UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE HALOTOLERANTE DE *Aspergillus hortai* CRM 1919 E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

MICHEL RICARDO GRACIOLI

Dissertação apresentada ao instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona

Rio Claro

2018

MICHEL RICARDO GRACIOLI

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE HALOTOLERANTE DE *Aspergillus hortai* CRM 1919 E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona

Co-Orientador: Dr. Michel Brienzo

Rio Claro

2018

547.758 Gracioli, Michel Ricardo
G731p Purificação e caracterização de uma xilanase halotolerante de Aspergillus hortai CRM 1919 e aplicação na hidrólise de subprodutos agroindustriais / Michel Ricardo Gracioli. - Rio Claro, 2018
130 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Eleonora Cano Carmona
Coorientador: Michel Brienzo

1. Enzimas. 2. Endoxilanase. 3. Halotolerância. 4. Hidrólise enzimática. 5. Subproduto agroindustrial. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP - Adriana Ap. Puerta Buzzá / CRB 8/7987

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE HALOTOLERANTE DE Aspergillus hortai CRM 1919 E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

AUTOR: MICHEL RICARDO GRACIOLI
ORIENTADORA: ELEONORA CANO CARMONA
COORIENTADOR: MICHEL BRIENZO

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

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

Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP

Profa. Dra. SANDRA IMACULADA MAINTINGUER
x / IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia

Rio Claro, 26 de fevereiro de 2018

Dedicatória

À minha família, amigos e todos aqueles que, de
alguma forma, contribuíram com o
desenvolvimento deste trabalho.
Dedico...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cicero e Angela, pelo incentivo e força durante a minha caminhada até aqui.

Ao meu irmão Filipe, pelos conselhos e apoio nas horas de dúvida.

Aos pequenos, Igor, Téo, Dudu e todos os que não mais aqui estão, pelo amor mais puro e sincero que possa existir.

Aos meus amados velhos amigos de infância, Pamela, Marcelo, Thais e Luma, pelo companheirismo na vida e por tornarem meus dias mais leves e divertidos...

...e, também, aos meus - não tão velhos - amigos de UFSCar: Dayane, Gabrielle, Juanita e Mariana pelos quatro anos de boas risadas, micos e memes compartilhados. Pela nossa amizade!!

A ragazza Camila, amiga de Itália e da vida, pela força, amizade e pelos bons momentos pré, durante e pós intercâmbio. Obrigado pela paciência e por me aguentar.

A Cárol Terrone, companheira de laboratório, pela paciência e auxílio em todas as etapas desse trabalho.

A Caroline de Freitas, Carmen Casonato e Juliana Montesino, pelos bons momentos passados no laboratório.

A Deus, pelo conforto nas horas de inquietação.

A Eleonora Cano Carmona e Michel Brienzo, pela orientação e auxílio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

“Non puoi scoprire nuovi oceani fino a quando non hai
il coraggio di perdere di vista la spiaggia”
Anonimo

RESUMO

As enzimas xilanases são de grande interesse biotecnológico em função da sua habilidade na degradação da molécula de xilana, a principal hemicelulose presente na parede celular de plantas. Tais enzimas encontram aplicações nos mais diversos ramos da indústria como na produção de alimentos e bebidas, de cosméticos, de ração animal, de biocombustíveis entre outros. Em razão da sua composição química, os subprodutos lignocelulósicos, produzidos em grande quantidade pela agroindústria, se apresentam como uma potencial fonte sustentável para a produção de valiosos compostos como biocombustíveis, fertilizantes, rações, produtos químicos e enzimas. Assim, tendo em vista esse contexto, foi desenvolvido o presente trabalho, cujo objetivo foi caracterizar e purificar a principal endoxilanase produzida por uma linhagem de *Aspergillus hortai* cultivado em estado sólido e aplicá-la, nas formas bruta e purificada, na hidrólise de subprodutos agroindustriais. A purificação da enzima foi alcançada após três etapas cromatográficas, respectivamente, uma cromatografia de troca iônica seguida por cromatografias de interação hidrofóbica e exclusão molecular. Ao final das etapas, a enzima purificada apresentou recuperação de 1,1% e fator de purificação de 15,8 vezes. A enzima bruta e purificada se mostrou tolerante ao NaCl na presença de até 4 M do sal. Por outro lado, foi pouco tolerante à presença de íons e alguns compostos como Hg^{2+}, Cu^{2+}, SDS, Triton X-100 e TWEEN 20/80. Em contrapartida, DTT e β-mercaptoetanol a 10 mM estimularam a atividade da enzima bruta em 13 e 19%, respectivamente. Para a enzima bruta, a temperatura e pH ótimos de reação foram, respectivamente, 60 °C e 6,0 tanto na ausência quanto na presença de NaCl 0,5 e 2,5 M. Apresentou boa estabilidade térmica a 40 °C na ausência de NaCl, e foi ativada na presença de 0,5 M e 2,5 M do sal durante as 4 h de incubação. A enzima bruta e purificada foi estável em uma ampla faixa de pHs (3,0-8,0) na ausência e na presença de NaCl e apresentou alta especificidade pelas xilanas *birchwood*, *beechwood* e *oat spelt*, não tendo sido detectadas atividades endoglucanase sobre CMC, exoglucanase em Avicel e β-xilosidase em ρNPX. Após a purificação, os perfis de temperatura e pH ótimos de reação se mantiveram em 60 °C e 6, respectivamente. A enzima pura foi, também, bastante estável a temperatura de 40 °C, mantendo mais de 50% da atividade controle durante as 4 h de incubação, e ao pH, variando de 3,0-8,0, na ausência e na presença de NaCl. Xilobiose e xilo-oligossacarídeos superiores foram os produtos formados na hidrólise da xilana *oat spelt* pela enzima purificada, sugerindo ação enzimática do tipo endoxilanase. A massa molecular aparente, após a purificação, foi estimada em 25,0 kDa por SDS-PAGE e em 14,8 kDa por exclusão molecular. Os parâmetros cinéticos

K_m e $V_{máx}$ em xilana de *beechwood* sofreram variações em resposta a presença de NaCl, sendo a maior eficiência catalítica obtida na presença de 2,5 M do sal (kcat/km 40,91). A análise da composição química dos subprodutos - sabugo, palha e folha de milho - revelou, respectivamente, 25,6%, 45,3% e 34,9% de carboidratos, 19,7%, 15,2% e 17,6% de lignina e 9,0%, 17,4% e 24,0% de extrativos para a biomassa *in natura* e, 33,3%, 25,2% e 38,8% de carboidratos e 6,5%, 8,9% e 12,3% de lignina para a xilana extraída desses subprodutos. A extração das hemiceluloses utilizando tratamento alcalino oxidativo resultou em um rendimento de 64% para o sabugo, 18% para a palha e 50% para a folha. A enzima bruta e purificada foi capaz de hidrolisar as biomassas na forma *in natura*, bem como as xilanas extraídas desse material produzindo majoritariamente xilopentoses e xilohexoses. Sendo assim, pode-se afirmar que a xilanase bruta e purificada em estudo apresentou propriedades interessantes para a aplicação industrial, especialmente na produção de xilo-oligossacarídeos e em processos conduzidos sob elevada salinidade.

Palavras-chave: endoxilanase, purificação, caraterização, *Aspergillus hortai*, halotolerância, hidrólise enzimática, xilana, subproduto agroindustrial.

ABSTRACT

Xylanases raise a biotechnological interest due to its ability to degrade xylan. Such enzymes find use in a variety of industrial processes such as the production of food and beverage, cosmetics, animal feed, second generation ethanol, among many others. As for its chemical composition, lignocellulosic byproducts, widely produced by agroindustry, presents itself as a potential sustainable source for production of valuable composts like soil fertilizers, animal feed, chemical products and enzymes. In this context, the main xylanase produced by an *Aspergillus hortae* strain, cultivated in solid state (SSF), was characterized, purified and applied in the hydrolysis of hemicellulose from corn by-products. Enzyme purification was achieved after three chromatographyc steps, respectively, an ion exchange chromatography followed by hydrophobic interaction and molecular exclusion chromatographys. After the purification steps, a final yield of 1.1% and purification fold of 15.8 was achieved. Both crude and purified enzyme showed high tolerance to NaCl in the presence of up to 4 M of the salt. The enzyme displayed a very low tolerance to some metal ions and chemical compounds, especially Hg^{2+}, Cu^{2+}, SDS, Triton X-100 and TWEEN 20/80. On the other hand, DTT and β-mercaptoetanol at 10 mM stimulated crude enzyme activity in 13% and 19%, respectively. As for the crude enzyme, optimum temperature and pH were, respectively, 60 °C and 6.0, in the absence and presence of 0.5 and 2.5 M NaCl. It showed good thermal stability at 40 °C in the absence of NaCl and was activated in the presence of 0.5 and 2.5 M of the salt throughout the 4 h incubation time. Crude and purified enzyme was also stable over a wide pH range (3.0 - 8.0) both in the absence and presence of NaCl and presented high specificity for *birchwood*, *beechwood* and *oat spelt* xylans, not showing detectable endoglucanase, exoglucanase and β-xylosidase activities. After purification, optimum temperature and pH profiles remained at 60 °C and 6.0, respectively. Purified enzyme showed good stability at 40 °C, being able to retain more than 50% of the control activity during 4 h of incubation, and to the pH, varying from 3.0 to 8.0, in the absence and in the presence of NaCl. Xylobiose and xilooligosaccharides were the products of oat spelt xylan hydrolysis by the purified enzyme, suggesting an endoxilanase mode of action. The apparent molecular mass, after purification, was estimated to be 25.0 kDa by SDS-PAGE and 14.8 kDa by exclusion chromatography. Kinetic parameters of K_m and $V_{máx}$ using beechwood xylan were 5.12 mg/mL and 14.25 µmol/min.mL, respectively, in the absence of NaCl, 9.56 mg/mL and 20.80 µmol/min.mL in the presence of 0.5 M and 3.13 mg/mL and 9.22 µmol/min.mL in the presence of 2.5 M of the same salt. Chemical analysis of the biomasses from corn cob, stover and leaves, revealed a composition of, respectively, 25.6%, 45.3%, 34.9%

carbohydrates, 19.7%, 15.2%, 17.6% lignin and 9.0%, 17.4%, 24.0% extractives for *in natura* biomasses and 33.3%, 25.2%, 38.8% carbohydrates and 6.5%, 8.9%, 12.3% lignin for the extracted hemicelluloses. Hemicellulose extraction yields were of 64% for corn cob, 18% for stover and 50% for leaves. Both crude and purified enzyme was capable of hydrolyzing *in natura* biomasses, as well as the extracted hemicelluloses from these materials, producing mainly xylopentoses and xyloheoses. In summary, the xylanase presented attractive properties for industrial applications, especially in the production of xyloolygossacharides and in those carried out under high NaCl concentration.

Key-words: endoxylanase, purification, characterization, *Aspergillus hortai*, halotolerance, hidrolysis, xylan, agroindustrial by-products.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquema simplificado da estrutura da parede celular vegetal 18
Figura 2. Estrutura esquemática das moléculas de homoxilana 20
Figura 3. Estrutura esquemática da molécula de heteroxilana 21
Figura 4. Principais produtos de degradação da biomassa lignocelulósica após pré-tratamento ácido 27
Figura 5. Mecanismo de hidrólise da molécula de xilana por xilanases das famílias GH 10 e GH 11 32
Figura 6. Características morfológicas de *Aspergillus hortai* 43
Figura 7. Fluxograma das etapas de purificação da principal xilanase de *A. hortai* produzida por FES 48
Figura 8. Perfil cromatográfico da xilanase bruta de *A. hortai* em coluna CM Sephadex C-50 58
Figura 9. Perfil cromatográfico de Xyl 3 em coluna Fenil Sepharose 59
Figura 10. Perfil cromatográfico de Xyl 3 em coluna Sephadex G-50 60
Figura 11. Perfil em eletroforético da Xyl 3 purificada de *A. hortai* cultivado em meio sólido 61
Figura 12. Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade xilanase 62
Figura 13. Estabilidade da xilanase ao NaCl 64
Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade xilanase 66
Figura 15. Estabilidade da xilanase ao pH 68
Figura 16. Efeito da temperatura sobre a atividade xilanase 70
Figura 17. Estabilidade térmica da xilanase bruta 73
Figura 18. Estabilidade térmica da xilanase purificada 74
Figura 19. Produtos de hidrólise da xilana *oat spelt* pela Xyl 3 purificada 80

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Exemplos de pré-tratamentos aplicados ao material lignocelulósico 24

Tabela 2. Características de xilanases de diversas famílias produzidas por micro-organismos 34

Tabela 3. Aplicações das xilanases produzidas por micro-organismos 38

Tabela 4. Etapas de purificação da principal xilanase do filtrado bruto de *A. hortai* em fermentação sólida 57

Tabela 5. Efeito de íons e compostos químicos sobre a atividade xilanase bruta e purificada 77

Tabela 6. Especificidade da xilanase purificada por diferentes substratos 78

Tabela 7. Parâmetros cinéticos da xilanase purificada 81

Tabela 8. Parâmetros cinéticos de algumas xilanases de *Aspergillus* sp. 82

Tabela 9. Composição química dos subprodutos da indústria do milho *in natura* 83

Tabela 10. Rendimento de extração e composição química das hemiceluloses extraídas dos subprodutos 84

Tabela 11. Produtos da hidrólise enzimática dos subprodutos *in natura* por *A. hortai*. Análise pelo método do ADNS 85

Tabela 12. Produtos da hidrólise enzimática das xilanas extraídas dos subprodutos por *A. hortai*. Análise pelo método do ADNS 86

Tabela 13. Produtos da hidrólise enzimática dos subprodutos *in natura* por *A. hortai*. Análise por CLAE 87

Tabela 14. Produtos da hidrólise enzimática das xilanas extraídas dos subprodutos por *A. hortai*. Análise por CLAE 88

