 768, 2010.

VERMA, D; ANAND, A.; SATYANARAYANA, T. Thermostable and alkalistable endoxylanase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1: cloning, expression, characteristics and its applicability in generating xylooligosaccharides and fermentable sugars. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 170, p. 119-130, 2013.

VIEIRA JÚNIOR, C. M.; SANTOS, H. S.; SANTOS, S. T. O.; DRUMMOND, A. R. F.; SILVA, S. P. R. S. Produção e análise do Syngas a partir do sabugo de milho. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 33116-33123, 2020.

VIEIRA, C. R.; ROCHA, J. H. A.; LAFAYETTI, K. P. V. Análise dos fatores de influência e diagnóstico da gestão dos resíduos da construção civil (RCC) nos canteiros de obra da cidade do Recife-PE. **Revista Brasileira de Gestão Urbana**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2019.

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

VRIES, R. P.; VISSER J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 4497-522, 2001.

WEIMBERG, R. Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 236, p. 629–635, 1961.

WHITING, I. M.; ROSE, S.P.; MACKENZIE, A. M. Effect of wheat distillers dried grains with solubles and exogenous xylanase on laying hen performance and egg quality. **Poultry Science**, v. 98, p. 3756–3762, 2019.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

WONG, J. K. H.; TAN, H. K.; LAU, S. Y.; YAP, P. S.; DANQUAH, M. K. Potential and challenges of enzyme incorporated nanotechnology in dye wastewater

treatment: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 4, 2019.

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

WU, Q.; LI, Y.; LI, Y.; GAO, S.; WANG, M.; ZHANG, T.; CHEN, J. Identification of a novel fungus, *Leptosphaerulina chartarum* SJTU 59 and characterization of its xyloxytic enzymes. **Plos One**, n. 8, p. 73729, 2013.

XU, P.; CHENG, S.; HAN, Y.; ZHAO, D.; LI, H.; WANG, Y.; ZHANG, G.; CHEN, C. Natural Variation of Lignocellulosic Components in Miscanthus Biomass in China. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 2020.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. **Sustainability**, v. 9, n. 2, 2017.

YOKOYAMA, K. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, p. 241-246, 2001.

ZHOU, Z.; INAYAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous Mesoporous Materials**, v. 154, n.1, p. 133-41, 2012.

ZIGLIO, B. R.; BEZERRA, J. R. M. V.; BRANCO, I. G.; BASTOS, R.; RIGO, M. Elaboração de pães com adição de farinha de sabugo de milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 1, 2007.