LISTA DE ABREVIATURAS

2G	Segunda geração (etanol)
ρNPX	ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo
ADNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
Avicel	Celulose microcristalina
Aw	Atividade de água
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia liquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FES	Fermentação em estado sólido
Glc	Glicose
K_m	Constante de Michaelis
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
$V_{máx}$	Velocidade máxima de conversão
XOS	Xilo-oligossacarídeos
Xyl	Xilose
X_2	Xilobiose
X_3	Xilotriose
X_4	Xilotetraose
X_5	Xilopentose
X_6	Xilohexose

SUMÁRIO

Página
1 INTRODUÇÃO 14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
2.1 Biomassa lignocelulósica e subprodutos agroindustriais 16
2.2 Hemiceluloses e xilana 19
2.3 Pré-tratamento do material lignocelulósico 22
2.3.1 Pré-tratamento ácido 26
2.3.2 Pré-tratamento alcalino 27
2.3.3 Pré-tratamento alcalino oxidativo 28
2.4 Fermentação em estado sólido (FES) 29
2.5 Endoxilanases 31
2.5.1 Multiplicidade e regulação da produção das xilanases 36
2.5.2 Aplicações biotecnológicas das xilanases 37
2.6 Enzimas halofílicas e halotolerantes 40
2.7 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica e produção de xilo-oligossacarídeos 41
2.8 O gênero *Aspergillus* e a espécie *A. hortai* 43
3 OBJETIVOS 45
3.1 Objetivo geral 45
3.2 Objetivos específicos 45
4 MATERIAL E MÉTODOS 46
4.1 Cultivo e manutenção do fungo *Aspergillus hortai* 46
4.2 Extração da enzima bruta 46
4.3 Ensaios Enzimáticos 46
4.3.1 Determinação da atividade xilanase 46
4.3.2 Determinação da atividade β-xilosidase 47
4.3.3 Determinação da atividade celulase: endo e exoglucanase 47
4.3.4 Determinação de proteínas totais 48
4.4 Purificação da principal xilanase extracelular de *A. hortai* cultivado por FES 48
4.4.1 Cromatografia de troca iônica 49
4.4.2 Cromatografia de interação hidrofóbica 49
4.4.3 Cromatografia de exclusão molecular 49
4.4.4 Eletroforese em condição desnaturante 50
4.5 Caracterização da xilanase bruta e purificada de *A. hortai* cultivado em FES 51
4.5.1 Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade xilanase bruta e purificada e estabilidade na presença do sal 51
*4.5.2 Efeito do pH sobre a atividade xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaC*l 51
4.5.3 Estabilidade da xilanase bruta e purificada ao pH na presença e ausência de NaCl 51
4.5.4 Efeito da temperatura sobre a atividade xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl 52
4.5.5 Estabilidade térmica da xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl 52

4.5.6 Efeito de íons metálicos e compostos químicos sobre a atividade xilanase bruta e purificada 52
4.5.7 Especificidade da xilanase bruta e purificada pelo substrato 53
4.5.8 Produtos de hidrólise da xilana oat spelt pela Xyl 3 purificada 53
4.5.9 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ 53
4.6 Caracterização do sabugo, palha e folha de milho 54
4.6.1 Determinação da composição química dos subprodutos in natura 54
4.6.2 Extração de hemicelulose dos subprodutos 55
4.6.3 Determinação da composição química das hemiceluloses extraídas dos subprodutos 55
4.7 Hidrólise enzimática dos subprodutos 55
4.7.1 Análise da produção de XOS pelo método do ADNS 56
4.7.2 Análise da produção de XOS por CLAE 56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
5.1 Purificação da principal xilanase extracelular de *A. hortai* cultivado por FES 57
5.1.1 Eletroforese em condição desnaturante 60
5.2 Caracterização da xilanase bruta e purificada de *A. hortai* cultivado em FES 62
5.2.1 Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade xilanase bruta e purificada e estabilidade na presença do sal 62
5.2.2 Efeito do pH sobre a atividade xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl 65
5.2.3 Estabilidade da xilanase bruta e purificada ao pH na presença e ausência de NaCl 67
5.2.4 Efeito da temperatura sobre a atividade xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl 69
5.2.5 Estabilidade térmica da xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl 71
5.2.6 Efeito de íons metálicos e compostos químicos sobre a atividade xilanase bruta e purificada 76
5.2.7 Especificidade da xilanase bruta e purificada pelo substrato 78
5.2.8 Produtos de hidrólise da xilana oat spelt pela Xyl 3 purificada 79
5.2.9 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ 80
5.3 Caracterização do sabugo, palha e folha de milho 83
5.3.1 Determinação da composição química dos subprodutos in natura 83
5.3.2 Extração e determinação da composição química das hemiceluloses extraídas dos subprodutos 83
5.4 Hidrólise enzimática dos subprodutos 85
5.4.1 Análise da produção de XOS pelo método do ADNS 85
5.4.2 Análise da produção de XOS por CLAE 86
6 CONCLUSÕES 89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

1 INTRODUÇÃO

A intensa atividade agrícola do Brasil é responsável pela geração anual de milhões de toneladas de subprodutos sólidos (ABIB, 2011; BRASIL, 2011). O grande problema relacionado à essa produção está na sub-exploração desses materiais, os quais, sem aplicação viável, acabam sendo destinados de maneira incorreta, podendo gerar grandes danos ambientais. Por outro lado, estes subprodutos são caracterizados como biomassas lignocelulósicas, sendo compostos por celulose, hemiceluloses e lignina, além de outros polissacarídeos, proteínas e lipídios, em menor porcentagem, e podem ser reaproveitados para a produção de diversos compostos de alto valor agregado como enzimas, corantes naturais, ácidos orgânicos entre outros (KAPOOR; PANWAR; KAIRA, 2016).

A atividade do setor agrícola é uma das mais importantes para a economia brasileira, tendo grande participação no PIB (Produto Interno Bruto) do país. Dentre as culturas economicamente mais representativas, destaca-se as da cana-de-açucar, do café e do milho, a partir das quais, são geradas, anualmente, toneladas de subprodutos lignocelulósicos sólidos. Em particular, da cultura do milho, são gerados, como principais subprodutos a palha, restos de colmo (caule), folhas, cascas e sabugo (AMARASEKARA, 2014), cujas destinações, geralmente, são a queima, para a geração de energia, e a alimentação animal, o que demonstra a subvalorização de um material com potencial para utilização na conversão em novos compostos.

A xilana é o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza, depois da celulose, pois é a hemicelulose presente em maior proporção nos resíduos lignocelulósicos (DAMM et al., 2016). A xilana da parede celular vegetal é um heteropolissacarídeo constituído por uma cadeia principal de resíduos de D-xilose unidos por ligações β-1,4, podendo apresentar ramificações principalmente de α-L-arabinose, ácidos D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico, ácidos ferúlico e ρ-cumárico ligados aos resíduos de L-arabinose, além de grupamentos acetil e outros em menor proporção (JUTURU; WU, 2012; SUN et al. 2016). Dada a complexidade da molécula de xilana, para a sua completa hidrólise é necessário que um sistema enzimático complexo atue sobre o material lignocelulósico de forma conjunta. Este sistema inclui diversas enzimas, como as β-1,4-endoxilanases, as β-xilosidases, as α-L-arabinofuranosidases, as α-glucuronidases entre outras (BEG et al., 2001; BAJPAI, 1997). A conversão de biomassa lignocelulósica em produtos de interesse representa uma significativa parte do esforço no sentido de se alcançar a viabilidade econômica do processamento da

biomassa, bem como do desenvolvimento de diferentes formas de produção de compostos de interesse econômico e de energia renovável (DUMON et al., 2012; QING et al., 2013).

As β-1,4-endoxilanases (EC. 3.2.1.8), também chamadas xilanases, são hemicelulases capazes de catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas β-1,4 da cadeia principal da xilana, liberando xilo-oligossacarídeos (BIELY, 1985; POLIZELI et al., 2005; GRAY et al., 2006). O interesse na produção de enzimas xilanolíticas, em especial das xilanases, tem ganhado atenção nas últimas décadas em vista da sua ampla possibilidade de aplicação em diversos setores da indústria, incluindo a produção de cosméticos, alimentos, biocombustíveis, ração animal, na clarificação de sucos e vinhos, no biobranqueamento de papel e celulose, na indústria têxtil e no tratamento de resíduos, cujos mercados movimentam milhões de dólares anualmente (UMSZA-GUEZ et al., 2011, KUMAR et al., 2017). Além dessas, uma interessante, e menos estudada, aplicação que, também, vem se destacando principalmente no mercado internacional, é a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS), a partir de subprodutos de origem lignocelulósica. Os XOS são oligômeros constituídos de xilose e proporções variadas de grupos substituintes como acetil, ácidos urônicos e fenólicos (KABEL et al., 2002). Tais compostos têm sido obtidos, com sucesso, a partir de processos hidrolíticos da biomassa lignocelulósica e apresentam alto potencial de aplicação em diversos ramos industriais, incluindo o setor farmacêutico, de química fina, alimentício e na agricultura (BRIENZO, 2010; MANRICH, 2012; POLIZELI et al., 2005; VÁZQUEZ et al., 2005).

Assim, em vista da ampla possibilidade de aplicações das enzimas xilanases, somada à grande geração de subprodutos lignocelulósicos e à possibilidade de reutilização desse material com o emprego de tais enzimas, foi desenvolvido o presente trabalho, o qual buscou a purificação, a caracterização e a aplicação de uma endoxilanase produzida por uma linhagem de *Aspergillus* ainda pouco estudada nesse sentido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica e subprodutos agroindustriais

A biomassa lignocelulósica é categorizada em quatro principais grupos segundo sua proveniência: (1) biomassa florestal, (2) subprodutos agriculturais (cascas de arroz, trigo, palha de malte, palha de milho, bagaço da cana-de-açúcar), (3) culturas energéticas (switchgrass, miscanto, cana-energia), e (4) tipos variados de resíduos celulósicos (resíduos municipais, serragem, polpas vegetais) (KIM; LEE; KIM, 2016). Em relação aos subprodutos agriculturais, uma grande variedade desses materiais tem sido empregada no cultivo de micro-organismos, visando a produção de compostos de alto valor agregado como as enzimas. Entre os substratos mais utilizados para esse fim estão o bagaço da cana-de açúcar, farelos de trigo, palha de arroz e de milho, sabugo de milho, pseudocaule de bananeira, restos do cultivo da mandioca, soja, café, frutas e vegetais entre outros (KAPOOR; PANWAR; KAIRA, 2016). Só no Brasil, mais de 240 milhões de toneladas de resíduos sólidos são gerados anualmente levando-se em consideração apenas as culturas mais representativas em termos de área cultivada no país: cana, café e milho (ABIB, 2011; BRASIL, 2012; CONAB, 2016; IPEA, 2012). A cultura do milho (*Zea mays*), correspondende a aproximadamente 23,0% do total da área plantada no país (IPEA, 2012). A maior parte da produção desse grão é destinada à ração animal, mas ele também pode ser transformado em óleo, farinha, amido, margarina, flocos para cereais matinais, entre outros produtos. Em escala global, o Brasil ocupa a terceira posição na produção de milho. Essa grande produção, é seguida por uma expressiva geração de subpodutos sólidos, calculados em aproximadamente 36 milhões de toneladas somente no ano de 2016 (ABIB, 2011; NASCIMENTO, 2017). Da cultura são gerados, como principais subprodutos, a palha, restos de colmo (caule), folhas, cascas e sabugo (AMARASEKARA, 2014), cujas destinações, geralmente, são a queima, para a geração de energia e a alimentação animal.

Biomassa lignocelulósica é o termo utilizado para descrever o material formado da parede celular dos vegetais (AMARASEKARA, 2014; KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016). Esse material é composto, majoritariamente, por carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina, além de proteínas, lipídios e substâncias inorgânicas. A composição exata de tais componentes nos diversos tipos de biomassa é bastante variável e dependente da espécie de planta, do tipo de tecido e até mesmo do estágio de desenvolvimento (GUERRIERO et al., 2016; KIM; LEE;

KIM, 2016). Um esquema da estrutura da parede celular vegetal e a organização dos seus três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina é mostrado na **Figura 1**.

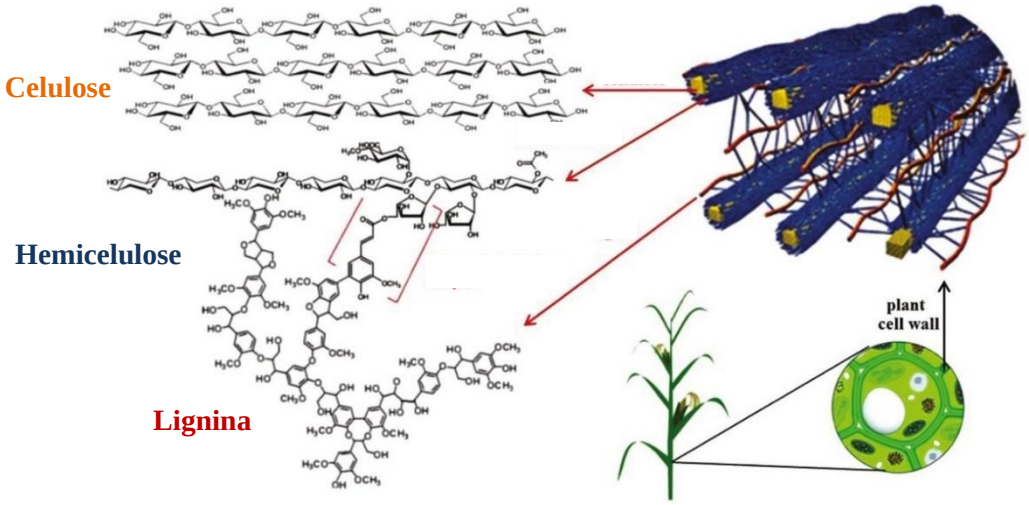
A celulose é o principal componente da parede celular vegetal. Sua molécula é constituída por uma cadeia linear não ramificada de dez a quinze mil resíduos de D-glicose unidos aos pares (celobioses) por ligações glicosídicas do tipo β-1,4 (MARIANO; KISSI; DUFRESNE, 2014; SUN et al., 2016, WERTZ; MERCIER; BÉDUÉ, 2010). Tal configuração permite que as longas cadeias de glicose se unam paralelamente umas às outras por meio da formação de pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares entre os grupos hidroxil presentes nas glucopiranoses, e forças de Van der Waals, dando origem às microfibrilas. As microfibrilas, por sua vez, se reúnem em feixes maiores, formando as fibrilas de celulose, que se encontram imersas em uma matriz amorfa de hemiceluloses e lignina (MIAO; HAMAD, 2013; SAINI; SAINI; TEWARI, 2014). As moléculas de celulose se estruturam de maneira bifásica: quando organizadas de forma ordenada, formam regiões cristalinas altamente estáveis e mecanicamente resistentes, quando arranjadas de forma menos ordenada, formam regiões amorfas menos resistentes (CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011; DHYANI; BHASKAR, 2017; MCCANN; CARPITA, 2015; MOON et al., 2011).

Como segundo maior componente em abundância na parede celular vegetal, após a celulose, estão as hemiceluloses: polissacarídeos complexos constituídos por uma cadeia principal de açúcares com até 200 monômeros, sendo a xilose e a manose, os mais comuns. As hemiceluloses estão presentes na interface entre as microfibrilas de celulose e a lignina, conferindo adesão e coesão a esses componentes sendo que, as quantidades, bem como a estrutura e o grau de polimerização são altamente variáveis de acordo com a espécie da planta. A natureza amorfa das hemiceluloses conferem uma baixa resistência mecânica à molécula, a qual é facilmente hidrolisada e solubilizada na presença de ácidos ou bases diluídas, bem como por hemicelulases (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; DHYANI; BHASKAR, 2017; KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016).

A lignina, fração mais complexa da biomassa lignocelulósica, por sua vez, é um polímero heterogêneo e amorfo de alta massa molecular. Apresenta estrutura tridimensional composta predominantemente por unidades de fenilpropano substituídas pelos álcoois coniferil, sinapil e p-coumaril, dando origem às subunidades guaiacil, siringil e hidroxilfenil, respectivamente. Na parede celular vegetal, a lignina encontra-se firmemente associada aos carboidratos por meio de diversos tipos de ligações, especialmente as do tipo éter e éster, de forma que preenche e une as lacunas entre e em torno da celulose e da hemicelulose como uma “cola”. Deste modo,

confere rigidez, impermeabilidade e proteção a ataques microbianos (PENG et al., 2011; RAGAUSKAS et al., 2014). A lignina está presente em toda biomassa de origem vegetal, no entanto, a composição exata dos seus componentes, bem como o seu grau de polimerização, são amplamente variáveis de acordo com o tipo de planta (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

Figura 1 - Esquema simplificado da estrutura da parede celular vegetal.



Microfibrilas de celulose organizadas em fibras associadas à hemicelulose que, por sua vez, está covalentemente ligada à lignina, a qual preenche as lacunas entre a celulose e a hemicelulose. Fonte: adaptado de Volynets, Mozaffari e Dahman (2016).

Além desses três principais componentes, a biomassa é, também, composta por extrativos/voláteis e outros componentes inorgânicos em menor quantidade. Os extrativos são compostos orgânicos intermediários do metabolismo da planta, neles se incluem alcalóides, gorduras, mucilagens, pectinas, proteínas, resinas, ceras, pigmentos e clorofilas. Funcionam como reserva energética e como mecanismo de defesa contra o ataque de micro-organismos e insetos. Tais componentes são facilmente extraídos do material utilizando solventes polares como água e álcool, ou apolares como hexano e tolueno. Já, os componentes inorgânicos são aqueles que se apresentam como cinzas após combustão da biomassa. As cinzas podem ser componentes intrínsecos da biomassa, como íons de alumínio, cálcio, magnésio, potássio e sódio, ou adicionados de forma antropogênica como a sílica, recolhida durante a colheita do material (AMARASEKARA, 2014; DHYANI; BHASKAR, 2017). Apesar de pequena representação na composição total da biomassa, tais componentes podem exercer a maior

influência na determinação do melhor processo de conversão (WILLIAMS; EMERSON; TUMULURU, 2017).

Dada a abundância desses componentes na parede celular vegetal, especialmente dos carboidratos, o material lignocelulósico, subproduto da agroindústria, se apresenta como uma potencial fonte sustentável para a produção de valiosos compostos como biocombustíveis, fertilizantes, rações, produtos químicos e enzimas (KAPOOR; PANWAR; KAIRA, 2016). Nesse sentido, diversas tecnologias voltadas para a conversão da biomassa têm surgido nas últimas décadas, tendo como principal objetivo, tornar o processo economicamente viável. A parede celular vegetal naturalmente evoluiu de forma a apresentar complexos mecanismos químicos e estruturais que contribuem para a resistência do material lignocelulósico a ataques físicos, químicos e enzimáticos. Exemplos incluem a presença de tecido epidérmico, particularmente a cutícula e ceras epicuticulares, o arranjo e densidade dos feixes vasculares e o seu grau de lignificação. Essa resistência, também conhecida como recalcitrância, tem sido a principal responsável pelos altos custos de conversão do material lignocelulósico e, o maior desafio a ser superado no campo das tecnologias baseadas na conversão da biomassa (HIMMEL et al., 2007; MCCANN; CARPITA, 2015; SILVEIRA et al., 2013).

2.2 Hemiceluloses e xilana

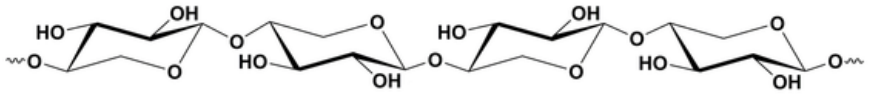
As hemiceluloses constituem um grupo de homo e heteropolissacarídeos não celulósicos, de baixa massa molecular, associados às fibras de celulose através de pontes de hidrogênio e, à lignina, por ligações covalentes (DAMM et al., 2016). A classificação das frações de hemicelulose se dá de acordo com o principal, ou principais, monossacarídeos presentes em sua cadeia principal, incluindo, entre eles, pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose). Ainda, como grupos pendentes podem aparecer ácidos urônicos (4-O-metil-D-glucuronico, D-glucuronico e D-galacturonico) e, com menor frequência, L-ramnose e L-fucose. A maioria das hemiceluloses são compostas por dois a seis desses açúcares, que se organizam dando origem a uma variedade de hemiceluloses com diferentes estruturas que vão de lineares, nas homoxilanas, a altamente ramificadas, nas heteroxilanas (BASTAWDE, 1992; HEINZE; DAUS, 2015; MANRICH, 2012; SCHELLER; ULSKOV, 2010).

Nas madeiras moles, as principais hemiceluloses presentes são as xilanas e as glucomananas, sendo essas geralmente não acetiladas apresentando grau de polimerização de

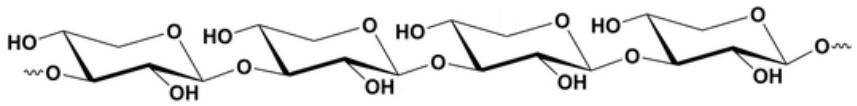
70 a 130 unidades monoméricas. Já, nas madeiras duras, a xilana é a principal hemicelulose e, nesse caso, pode ser acetilada e se encontra em um grau de polimerização maior, de 150 a 200 unidades (BEG et al., 2001; MENON; PRAKASH; RAO, 2010). A xilana é o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza, depois da celulose e é, também, a hemicelulose presente em maior proporção na parede celular das gramíneas (DAMM et al., 2016) podendo representar até 15% da biomassa da madeira de folhosas, e até 50% dos tecidos de monocotiledôneas, gramíneas e cereais (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). É constituída por uma cadeia principal de resíduos de D-xilose unidos por ligações β-1,4, majoritariamente, podendo existir na forma de homo ou heteroxilanas, conforme a presença de grupos substituintes na cadeia principal. As homoxilanas são homopolissacarídeos de xilose não ramificados, incluem as β-1,4-D-xilanas (**Figura 2a**), as β-1,3-D-xilanas (**Figura 2b**), e as β-1,3; 1,4-D-xilanas (**Figura 2c**) Estas últimas são pouco comuns em ambientes naturais e têm sido comumente obtidas de poucas fontes, incluindo alguns tipos de algas (*Palmariales* sp., *Nemaliales* sp., *Caulerpa* sp. e *Bryopsis* sp.) e plantas (C*yamopsis tetragonoloba*, *Nicotiana tabacum*, *Stipa tenacissima*) (HEINZE; DAUS, 2015; SHANKAR; GUPTA, 2016; ZHOU et al., 2016).

Figura 2 - Estrutura esquemática das cadeias de homoxilana.

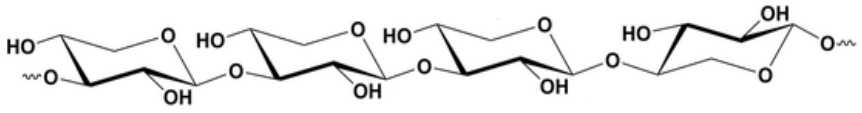
a) β-1,4-D-xilana



b) β-1,3-D-xilana



c) β-1,3;1,4-D-xilana

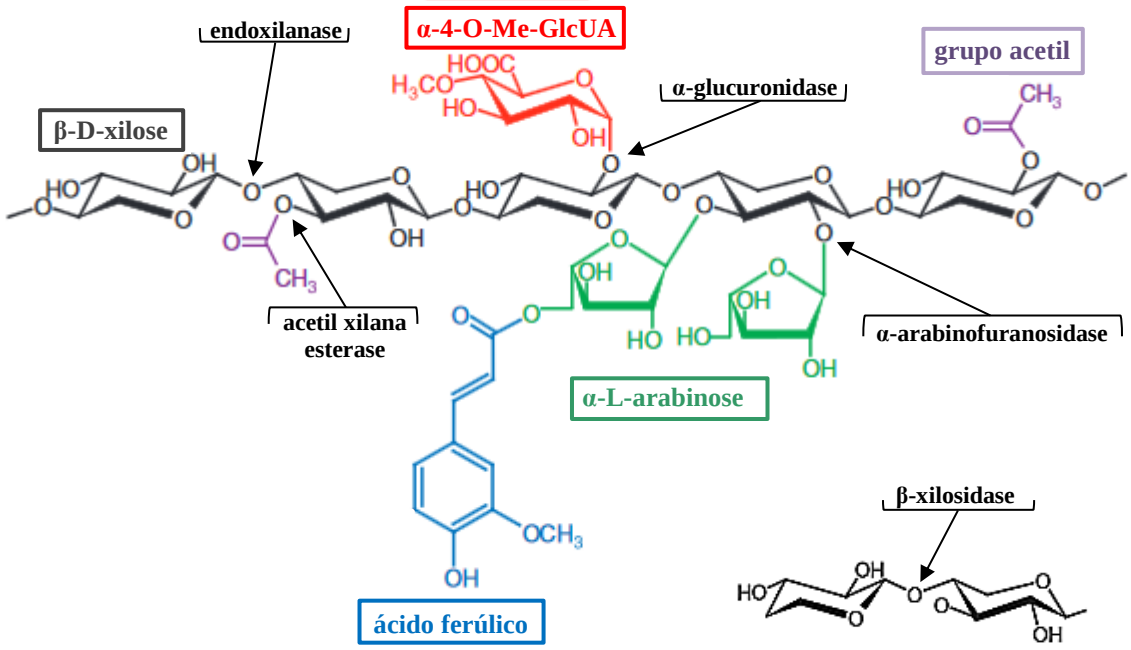


Fonte: Adaptado de Zhou et al. (2016).

As heteroxilanas, por sua vez, são polissacarídeos de xilose ramificados, classificados em glucuronoxilanas, arabinoxilanas, arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas. Esta

classificação é baseada em seus constituites e grupos substituintes que podem ser de D-xilose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose, ácidos D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico, ácidos ferúlico e ρ-cumárico, ligados aos resíduos de L-arabinose, além de grupamentos acetil e outros em menor proporção (SUN et al. 2016; ZHOU et al., 2016) (**Figura 3**). Tais grupos substituintes proporcionam estabilidade a molécula, sendo importantes na determinação da sua solubilidade, conformação física, reatividade com os outros componentes hemicelulósicos, suscetibilidade à degradação por enzimas, entre outras propriedades funcionais (PASSARINHO, 2014). As heteroxilanas são moléculas naturalmente mais abundantes sendo encontradas, principalmente, nas paredes primárias de gramíneas e nas paredes secundárias de angiospermas (DINAND; VIGNON, 2001; JOSELEAU; COMTAT; RUEL, 1992).

Figura 3 - Estrutura esquemática da molécula de heteroxilana.



Esquema de molécula composta por uma cadeia principal de resíduos de D-xilose, seus principais grupos substituintes e respectivos sítios de ataque pelas enzimas xilanolíticas. Fonte: Adaptado de Dodd; Cann (2009).

Dada a variabilidade e complexidade da cadeia de xilana, para a sua completa hidrólise, é necessária a ação sinérgica de um sistema enzimático com ação nos grupos substituintes. Este sistema inclui diversas enzimas, como as acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), responsáveis pela remoção dos grupos acetil, as feruloil-esterases de ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) e ρ-cumárico (EC 3.1.1), que hidrolisam as ligações ésteres desses ácidos, as glucuronidases (EC

3.2.1.139), que hidrolisam as ligações α-1,2 do ácido glucurônico com os resíduos de xilose, e as α-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), que hidrolisam as ligações entre os resíduos de α-L-arabinose e β-D-xilose. Com a remoção desses grupos substituintes, a cadeia principal de xilana fica mais exposta e, então, pode ser facilmente hidrolisada pelas β-1,4-endoxilanases (EC 3.2.1.8), que atuam internamente à molécula, liberando xilobiose e xilo-oligossacarídeos superiores, e pelas β-xilosidases (EC 3.2.1.37), que apresentam afinidade por xilobiose e xilo-oligossacarídeos curtos, liberando monômeros de xilose (**Figura 3**) (BEG et al., 2001; DODD; CANN, 2009; GÍRIO et al., 2010; POLIZELI et al., 2005;).

A conversão das hemiceluloses em produtos de interesse representa uma significativa parte do esforço no sentido de se alcançar a viabilidade econômica do processamento da biomassa lignocelulósica (DUMON et al., 2012; QING et al., 2013). As hemiceluloses apresentam excelentes propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, que possibilitam sua aplicação, na forma nativa ou modificada, em uma variedade de processos em diferentes áreas como na indústria de alimentos (prebióticos e adoçantes), farmácia e medicina (xilo-oligossacarídeos e curativos), energia (biocombustíveis e biogás), química (fonte de ácido lático e ferúlico, produção de butanol, vanilina, furfural e quitosana), de materiais poliméricos (biofilmes e bioadesivos), biossurfactantes, e como aditivos ou agentes floculantes na indústria de papel (CHEN et al., 2016; MENON; PRAKASH; RAO, 2010; PENG; SHE, 2014; PETZOLD-WELCKE et al., 2014).

2.3 Pré-tratamento do material lignocelulósico

Em um processo integrado de conversão da biomassa lignocelulósica para a produção de compostos de valor agregado, o pré-tratamento é elemento chave considerando-se que o sucesso das etapas subsequentes de sacarificação e fermentação depende, em grande parte, dos resultados dessa fase (KIM; LEE; KIM, 2016). A aplicação de um pré-tratamento tem como objetivos principais a remoção de componentes químicos indesejáveis e a diminuição da recalcitrância do material para as etapas posteriores do processo. A recalcitrância representa uma barreira à degradação dos polissacarídeos e da lignina, logo, para que se consiga isolar cada um desses componentes, é necessário realizar alterações nas propriedades estruturais da matriz lignocelulósica. Tais alterações podem ser feitas por meio de diversos pré-tratamentos, que podem ser químicos, físicos, físico-químicos e/ou biológicos (**Tabela 1**). Uma vez que diferentes materiais lignocelulósicos possuem diferentes propriedades físico-químicas, a

adoção do pré-tratamento mais adequado deve ser baseada nas propriedades do material e no componente que se deseja isolar. Em geral, um pré-tratamento ideal é aquele que possibilita a obtenção do produto de interesse, a custos de processamento razoáveis, sem degradá-lo e sem produzir compostos tóxicos como, por exemplo, furfural, hidroximetilfurfural, ácidos acético, fórmico e levulínico, compostos fenólicos e sais, que podem inibir a ação microbiana posterior e, consequentemente, levar a um baixo rendimento da fermentação.

Entre os diversos pré-tratamentos apresentados (**Tabela 1**), o ácido leva a despolimerização da xilana, permitindo sua obtenção na forma monomérica, já o alcalino e o oxidativo em meio alcalino permitem a sua obtenção na forma de polissacarídeos solúveis. Tais pré-tratamentos, assim como os produtos resultantes das suas aplicações são industrialmente bastante interessantes. Em vista disso, os próximos tópicos apresentam um maior detalhamento destes tipos de pré-tratamentos.

Tabela 1 - Exemplos de pré-tratamentos aplicados ao material lignocelulósico.

Métodos		Breve descrição do método	Referências
Físicos	**Extrusão**	Cilindro aquecido (>300 °C) com um ou dois parafusos giratórios em seu interior. O cisalhamento entre os parafusos e as paredes do cilindro gera a tensão necessária para triturar a biomassa.	MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015; WAHID et al., 2015; ZHENG; REHMANN, 2014
	Micro-ondas	Ação de micro-ondas que criam um campo magnético responsável pela vibração das ligações polares dos componentes da biomassa, com geração de calor, favorecendo a disrupção do material, criando poros em sua estrutura.	ETHAIB et al., 2015; PULIGUNDLA; OH; MOK, 2016
	Moagem de bolas	Tambor rotatório com esferas, geralmente de metal. Biomassa em meio úmido ou seco. O atrito físico entre as bolas, associado a rotação do tambor gera a tensão necessária para triturar a biomassa.	AKHTAR et al., 2016; KUMAR; SHARMA, 2017
	Pirólise	Processo de degradação térmica onde a biomassa é sujeita a altas temperaturas (~290-800 °C) na ausência de agentes oxidantes como o oxigênio, por períodos de tempo variáveis.	BRIDGWATER, 2012; KUMAR; SHARMA, 2017;
Químicos	**Hidrólise ácida**	Quebra de ligações glicosídicas com ácidos, geralmente sulfúrico ou clorídrico, concentrado e/ou diluído, associado a tempo, temperatura e pressão variáveis.	KUMAR; SHARMA, 2017; TRAJANO; WYMAN, 2013
	Hidrólise alcalina	Hidrólise da biomassa com uma base, geralmente hidróxido de sódio, de potássio, de cálcio, amônia ou uréia, em temperaturas amenas. Os agentes alcalinos promovem um inchaço das fibras, aumentando a porosidade do material, favorecendo sua ruptura.	KIM; LEE; KIM, 2016; SINGH; SUHAG; DHAKA, 2015; XU; SUN, 2016
	Organosolv	Hidrólise da biomassa, a altas temperaturas, com solventes orgânicos como metanol, etanol, acetona e etilenoglicol, ou suas misturas com ou sem ácidos.	KUMAR; SHARMA, 2017; MOOD et al., 2013; SIDIRAS; SALAPA, 2015

	Oxidativo	Adição de um agente oxidante, geralmente o peróxido de hidrogênio, à biomassa, em meio líquido. A hidrólise resulta de diversas reações como substituições eletrolíticas, quebra de ligações alquil/aril éter, e/ou de núcleos aromáticos presentes nas moléculas.	MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015; LI et al., 2013
	Ozonólise	Utilização de gás ozônio como agente oxidante o qual reage com os componentes da biomassa, principalmente a lignina, promovendo sua desestruturação.	MOOD et al., 2013; TRAVAINI et al., 2016
	Líquidos iônicos	Dissolução dos componentes lignocelulósicos por sais iônicos na forma liquída, geralmente sais imidazólicos.	REDDY, 2015; WANG et al., 2017
Físico-químicos	**Explosão a vapor**	Tratamento da biomassa em ambiente saturado com vapor, a alta temperatura e pressão, por alguns segundos/minutos, seguido de rápida descompressão, rompendo a estrutura do material lignocelulósico.	BRODEUR et al., 2011; KUMAR; SHARMA, 2017
	Auto hidrólise	Hidrólise da biomassa com água, a alta temperatura e pressão por alguns minutos. A água pressurizada em alta temperatura libera ácido acético da hemicelulose, acidificando o meio e desestruturando a matriz lignocelulósica.	PUTRO et al., 2016; YAN et al., 2016; ZHUANG et al., 2016
	Ultrassom	Formação de bolhas de cavitação no meio liquido contendo a biomassa sendo que, a implosão das bolhas gera condições extremas de temperatura e pressão, que desintegram a estrutura do material lignocelulósico.	KUMAR; SHARMA, 2017; RANJAN et al., 2016
Biológico	**Micro-organismos**	Hidrólise da biomassa lignocelulósica por enzimas secretadas por micro-organismos, geralmente fungos (brancos, amarelos e marrons) e bactérias.	AKHTAR et al., 2016; MOOD et al., 2013; PUTRO et al, 2016

2.3.1 Pré-tratamento ácido

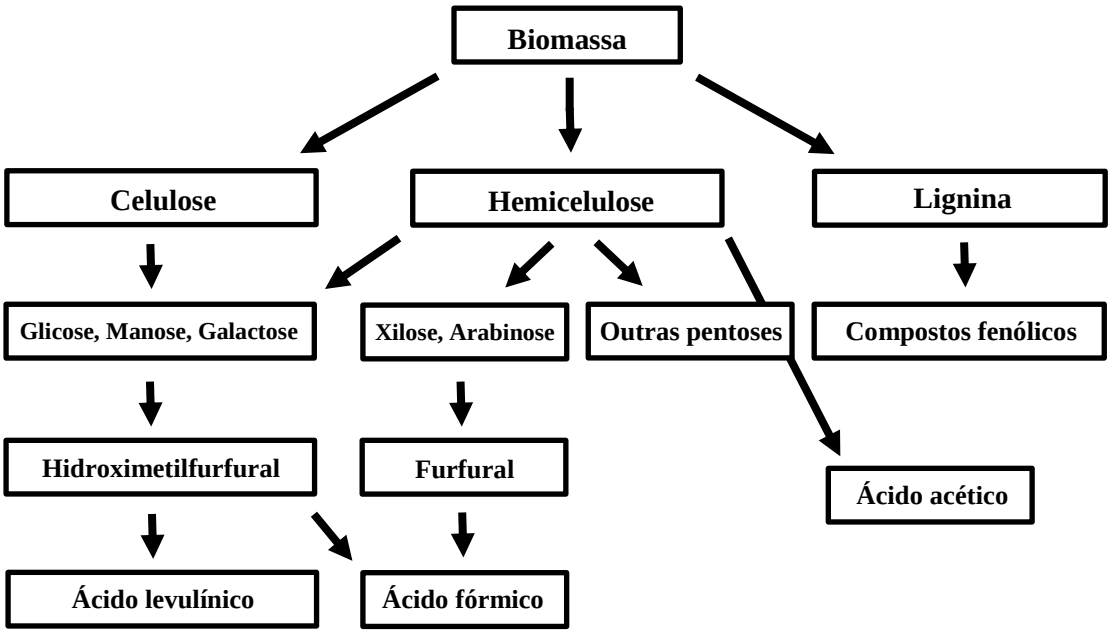
A hidrólise ácida é considerada um dos métodos mais promissores para o tratamento da biomassa no sentido da implementação industrial com o objetivo de formação de açúcares para a conversão enzimática (REZENDE et al., 2011; YANG; WYMAN, 2008). Uma das principais vantagens desse método consiste na capacidade dos ácidos em ultrapassar a camada de lignina e hidrolisar os polissacarídeos de celulose e hemicelulose, liberando moléculas individuais de açúcares. Diversos tipos de ácidos podem ser utilizados nos pré-tratamentos ácidos incluindo H_3PO_4, HNO_3, HCOOH, H_2SO_4 e HCl sendo, os dois últimos, os mais comumente usados para a hidrólise de biomassas lignocelulósicas (LENIHAN et al., 2010). As transformações químicas da biomassa durante um pré-tratamento ácido resultam de uma ação combinada entre pH baixo, pressão, tempo de residência (de 1 min a 1 h) e temperatura (150-200 ºC) (FOUGERE et al., 2016; SAHA et al., 2005). Além desses elementos, os processos de hidrólise ácida também necessitam de quantidades adequadas de água para uma elevada eficiência. Isto porque é no meio aquoso que ocorre a dissociação do ácido, o qual é transportado para o interior da biomassa, onde realiza a quebra das ligações moleculares (GURGEL, 2010; HAMELINCK, 2005). Os processos de hidrólise ácida são conduzidos sob duas principais condições: na presença de ácido concentrado e/ou diluído.

- Hidrólise ácido-concentrada: Processo aplicado principalmente com vistas a descristalização da celulose. O ácido, na forma concentrada, é capaz de promover o rompimento das pontes de hidrogênio entre as cadeias de glicose, levando a porção cristalina da molécula a um estado mais amorfo. A reação é conduzida em concentrações de ácido entre 10,0 e 30,0%, temperaturas amenas e curtos períodos de tempo, resultando em um alto rendimento em açúcares, caraterístico desse procedimento (IRANMAHBOOB; NADIM; MONEMI, 2002). A utilização de ácidos concentrados, no entanto, exige certos cuidados visto que são tóxicos, perigosos e requerem a utilização de reatores e instrumentos resistentes a corrosão. Além disso, é importante que os ácidos utilizados sejam facilmente recuperados após a hidrólise, para que o processo seja ambientalmente amigável e economicamente viável (SZENGYEL, 2000).

- Hidrólise ácido-diluída: Entre os pré-tratamentos químicos, a hidrólise com ácidos diluídos é, provavelmente, o mais aplicado, seja como tratamento prévio a hidrólise enzimática, seja como o principal processo, com vistas a obtenção de açúcares a partir do material lignocelulósico (QURESHI; MANDERSON, 1995). Nessa reação, quantidades pequenas, entre 2 e 5%, de ácido são utilizadas e, principalmente a hemicelulose é hidrolisada, produzindo uma

fração líquida rica em açúcares. Nesse caso, no entanto, o processo deve ser conduzido sob altas temperaturas (100-200 °C), para se obter altas taxas de conversão, o que pode favorecer a degradação dos carboidratos e da lignina em compostos tóxicos como furfural e hidroximetilfurfural, reduzindo o rendimento da fermentação posterior (**Figura 4**).

Figura 4 - Principais produtos de degradação da biomassa lignocelulósica após pré-tratamento ácido.



Formação de compostos inibidores da ação microbiana resultantes da degradação dos monossacarídeos e da lignina. Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.2 Pré-tratamento alcalino

Tratamentos alcalinos desempenham um importante papel na biorefinaria da biomassa lignocelulósica, podendo ser aplicados não só como etapa de pré-tratamento, mas também, como o principal método de fracionamento do material lignocelulósico (KIM; LEE; KIM, 2016). A reação alcalina é, essencialmente, um processo de deslignificação no qual uma grande quantidade de hemicelulose é, também, solubilizada (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). Por isso, bastante eficiente na remoção destes componentes da biomassa. A principal reação durante um pré-tratamento alcalino é a de desesterificação (saponificação) de ligações ésteres intermoleculares. A ação alcalina provoca um inchamento interno das fibras do material lignocelulósico, aumentando sua área superficial. Esse inchamento, reduz a interação entre a lignina e os carboidratos, levando ao rompimento da estrutura da lignina, que é solúvel nessas

condições (KIM; LEE; KIM, 2016; WEIL et al., 1994). Métodos alcalinos de pré-tratamento utilizam, majoritariamente, reagentes não poluidores e não corrosivos como amônia, carbonato de sódio, hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio e, sua eficácia, depende do conteúdo de lignina presente na biomassa e das condições aplicadas ao tratamento (KIM; LEE; KIM, 2016; MCMILLAN, 1994). São, no geral, realizados sob condições amenas de temperatura e pressão, alguns até mesmo a temperatura ambiente, minimizando a necessidade de reagentes de alto custo e equipamentos especiais resistentes a corrosão e a condições severas de reação (KIM, LEE, KIM, 2016).

2.3.3 Pré-tratamento alcalino oxidativo

O pré-tratamento alcalino oxidativo envolve o tratamento da biomassa com agentes oxidantes tais como ozônio, peróxido de hidrogênio e oxigênio em meio alcalino. A utilização desses compostos oxidantes para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica promove a redução da cristalinidade da celulose e a disrupção das interações entre carboidratos e lignina. Com isso, a hemicelulose é extensivamente solubilizada e recuperada, majoritariamente, como polissacarídeo, enquanto a lignina é fragmentada e oxidada a ácidos carboxílicos alifáticos e compostos fenólicos (MARTÍN et al., 2007). Por esse motivo, esse tipo de tratamento tem sido amplamente empregado na deslignificação e branqueamento da polpa da madeira e, para a produção de compostos químicos como vanilina, poliuretanos, poliésters e resinas fenólicas (AZARPIRA; RALPH; LU, 2014; UPTON; KASKO, 2016).

Um agente oxidante extremamente versátil e comumente utilizado para o pré-tratamento oxidativo é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido é um metabólito natural em diversos organismos que participa em várias rotas biológicas, especialmente aquelas envolvidas na decomposição de lignina por fungos, como parte de um complexo sistema enzimático (DUTRA et al., 2017). O peróxido de hidrogênio é um excelente oxidante quando em meio alcalino e apresenta baixa toxicidade, uma vez que os produtos de sua decomposição, água e oxigênio, não são poluentes. Outras vantagens da utilização do peróxido de hidrogênio alcalino se dão pelas condições amenas de reação, o baixo consumo de energia e o efetivo fracionamento da celulose, da hemicelulose e da lignina, com baixa produção de compostos tóxicos inibidores da ação enzimática (XU; SUN, 2016; DUTRA et al., 2017).

O mecanismo de decomposição do material lignocelulósico pelo H_2O_2 se baseia na formação de ânions hidroperóxido (HOO^-), resultantes da decomposição do peróxido de hidrogênio em meio líquido alcalino (**Equação 1**), que reagem com o H_2O_2 restante, levando a

formação de radicais superóxido ($O2^{-}$) e hidroxila ($OH^{\bullet}$), capazes de oxidar e romper as ligações dos componentes carboidrato e da lignina (GRAY, 2013) (**Equação 2**).

$$H_2O_2 \rightarrow H^+ + HOO^- \qquad \textbf{Equação 1}$$

$$H_2O_2 + HOO^- \rightarrow OH^{\bullet} + O_2^- + H_2O \qquad \textbf{Equação 2}$$

Durante essa reação, o pH é um dos parâmetros mais importantes para uma eficiente ação do peróxido. De fato, dependendo do pH utilizado durante o processo oxidativo, podem não ser observadas alterações significativas na estrutura química do material lignocelulósico. Essa influência já foi bastante estudada e tem-se definido a faixa entre 11,5 e 11,6 como aquela ótima para o processo oxidativo (GOULD, 1984; SAHA; COTTA, 2014; YANG et al., 2002). Nessa condição, o peróxido é capaz de reagir com as porções alifáticas e aromáticas da molécula de lignina, levando à formação de produtos de oxidação solúveis de baixa massa molecular. Com isso, a parede celular perde grande parte da sua estrutura rígida e o material vegetal é desintegrado em pequenas e dispersas fibras de textura pouco uniforme, fornecendo pontos de acesso para a hidrólise enzimática (GOULD, 1985; SELIG et al., 2009).

2.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido é definida como o processo de cultivo microbiano na ausência ou quase ausência de água livre no substrato (HOLKER; LENZ, 2005; PANDEY, 2003). Nesse sistema de cultivo, a água presente se encontra em um estado absorvido ou complexado com a matriz sólida insolúvel (KRISHNA, 2005). Dentre os diversos fatores importantes para o crescimento e atividade microbiana em um substrato particular, o tamanho das partículas sólidas e o nível de umidade/atividade de água, são os mais críticos (LIU; TZENG, 1999; SMAIL; SALHI; KNAPP, 1995; ZADRAZIL; PUNYA, 1995). No geral, partículas menores de substrato proporcionam uma grande área de superfície para o ataque microbiano, porém, limitam a oxigenação e difusão de água no meio. Em contraste, partículas maiores permitem melhor aeração e umidificação, mas oferecem reduzida área superficial para a atuação dos micro-organismos (COUTO; SANROMÁN, 2006). A umidade, por sua vez, tem influência na efetividade das reações químicas e enzimáticas, sobretudo por fornecer um meio para a solubilização, facilitando a transferência de massa de reagentes e produtos

(MODENBACH; NOKES, 2013). Assim, quaisquer alterações nesses fatores podem afetar o crescimento microbiano e, consequentemente, a produtividade de metabólitos.

Fungos e bactérias são os principais grupos de micro-organismos utilizados em fermentações sólidas, sendo os fungos filamentosos, os mais bem adaptados a esse sistema de cultivo. O seu crescimento por meio de hifas e a tolerância a baixa atividade de água (Aw) e a altas pressões osmóticas proporcionam vantagens sobre outros micro-organismos na colonização e utilização dos nutrientes disponíveis nos substratos (RAIMBAULT, 1998).

Sistemas de cultivo sólido têm se mostrado particularmente interessantes em pelo menos dois tipos de aplicações: na produção de enzimas lignocelulolíticas e na degradação da lignocelulose (ZHOU et al., 2015). A seleção de uma linhagem de micro-organismo adequada a esses propósitos, no entanto, depende de uma variedade de fatores, em particular, da natureza do substrato e das condições ambientais de crescimento. Fungos filamentosos, bactérias e leveduras tipicamente crescem na natureza em substratos sólidos, como madeiras, sementes, raízes e folhas de plantas, em associações simbióticas ou não (YAZID et al., 2017; WANG; SIPILA; OVERMYER, 2016). Os cultivos em estado sólido, nesse sentido, são bastante interessantes uma vez que se assemelham ao habitat natural desses micro-organismos e, portanto, podem se mostrar bastante eficientes na indução da produção de certas enzimas e metabólitos.

Em uma FES, o substrato sólido não só fornece grande parte dos nutrientes necessários ao crescimento do micro-organismo, mas também, atua como suporte físico para a ancoragem das células, que se multiplicam próximo ou na superfície das partículas sólidas (KAPILAN, 2015, YAZID et al., 2017). Diversos tipos de materias têm sido utilizados como suportes em uma fermentação sólida, podendo ser inertes como a vermiculita, a perlita e o polietileno. Estes materiais são, geralmente, embebidos em soluções de nutrientes apropriadas ao crescimento do micro-organismo, ou naturais, como os subprodutos da agroindústria, em cuja composição estão presentes todos ou, pelo menos, grande parte dos componentes necessários ao crescimento microbiano (CASTRO; SATO, 2015).

A fermentação sólida oferece numerosas vantagens em relação a fermentação submersa, incluindo economia de espaço necessário a fermentação, simplicidade do meio de cultivo, alta produtividade, alta concentração final e estabilidade dos produtos de interesse, baixa repressão catabólica, menor risco de contaminação devido à baixa Aw, baixo consumo de energia, fácil escalonamento, menor necessidade de solventes para a recuperação do produto final e baixa produção de líquidos efluentes tóxicos. Por outro lado, meios sólidos dificultam a distribuição

uniforme de nutrientes e oxigênio, visto que os cultivos não são mantidos em agitação, o controle da umidade, aeração, pH, determinação do crescimento microbiano e outros parâmetros fermentativos, além do que limitam os tipos de micro-organismos àqueles capazes de crescer em níveis baixos de umidade e maior viscosidade (MARTINS et al., 2011; MONSOUR et al., 2016; PÉREZ; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2016; QUIROZ et al., 2015).

A aplicação de processos de cultivo em estado sólido para a produção de bioprodutos de valor agregado como enzimas (CASTRO; SATO, 2015; DIAZ et al., 2016), ácidos orgânicos (ALI et al., 2016; DAS; BRAR; VERMA, 2015; MAI; LEE; CHOI, 2016), biopesticidas (QUIROZ et al., 2015; ZHANG et al., 2013), biosurfactantes (CASTIGLIONI et al., 2014; KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010), biocombustíveis (HORITA et al., 2015; TRZCINSKI, 2017), compostos aromáticos (SALAR; PUREWAL; BHATTI, 2016), pigmentos (DURSUN; DALGIÇ, 2016; HAQUE et al., 2016), entre outros, tem sido amplamente reportada na literatura como uma forma simples, eficiente e de baixo custo. Para a produção de enzimas, em particular, a otimização dos processos de produção por fermentação sólida é essencial e deve levar em conta diversos parâmetros do cultivo, como o tamanho da partícula sólida do substrato, a sua capacidade de absorção de água e a composição química do meio, os quais podem variar amplamente dependendo do tipo de enzima, substrato e micro-organimo utilizado.

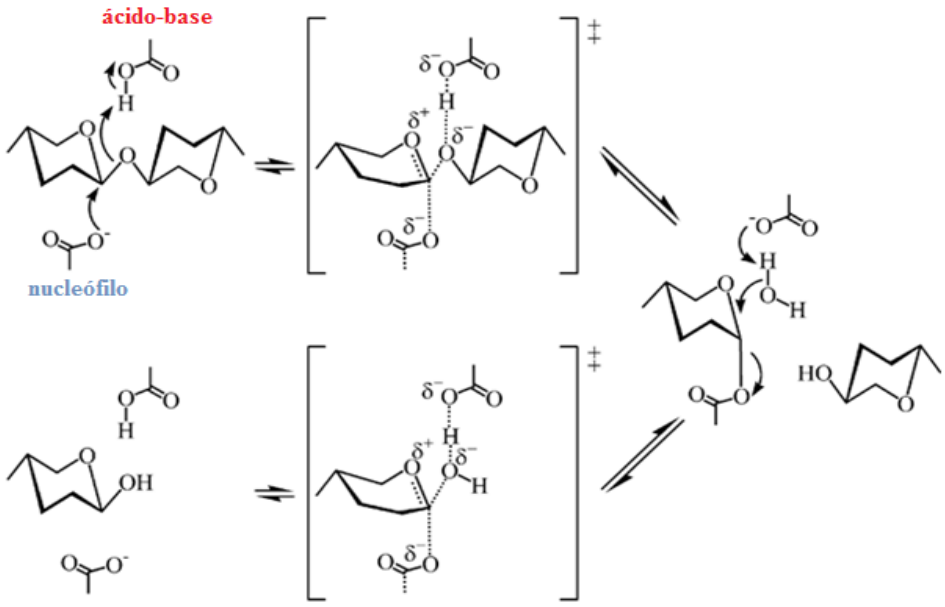
2.5 Endoxilanases

As β-1,4-endoxilanases (EC. 3.2.1.8), também chamadas xilanases, são hemicelulases capazes de catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas β-1,4 internas ao longo da cadeia principal da xilana, liberando xilo-oligossacarídeos (BIELY, 1985; GRAY et al., 2006; POLIZELI et al., 2005). As enzimas xilanolíticas pertencem a uma classe de enzimas denominadas glicosil hidrolases, as quais são classificadas em diversas famílias, sendo as endoxilanases encontradas, principalmente, entre as famílias GH 10 e GH 11 (CAZYPEDIA, 2017; LIAO et al., 2015, WALIA et al., 2017). As xilanases têm sido classificadas com base em certas características como massa molecular, ponto isoelétrico, similaridade das sequências de aminoácidos, propriedades cinéticas, especificidade pelo substrato e perfil de produtos formados. A família 10 das glicosil hidrolases é composta por endo-β-1,4-xilanases com pesos moleculares geralmente maiores que 30 kDa, pontos isoelétricos ácidos e maior afinidade por xilo-oligossacarídeos curtos. Já, a família 11 é composta por endo-β-1,4-xylanases de peso

molecular menor que 30 kDa e pontos isoelétricos alcalinos, são altamente específicas, agindo preferencialmente, na clivagem de regiões não substituídas da molécula. Outras interessantes características apresentadas pelos membros dessa família são a alta efetividade catalítica e amplas faixas de pH e temperatura ótimas de reação, o que possibilita sua aplicação em diversos processos industriais (PAES; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; WALIA et al., 2017). A **Tabela 2** apresenta as características de algumas xilanases de diversas famílias, produzidas por diferentes micro-organismos.

O ataque das xilanases ao substrato não é aleatório e, as ligações, para serem hidrolisadas, dependem da natureza do mesmo. As xilanases das famílias GH 10 e 11 catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da cadeia principal da xilana por um mecanismo de retenção da configuração β do carbono anomérico, com dois resíduos de glutamato no sítio ativo da enzima, um atuando como catalisador ácido-base, e o outro como nucleófilo (**Figura 5**). Em uma primeira etapa desse mecanismo, o resíduo ácido-base atua como ácido, protonando o substrato, enquanto o outro resíduo catalítico atua como um nucleófilo e provoca a liberação do grupo de saída e a formação de um intermediário covalente glicosil-enzima. Em uma segunda etapa, o resíduo ácido-base atua como base e atrai um próton da molécula de água que, por sua vez, ataca o carbono anomérico do intermediário glicosil-enzima, liberando o produto final e regenerando a enzima livre (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005, LIU; ZHANG; XU, 2012).

Figura 5 - Mecanismo de hidrólise da molécula de xilana por xilanases das famílias GH 10 e GH 11.



Retenção da configuração β do carbono anomérico no produto final e presença de dois resíduos de glutamato no sítio ativo da enzima.

Os mais diversos organismos produtores de xilanases têm sido reportados na literatura, entre eles, bactérias, fungos, leveduras e protozoários (KUMAR, D et al., 2017; WALIA et al., 2013). Com relação a produção comercial, no entanto, os fungos filamentosos são os organismos mais utilizados, uma vez que são capazes de produzir elevados níveis dessas enzimas, e de secretá-las para o meio extracelular, facilitando a sua recuperação (ÁLVAREZ; REYES-SOSA; DÍEZ, 2016). Além disso, os fungos filamentosos se mostram vantajosos por produzirem, concomitantemente às xilanases, diversas enzimas acessórias necessárias à quebra dos grupos substituintes das xilanas, promovendo a hidrólise completa da molécula (KUMAR, D et al., 2017; MIYAUCHI et al., 2016). O interesse na produção de enzimas xilanolíticas, em especial das xilanases, tem ganhado atenção nas últimas décadas haja vista seu potencial de aplicações biotecnológicas em diversos setores da indústria, incluindo a produção de cosméticos, alimentos, biocombustíveis e ração animal, na clarificação de sucos e vinhos, no biobranqueamento de papel e celulose, na indústria têxtil, entre outros (**Tabela 3**), cujos mercados movimentam milhões de dólares anualmente (KUMAR, S et al., 2017; UMSZA-GUEZ et al., 2011).

Tabela 2 - Características de xilanases de diversas famílias produzidas por micro-organismos.

Micro-organismo	Família	Massa molecular (kDa)	pI	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência
Bacillus sp.	GH5	48,0	9,3	6,0	55	GALLARDO et al., 2010
-	GH8	45,9	4,9	6,0-7,0	20	LEE et al., 2006
Glaciecola mesófila	GH8	95,0	-	6,0-7,0	35	GUO et al., 2013
Penicillium Simplicissimun	GH10	-	8,0	5,6	67	SCHMIDT et al., 1998
Formitopsis pinicola	GH10	58,0	4,7	4,5	70	KEUM et al., 2010
Paenibacillus barcionensis	GH10	-	-	6,5	60	VALENZUELA; DÍAZ; PASTOR, 2010
Saccharopolyspora pathumthaniensis	GH 10	36,0	-	6,5	70	SINMA, 2011
Aspergillus niger	GH10	35,0	-	5,5	55	TAKAHASHI; KAWABATA; MURAKAMI, 2013
Malbranchea cinnamomea	GH10	43,5	4,6	6,5	80	FAN et al., 2014
Gloeophyllum trabeum	GH10	50,0	-	4,0-7,0	70	KIM et al., 2014
Malbranchea pulchella	GH10	49,0	-	5,8	-	RIBEIRO et al., 2014
Caldicellulosiruptor bescii	GH10	40,2	-	7,2	70	AN et al., 2015
Penicillium Oxalicum	GH10	36,0	8,2	6,0	40	LIAO et al., 2015
	GH10	43,0	5,9	6,0	70	
Penicillium citrinum	GH10	31,0	-	4,0	65	BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2016
Thermoascus aurantiacus	GH10	33,0	-	5,0	65	SOUZA et al., 2016
Acidothermus cellulolyticus	GH10	-	-	6,0	90	KIM et al., 2016

Luteimicrobium xylanilyticum	GH10	48,1	5,9	6,0	65	KIM et al., 2017
Asspergillus fumigatus	GH10	50,0	-	5,0	75	CHANG et al., 2017
Aspergillus niger	GH11	20,0	3,5	3,5	-	TAHIR et al., 2004
Aspergillus versicolor	GH11	21,9	4,2	-	-	JEYA et al., 2009
Aspergillus japonicus	GH11	24,8	-	5,0	60	WAKIYAMA et al., 2010
Bacillus pumilus	GH11	25,4	-	8,0-9,0	50	WANG, J et al., 2010
Neocallimastix patriciarum	GH11	72,4	-	5,8	49	PAI et al., 2010
Nesterenkonia xinjiangensis	GH11	26,5	-	7,0	55	KUI et al., 2010
Peniccilium occitanis	GH11	30,0	-	3,0	65	DRISS et al., 2012
Thermobifida halotolerans	GH11	34,0	9,1	9,0	70	ZHANG et al., 2012
Chaetomium globosum	GH11	24,6	-	5,5	40	SINGH et al., 2013
Humicola insolens	GH11	22,8	-	7,0	60	YANG et al., 2014
Penicillium oxalicum	GH11	23,0	-	4,0	50	LIAO et al., 2015
	GH11	32,0	6,5	5,0	50	
Aspergillus niger	GH43	33,4	4,5	5,0	45	ZHOU et al., 2014
Clostridium thermocellum	GH141	102,2	-	6,0-6,5	67-75	HEINZE et al., 2017

2.5.1 Multiplicidade e regulação da produção das xilanases

Fungos filamentosos podem ser altamente eficientes na degradação da molécula de xilana haja vista sua capacidade em produzir multiplas xilanases de diversas famílias (LIAO et al., 2015). Exemplos incluem *Trichoderma reesei*, capaz de secretar até 6 xilanases diferentes (BIELY et al., 2014), *Penicillium oxalicum*, produzindo 8 xilanases derivadas de 6 diferentes genes (LIAO et al., 2015), *Myceliophthora* sp. com a produção de 10 isoformas funcionalmente diversas (BADHAN et al., 2004), *Aspergillus niger*, capaz de produzir até 15 xilanases diferentes (BIELY; MARKOVIC; MISLOVICOVÁ, 1985), entre outros. A heterogeneidade e complexidade da molécula de xilana, adquiridas ao longo de milhões de anos de evolução, resultou em uma diversidade de xilanases que diferem em suas propriedades físico-químicas, estruturas, modos de ação, especificidades ao substrato e abundância. Uma vez que as ligações glicosídicas no material lignocelulósico não são equivalentes, nem igualmente acessíveis, a produção de um sistema enzimático com funções especializadas é, provavelmente, uma estratégia dos micro-organismos para se alcançar uma hidrólise mais eficiente dos substratos heterogêneos na natureza (WONG; TAN; SADDLER, 1988). Um único gene pode ser capaz de expressar várias xilanases bioquimicamente diferentes umas das outras sendo que essa multiplicidade de formas se dá por uma variedade de fatores que incluem processamentos diferenciais do mRNA, modificações pós-traducionais como glicosilação, auto-agregação e digestão proteolítica (RAVICHANDRA et al., 2016; ROY et al., 2013; THOMAS et al., 2013), pela expressão das enzimas por alelos distintos de um mesmo gene ou, ainda, por genes diferentes (CHAVEZ et al., 2002; SEGURA et al., 1998).

O rendimento na produção das xilanases por micro-organismos depende de alguns fatores chave como, por exemplo, as condições metabólicas da célula, que são influenciadas por aspectos nutricionais, e as condições de cultivo, influenciadas pelo tipo de substrato, umidade, aeração, acessibilidade à molécula de xilana, pH e temperatura (BEG et al., 2001; RAVICHANDRA et al., 2016; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Em relação aos níveis de expressão, algumas xilanases são produzidas em maiores quantidades, e outras em menores. O motivo para isso pode estar relacionado às respectivas funções desempenhadas por cada enzima sendo que as xilanases presentes em menores quantidades, devem apresentar funções que não exijam a sua presença em abundância, como na hidrólise de ligações que ocorrem com pouca frequência no substrato (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

A indução da produção das xilanases é um fenômeno complexo e o nível de resposta a um indutor individual varia de organismo para organismo de modo que, um indutor que

favoreça a produção dessas enzimas em uma espécie, pode atuar como inibidor em outra espécie (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). A expressão de enzimas do sistema xilanolítico, em geral, está sujeita a indução pelo substrato e a repressão pelos seus derivados e por outros produtos enzimáticos (DE VRIES; VISSER, 2001; TONUKARI et al., 2002). Biely (1985) propõe um mecanismo explicativo no qual pequenas quantidades de xilanases constitutivas são secretadas para o meio extracelular, essas, hidrolisam a xilana e liberam xilose, xilobiose e xilo-oligossacarídeos, que são transportados para dentro da célula com o auxílio de transferases e, posteriormente, degradados por β-xilosidades ou mesmo por xilanases intracelulares, induzindo, assim, a síntese de mais xilanases. Com o acúmulo desses produtos, um efeito contrário passa a ocorrer e, esses, atuam como repressores na produção das xilanases.

A repressão catabólica pela glicose é um fenômeno comum observado durante a biossíntese das xilanases. A presença da glicose, uma fonte de carbono simples e de fácil assimilação, ativa moléculas repressoras, como as proteínas CreA, de *Aspergillus* sp., e MIG1, de *Saccharomyces cerevisiae*, que, por sua vez, se ligam à região promotora dos genes de xilanases e celulases, impedindo a sua transcrição (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; RIES et al., 2016; TAMAYO et al., 2008). Tal comportamento é bastante interessante como forma de economizar energia e tempo, contribuindo para a rápida colonização do meio por meio da seleção da fonte de carbono mais vantajosa para o micro-organismo.

2.5.2 Aplicações biotecnológicas das xilanases

As xilanases apresentam grande diversidade de características bioquímicas, o que permite a sua aplicação em uma variedade de processos industriais. Com o avanço no desenvolvimento industrial e a descoberta de novas possibilidades de aplicação, associados a necessidade de processos ambientalmente sustentáveis, a demanda por xilanases com propriedades específicas tem sido crescente nos últimos anos (KUMAR, D et al., 2017; UMSZA-GUEZ et al., 2011). Os micro-organismos têm servido como as maiores e mais eficientes fontes para a produção de inúmeras enzimas. Em escala industrial, as xilanases são produzidas principalmente por linhagens dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (HALTRICH et al., 1996; LI et al., 2000; SHI et al., 2011), destacando-se suas aplicações nos processos de hidrólise de biomassas lignocelulósicas, no biobraqueamento da polpa de celulose, na indústria de alimentos e bebidas, de ração e suplementação da dieta animal (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Aplicações das xilanases produzidas por micro-organismos.

Micro-organismo	Aplicação	Referência
	Bioconversão	
Aspergillus terreus	Biorefinaria	KAMAT et al., 2013
Aspergillus sp.	Bioetanol	THOMAS et al., 2016
Colletotrichum graminicola	Sacarificação	ZIMBARDI et al., 2013
Penicillium chrysogenum	Sacarificação	ZHANG; SANG, 2015
	Indústria de papel	
Trichoderma longibrachiatum	Despigmentação de resíduo de papel	CHUTANI et al., 2016
Aspergillus niger	Despigmentação de jornal velho	DESAI; IYER, 2016
Penicillium meleagrinum var. *viridiflavum*	Branqueamento de polpa de bambu	BORUAH et al., 2016
	Indústria têxtil	
Bacillus pumilus	Desengomagem de fibras do algodão	BATTAN et al., 2011
-	Processo de purga de fibras têxteis	SILVA, 2013
	Indústria de alimentos e bebidas	
Aspergillus niger	Clarificação de sucos	PAL; KHANUM, 2011
Bacillus pumilus		NAGAR et al., 2012
Aspergillus niger	Melhoria da qualidade da massa de pães	AHMAD et al., 2014
Aspergillus hortai		NASCIMENTO, 2017
Aspergillus foetidus	Produção de prebióticos	CHAPLA et al., 2012
Bacillus subtilis		REDDY; KRISHNAN, 2016
	Alimentação animal	
Trichoderma sp.	Melhoria na digestibilidade de nutrientes	CHEN; WANG, 2016
Aspergillus niger		ZHANG et al., 2014
Aspergillus niger		CASAS; STEIN, 2016
Aspergillus japonicus		FACCHINI et al., 2011

A hidrólise da biomassa lignocelulósica com vistas a produção de etanol de segunda geração (2G) a partir de resíduos ou subprodutos da agroindústria é, sem dúvida, uma das principais áreas de estudo de aplicação das xilanases. De forma geral, como primeira etapa nesse processo de conversão, realiza-se o pré-tratamento do material lignocelulósico a fim de promover a separação/modificação dos seus principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) e, com isso, permitir um ataque mais eficaz das enzimas celulolíticas às fibras de celulose. Durante as etapas de pré-tratamento, no entanto, podem ser formados xilo-oligômeros

e xilose, resultantes da hidrólise parcial das xilanas. A adição de xilanases à etapa de hidrólise enzimática da celulose auxilia na quebra e liberação dos xilo-oligômeros e das xiloses, facilitando o ataque das enzimas celulolíticas. Como resultado geral, há um aumento da eficiência e do rendimento dessa etapa de fermentação haja vista a maior disponibilização dos açúcares fermentáveis.

Outro importante ramo de aplicação das xilanases é no biobranqueamento da polpa de papel e celulose. A cor escura característica da polpa celulósica não branqueada resulta da presença de grupos cromóforos da molécula de lignina. O procedimento regular utilizado na remoção desses componentes requer a aplicação de grandes quantidades de agentes químicos redutores ou oxidantes altamente tóxicos ao meio ambiente. O branqueamento enzimático com xilanase por sua vez, promove a quebra de cadeias de xilana, as quais precipitaram sobre as fibras de celulose durante o processo de polpação, liberando a lignina. A exposição da lignina permite fácil acesso por reagentes de branqueamento, reduzindo a quantidade de agentes químicos necessários para o branqueamento (BAJPAI, 2011; SHARMA et al., 2014; SRIDEVI et al., 2016; WALIA et al., 2017).

De maneira semelhante, na indústria têxtil, as xilanases se mostram uma alternativa ao uso de agentes tóxicos, como o hidróxido de sódio, na remoção dos constituintes não celulósicos presentes nas fibras de algodão. Tal processo, conhecido como “purga”, é aplicado com o objetivo de aumentar e homogeneizar a hidratação das fibras para melhor branqueamento e coloração do tecido (ADRIO; DEMAIN, 2014; BATTAN et al., 2011).

Na alimentação animal, são comumente aplicadas como suplementares da dieta de aves, bovinos e suínos, a fim de auxiliar na digestão do material lignocelulósico ou da ração utilizados na alimentação, favorecendo a absorção dos nutrientes. Resultados da aplicação das xilanases na dieta animal, têm mostrado maiores ganhos de peso, melhoria da qualidade da carne e, também, da eficiência na produção de leite, além da redução no impacto ambiental pela diminuição do volume de chorume produzido, da excreção de nitrogênio, fósforo e outros compostos (AHUJA; FERREIRA; MOREIRA, 2004; BHAT, 2000; GRAMINHA et al., 2008).

Na alimentação humana, são empregadas em processos de clarificação de sucos de frutas, vinhos e cervejas, bem como na melhoria de características reológicas da massa de pães. A hidrólise das xilanas a oligossacarídeos favorece a extração de açucares fermentescíveis dos cereais para a produção de cervejas (NIGAM; ASTHANA; KUMAR et al., 2017), reduz a viscosidade e turbidez de sucos e vinhos, melhorando sua filtrabilidade (BIELY, 1985) e proporciona melhor estabilidade da massa, maior volume, elasticidade e tempo de vida de

prateleira dos pães (NASCIMENTO, 2017). Como componentes da dieta humana, as xilanases encontram aplicações, ainda, como agentes produtores de compostos prebióticos e na forma de suplementos alimentares em complexos enzimáticos, em conjunto com outras enzimas tais como hemicelulases e proteases (POLIZELI et al., 2005).

2.6 Enzimas halofílicas e halotolerantes

A demanda por enzimas estáveis a altas concentrações de sais tem direcionado o foco dos estudos principalmente para os micro-organismos halofílicos. Tais organismos são capazes de crescer em uma ampla faixa de concentração de sais e se mostram uma fonte potencial de enzimas halotolerantes/halofílicas como proteases, amilases, nucleases, lipases, celulases, xilanases, catalases e esterases, as quais são capazes de atuar sob condições salinas, nas quais outras proteínas iriam se desnaturar ou precipitar (GUPTA et al., 2016). Em concentrações elevadas, os íons do sal são capazes de sequestrar as moléculas de água, reduzindo a camada de hidratação na superfície da enzima, causando perturbações nas interações eletrostáticas entre resíduos de aminoácidos carregados adjacentes, resultando em alterações na estrutura e atividade catalítica da proteína (KARAN; CAPES; DASSARMA, 2012). Enzimas halotolerantes, no entanto, são altamente capazes de competir pelas moléculas de água e se manter ativas e estáveis em meios de menor Aw uma vez que, mesmo nessas condições, é possível manter uma distribuição de cargas adequada nos seus sítios ativos, de modo que seja mantida a conformação nativa (ZACCAI, 2004; MORENO et al., 2013).

Diversos micro-organismos, especialmente bactérias, têm sido descritos como bons produtores de xilanases halotolerantes (BAI; XUE; ZHOU, 2012; CARLI, 2016; LIU et al., 2014; VIJAYALAKSHMI; RANJITHA; RAJESWARI, 2013). Embora os mecanismos responsáveis por esse comportamento ainda não tenham sido completamente elucidados (BAI; XUE; ZHOU, 2012), acredita-se que essa capacidade esteja relacionada ao maior conteúdo de resíduos de aminoácidos carregados na superfície das enzimas, especialmente resíduos ácidos como de glutamato e aspartato, os quais possuem alta capacidade de ligação com moléculas de água, resultante da presença de grupos carboxílicos carregados negativamente, que se ligam a cátions hidratados, mantendo a camada de hidratação superficial da proteína. De fato, estudos com enzimas halotolerantes têm demonstrado uma predominância desses aminoácidos na composição da sua molécula, em comparação aos seus respectivos pares mesofílicos (ESCLAPEZ et al., 2007; FUKUCHI et al., 2003; PAUL et al., 2008). Além disso, esse aumento

na quantidade de resíduos ácidos é, geralmente, acompanhado pelo baixo conteúdo em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, característica consistente com o aumento da flexibilidade, da camada de hidratação e da redução na hidrofobicidade superficial das enzimas halofílicas e halotolerantes.

2.7 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica e produção de xilo-oligossacarídeos

A hidrólise enzimática é uma etapa intermediária nos processos de conversão da biomassa, cuja eficácia depende de múltiplos fatores, em especial, da natureza da biomassa e das enzimas utilizadas. No geral, espécies de madeira mole (*softwoods*) são mais recalcitrantes a ação enzimática que espécies de madeira dura (*hardwoods*). Tal característica resulta, principalmente, das variações na composição, na estrutura e nas ligações da lignina aos polissacarídeos. Para madeiras duras, em cuja composição predominam as glucuronoxilanas e xiloglucanas, as xilanases, β-xilosidases e xiloglucanases são as principais hemicelulases envolvidas na degradação da cadeia principal da hemicelulose, enquanto, para madeiras moles, o efeito de manases e β-manosidases é mais relevante, em razão da predominância de galactoglucomananas e glucomananas (ÁLVAREZ; REYES-SOSA; DÍEZ, 2016; MODENBACH; NOKES, 2013; ZHU; PAN, 2010).

O material lignocelulolósico pode ser hidrolisado a açúcares mais simples por vias enzimáticas, com enzimas hemicelulolíticas, ou por vias químicas, com a utilização de ácidos concentrados ou diluídos (POOVAIAH et al., 2014). A hidrólise enzimática, no entanto, tem se mostrado bastante conveniente nesse sentido, em vista de vantagens como a alta especificidade, as condições amenas de reação e a formação de pequenas quantidades de compostos tóxicos indesejáveis (ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015; MODENBACH, NOKES, 2013). O processo de desconstrução da lignocelulose por vias enzimáticas é bastante complexo, haja vista as, também complexas, interações entre os componentes do material lignocelulósico, que os tornam recalcitrantes (POOVAIAH et al., 2014). Com isso, para a completa hidrólise da biomassa, por vias enzimáticas, faz-se necessária a ação sinérgica de diversas enzimas incluindo celulases, hemicelulases, ligninases e outras enzimas acessórias que clivam ligações entre a cadeia principal e grupos pendentes.

Atualmente, estudos de hidrólise enzimática da biomassa têm voltado sua atenção para processos conduzidos com altas cargas de sólidos. Sugere-se, inclusive, que tais processos serão necessários para que a conversão do material lignocelulósico se torne economicamente viável

(MODENBACH; NOKES, 2013). Um processo é considerado como de “alta carga de sólidos” quando a taxa de sólidos/líquidos é tal, que uma pequena, ou inexistente, quantidade de água livre se encontra presente no meio, ou ainda, quando em concentração de sólidos maior que 15% (m/m) (HODGE et al., 2009; KOPPRAN et al., 2014). A hidrólise enzimática com altas cargas de sólidos oferece diversas vantagens em relação aos processos conduzidos em baixa e média cargas, sendo a principal, a possibilidade de recuperação de elevadas concentrações de açúcares. Além disso, outras vantagens como a redução no tamanho dos equipamentos, do consumo de água e dos custos gerais de operação, o tornam um processo extremamente interessante para a indústria (ÁLVAREZ; REYES-SOSA; DÍEZ, 2016; LIU; CHEN, 2016; MODENBACH; NOKES, 2013).

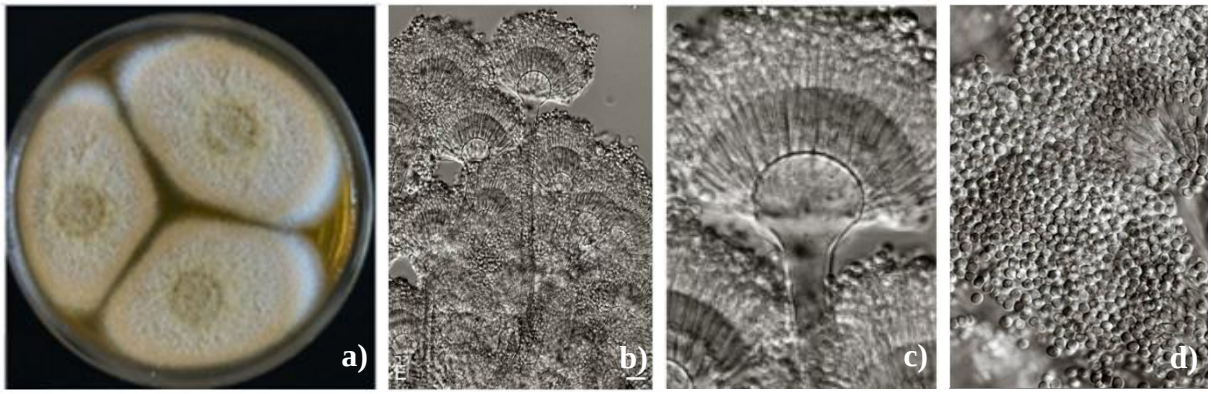
A hidrólise enzimática se apresenta como uma poderosa ferramenta para a extração da hemicelulose presente na biomassa lignocelulósica, convertendo-a em produtos de alto valor econômico, como xilo-oligossacarídeos e xilose, de forma ambientalmente amigável (WONG; SADDLER, 1992). Os xilo-oligossacarídeos (XOS), açúcares formados por cadeias curtas (2 a 7 unidades) de xilose são, naturalmente, presentes em alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Os XOS podem ser produzidos pela hidrólise enzimática, química ou químico-enzimática de materiais ricos em xilanas. A produção de XOS por vias enzimáticas tem ganhado força nas últimas duas décadas em virtude das diversas vantagens relacionadas a utilização de enzimas na conversão da biomassa. No entanto, visto que a complexa interação xilana-lignina do material lignocelulósico é bastante resistente ao ataque enzimático, os atuais processos comerciais de produção de xilo-oligossacarídeos se utilizam, preferencialmente, de uma combinação de métodos químicos e enzimáticos a fim de alcançar maior rendimento final de produtos (BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010; BRIENZO et al., 2016). Geralmente, tais processos são conduzidos em duas etapas sendo (i) extração alcalina utilizando NaOH ou KOH seguida de (ii) hidrólise enzimática por enzimas xilanases, β-xilosidases e/ou glicosintases (BRIENZO et al., 2016; JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015).

A utilização dos xilo-oligossacarídeos é uma realidade em poucos países, apesar de apresentam grande potencial de aplicações, especialmente na indústria farmacêutica, para controle da obesidade, prevenção de cáries, tratamento de infecções gastrointestinais, antioxidantes, imunoestimulantes, agentes ativos contra a osteoporose, otite e disfunções da pele e cabelo; na indústria de alimentos, como alimentos funcionais, prebióticos e aditivos de ração animal; e na agricultura, como estimulantes e aceleradores de crescimento (BRIENZO et al., 2016; MANRICH, 2012; POLIZELI et al., 2005; VÁZQUEZ et al., 2005).

2.8 O gênero *Aspergillus* e a espécie *A. hortai*

O gênero *Aspergillus* inclui um grupo monofilético de fungos filamentosos de grande importância médica e industrial (SAMSON et al., 2014). É representado por cerca de 200 espécies de ocorrência cosmopolita, frequentemente presentes em regiões tropicais e subtropicais, em solos de florestas, desertos, planícies e pilhas de compostagem, sendo conhecido pela produção de micotoxinas contaminantes de produtos agrícolas estocados como milho, cevada e amendoim (SAMSON et al., 2011). Algumas espécies como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus nidulans* são, ainda, conhecidas pela patogenicidade humana e animal, estando envolvidas em doenças conhecidas como aspergiloses, caracterizadas por infecções pulmonares severas. Industrialmente, muitas das espécies de *Aspergillus* são amplamente empregadas na produção de uma variedade de compostos como antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas e até medicamentos (SAMSON et al., 2014). Certas características da colônia desempenham um importante papel na classificação do grupo, dentre elas, as mais comumente utilizadas na caracterização das espécies, incluem a taxa de crescimento, esporulação e textura da colônia, a produção de pigmentos solúveis e a composição dos metabólitos secundários. No geral, as colônias desse gênero de fungo apresentam rápido crescimento, aspecto felpudo e, por vezes, coloração brilhante. Além disso, possuem conidióforos característicos, que terminam em uma vesícula recoberta por fiálides, de onde se originam conídios globulares de coloração bege-amarronzada (**Figura 6**).

Figura 6 - Características morfológicas de *Aspergillus hortai*.



Colônia incubada por 7 dias em meio ágar extrato de malte a 25 °C (**a**), conidióforos e conídios característicos da espécie (**b**, **c** e **d**). Fonte: Samson et al. (2011).

Por quase meio século, a espécie *Aspergillus hortai* foi tratada como sinônimo de *Aspergillus terreus*, isso porque ambas as espécies compartilham grandes semelhanças

morfológicas tais como cabeças conidiais colunares e colônia de tonalidade castanho amarronzada. A espécie *A. hortai* foi descrita pela primeira vez por Langeron (1922), a partir de amostras clínicas coletadas de orelha humana, no Rio de Janeiro, no entanto, devido às semelhanças morfológicas, foi incluída no grupo dos *Aspergillus terreus* por Raper e Fennell (1965). A sua identificação como uma espécie distinta desse grupo se deu após estudos baseados em análises filogenéticas das sequencias dos genes de calmodulina, β-tubulina e região ITS, da macro e micromorfologias do fungo e, principalmente, do seu perfil de metabólitos secundários (SAMSOM et al., 2011). Poucos são os trabalhos encontrados na literatura com *A. hortai*, no entanto, estudos têm demonstrado que a espécie é uma boa produtora de enzimas lignocelulolíticas, especialmente arabinofuranosidases (TERRONE, 2017), carboximetilcelulases (EL-HADI et al., 2014) e xilanases (NASCIMENTO, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais desse trabalho foram a caracterização bioquímica da atividade xilanase presente no filtrado bruto de fermentação sólida realizada por *Aspergillus hortai*, a purificação, a caracterização da enzima purificada e a sua aplicação na hidrólise de subprodutos da agroindústria do milho.

3.2 Objetivos específicos

a) Caracterizar bioquimicamente a atividade xilanase presente no filtrado bruto, na ausência e na presença de NaCl.

b) Purificar a principal endoxilanase produzida pelo fungo *Aspergillus hortai*.

c) Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada, na ausência e na presença de NaCl e determinar sua massa molecular, dos produtos de hidrólise e dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$.

d) Caracterizar os subprodutos: sabugo, palha e folha de milho na forma *in natura*; extrair e caracterizar as hemiceluloses extraídas dessas biomassas.

e) Aplicar a enzima bruta e purificada na hidrólise dos subprodutos da agroindústria do milho *in natura* bem como da hemicelulose extraída dos mesmos e a quantificação dos XOS produzidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção do fungo *Aspergillus hortai*

A linhagem de *Aspergillus hortai* utilizada neste trabalho está depositada na Central de Recursos Microbianos da UNESP Rio Claro (CRM-UNESP) sob o código CRM1919. O fungo foi cultivado em tubos inclinados contendo meio sólido de Vogel (1956), suplementado com farelo de trigo (1,5% m/v) e ágar (1,5% m/v) e mantido a 40 °C em incubadora tipo BOD por 7 dias. Após este período, os conídios foram suspendidos em água destilada estéril e sua concentração foi ajustada para $5x10^6$ conídios/mL com o auxílio de câmara de Neubauer sendo, esta suspensão, utilizada como inóculo no cultivo do fungo para a produção da enzima. Para obtenção do filtrado enzimático bruto, 1,0 mL da suspensão de conídios foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250,0 mL contendo 5,0 g de sabugo de milho umidificado com 19,0 mL de meio de Vogel 2,0% (v/v) pH 5,0. A fermentação em estado sólido foi realizada em câmara BOD durante 4 dias a 31 ºC.

4.2 Extração da enzima bruta

Após o período de incubação, adicionou-se 50,0 mL água destilada em cada frasco seguida de agitação em shaker a 4 °C, 120 rpm por 30 minutos. As culturas foram, então, filtradas a vácuo em funil de Büchner obtendo-se, assim, um filtrado livre de células e micélio, que foi congelado e utilizado como fonte de proteínas e enzimas extracelulares.

4.3 Ensaio enzimático e determinação proteínas totais

4.3.1 Determinação da atividade xilanase

A atividade xilanase foi determinada por meio da liberação de açúcares redutores conforme método descrito por Bailey et al. (1992) modificado. Os açúcares redutores liberados durante a reação enzimática foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), proposto por Miller (1959). Para tanto, a solução enzimática foi incubada com 750,0 µL de uma suspensão de xilana de *birchwood* 1,0% (m/v) em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5. Os tubos reacionais foram mantidos em banho-maria a 55 °C e, em intervalos de tempo de 0, 5

e 10 minutos, alíquotas de 250,0 μL foram retiradas e adicionadas a 250,0 μL de ADNS, a fim de paralisar a reação. Em seguida, os tubos reacionais foram colocados em banho em ebulição por 5 minutos e, resfriados com a adição de 2,5 mL de água destilada. As absorbâncias foram lidas a 540 nm e convertidas em concentração de xilose por meio de curva padrão de xilose (0,0 a 1,0 mg/mL). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μmol de xilose por minuto nas condições de ensaio. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3.2 Determinação da atividade β-xilosidase

A atividade β-xilosidase foi determinada incubando-se a enzima em uma suspensão de p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (ρNPX) 0,25% (m/v) em tampão McIlvaine pH 5,0 a 50 °C. Em intervalos de tempos adequados, alíquotas de 100,0 uL foram retiradas e a reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. O ρ-nitrofenol liberado foi determinado por leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μmol de produto por minuto nas condições de ensaio (KERSTERS-HILDERSON et al., 1985). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3.3 Determinação da atividade de celulase: exo e endoglucanase

A atividade celulase foi determinada utilizando AVICEL (exoglucanase) e CMC (endoglucanase) como substratos segundo Ghose (1987) e Miller (1959) com modificações. Para tanto, a enzima foi incubada em tampão McIlvaine pH 5,0 adicionado de 50,0 mg do respectivo substrato a 50 °C. Em intervalos de 30 e 60 minutos, alíquotas foram retiradas e adicionadas a tubos de centrífuga contendo 1,0 mL de ADNS. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x *g* por 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido, levado para banho fervente por 5 minutos e resfriado com 10,0 mL de água destilada. As absorbâncias foram lidas a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μmol de glicose por minuto nas condições de ensaio. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

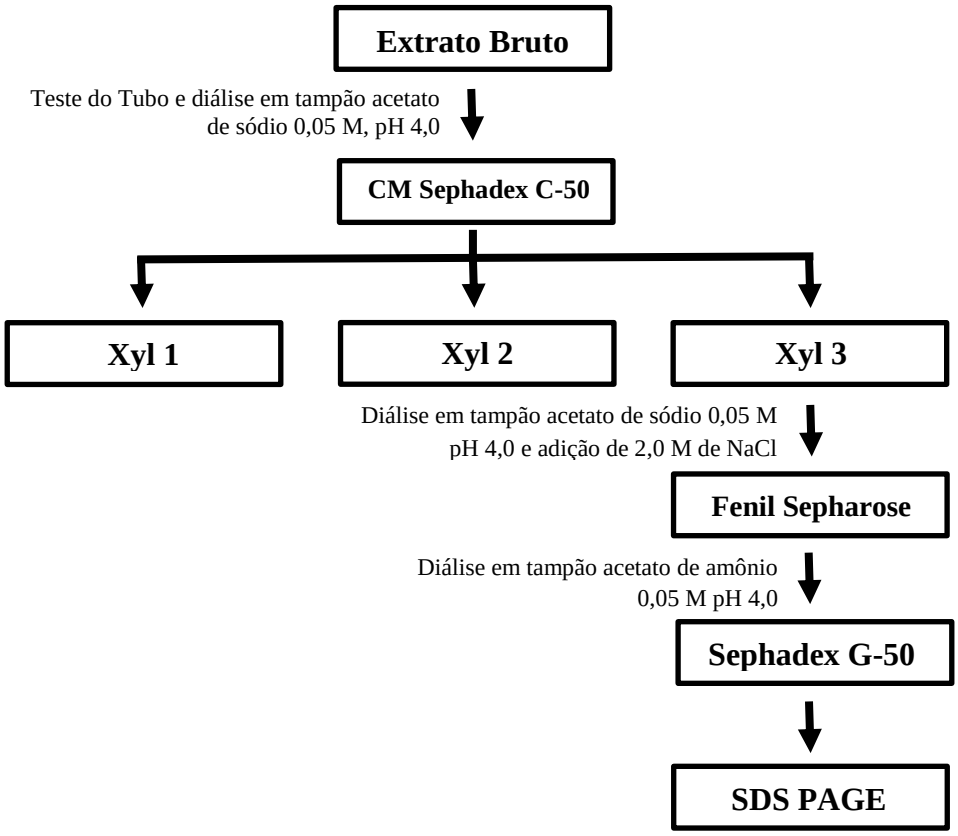
4.3.4 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951) como segue: em tubos de ensaio, foram adicionadas alíquotas de 100,0 e 200,0 µl de solução enzimática, completando-se os volumes para 500,0 µl com água destilada. Adicionou-se a esses tubos, 2,5 mL de solução A de composição: Na_2CO_3 2,0% em NaOH 0,1 N (100,0 mL), $CuSO_4$ 1,0% (1,0 mL) e tartarato de sódio e potássio 1,0% (1,0 mL). Após 15 minutos de reação, adicionou-se 250,0 µl do reagente de Folin, diluído na proporção de 1:1 (m/v) e, após 30 minutos de reação, foram realizadas as leituras das absorbâncias a 660 nm utilizando-se solução de soroalbumina bovina (1,0 mg/mL) como padrão.

4.4 Purificação da principal xilanase extracelular de *A. hortai* cultivado por FES

A principal xilanase presente no filtrado bruto de *A. hortai* foi purificada em três etapas cromatográficas. Os procedimentos aplicados estão apresentados na **Figura 7**.

Figura 7 - Fluxograma das etapas de purificação da principal xilanase de *A. hortai* produzida por FES.



Em resumo, realizou-se a diálise do filtrado bruto e a sua aplicação na cromatografia de troca iônica; após reunidas as frações correspondentes ao pico principal de atividade (pico Xyl 3), prosseguiu-se para a cromatografia de interação hidrofóbica e, para a cromatografia de exclusão molecular. Por fim, a partir de uma alíquota da amostra proveniente dessa última etapa, foi realizada a eletroforese em condição desnaturante para a confirmação da pureza da amostra.

4.4.1 Cromatografia de troca iônica

O filtrado enzimático bruto foi dialisado em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0 e aplicado em coluna catiônica (2,8 x 19,0 cm) CM Sephadex C-50 (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo da troca iônica foi ajustado para 60,0 mL/h, com frações sendo coletadas a cada 3,0 mL. A eluição foi realizada com gradiente de NaCl de 0,0 a 1,0 M. As proteínas presentes nas frações coletadas foram detectadas por leitura de absorbância a 280 nm e a atividade xilanase foi determinada nas frações eluídas. As frações correspondentes ao pico de atividade foram, então, reunidas e submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica.

4.4.2 Cromatografia de interação hidrofóbica

A amostra proveniente da troca iônica foi aplicada em coluna de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose (Hiprep^{TM} 16/10 low sub, *GE Healthcare*) equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0, adicionado de 2,0 M de NaCl. O fluxo da coluna foi ajustado para 2 mL/min com frações de 3,0 mL sendo coletadas em cada tubo. A eluição foi realizada com gradiente de NaCl de 2,0 a 0,0 M. As proteínas presentes nas frações coletadas foram detectadas por leitura de absorbância a 280 nm e a atividade xilanase foi determinada nas frações eluídas. As frações correspondentes ao pico de atividade foram, então, reunidas e submetidas à cromatografia de exclusão molecular.

4.4.3 Cromatografia de exclusão molecular

Para a cromatografia de exclusão molecular, a amostra proveniente da interação hidrofóbica foi dializada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 4,0, liofilizada até um

volume aproximado de 4 mL e aplicada em coluna (2,8 x 60,0 cm) Sephadex G-50 (*Pharmacia*, Uppsala, *Sweden*) equilibrada e eluída com o mesmo tampão a um fluxo de 19,0 mL/h com frações de 3,0 mL sendo coletadas em cada tubo. As frações eluídas foram submetidas à detecção de proteínas em espectrofotômetro a 280 nm e à determinação de atividade xilanase, sendo reunidas aquelas correspondentes ao pico de atividade. Para a determinação da massa molecular aparente da enzima, a coluna foi calibrada com proteínas padrão (Gel Filtration Calibration Kit, *GE Healthcare*), utilizando dextrana azul para a determinação do volume morto. A massa foi estimada a partir de curva de regressão (R^2= 0,98) obtida pela correlação entre o logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão e a razão entre o volume de eluição da enzima e o volume morto da coluna. As frações correspondentes ao pico de atividade foram reunidas e uma alíquota foi utilizada para a SDS-PAGE.

4.4.4 Eletroforese em condição desnaturante

A determinação do grau de pureza e da massa molecular da enzima purificada, após as etapas cromatográficas, foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (18,0% m/v) em condição desnaturante (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970). Para tanto, uma alíquota de 100 µl da amostra proveniente da cromatografia de exclusão molecular foi liofilizada, suspendida em 30,0 µL de tampão de amostra (glicerol 17,5% (v/v), SDS 4,0% (m/v), azul de bromofenol 0,1% (m/v) e Tris-HCl 0,025 mol/L, pH 6,8), na presença de β-mercaptoetanol 10,0% (m/v), e fervida por 5 min. Após a corrida, prosseguiu-se à coloração das proteínas com solução *coomassie brilliant blue* R-250 0,1% (m/v) dissolvido em etanol:ácido acético:água (3:1:6 v/v/v) por um período de 4 horas e posterior descoloração do gel com a mesma solução sem o corante, por 12 horas. A massa molecular da enzima foi estimada usando kit de proteínas padrão (Kit SDS-PAGE Low Molecular Weight, Amersham Biosciences) contendo fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa).

4.5 Caracterização da xilanase bruta e purificada de *A. hortai* cultivado em FES

4.5.1 Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade xilanase bruta e purificada e estabilidade na presença do sal

O efeito da concentração de sal na atividade da enzima foi avaliado por meio da determinação da atividade enzimática na presença de NaCl nos tubos reacionais em concentrações finais de 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, e 4,0 M. Os resultados dos ensaios foram submetidos a análise de variância e as médias de atividade enzimática para cada ensaio foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A estabilidade da xilanase na presença do sal foi determinada incubando-se a enzima, em uma proporção de 1:2 (v/v), a 4 ºC por 24 horas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 adicionado de NaCl em concentrações finais de 0,05, 0,5, 1,0, 2,5 e 4,0 M. A atividade enzimática residual foi determinada para cada ensaio conforme item **4.3.1**.

4.5.2 Efeito do pH sobre a atividade xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl

O pH ótimo de reação foi verificado por meio da determinação da atividade enzimática em tampão McIlvaine na faixa de pH de 3,0 a 8,0 em intervalos de 0,5 unidades a 55 °C na ausência e na presença de NaCl 0,5 e 2,5 M.

4.5.3 Estabilidade da xilanase bruta e purificada ao pH na presença e ausência de NaCl

Para avaliação da estabilidade da xilanase ao pH, a enzima foi incubada em tampão McIlvaine na proporção de 1:2 (v/v) em uma faixa de pH de 3,0 a 8,0 em intervalos de 0,5 unidades a 4 °C por 24 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi determinada conforme **item 4.3.1**. A estabilidade ao pH na presença de NaCl foi determinada nas mesmas condições em presença de 0,5 e 2,5 M do sal no meio reacional.

4.5.4 Efeito da temperatura sobre a atividade xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl

A temperatura ótima de reação foi determinada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5, em uma faixa de temperatura de 20 a 80 °C em intervalos de 5 °C. O efeito do NaCl sobre a temperatura ótima foi determinado nas mesmas condições, na presença de 0,5 e 2,5 M de NaCl no meio reacional.

4.5.5 Estabilidade térmica da xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl

Para a determinação da estabilidade térmica, a enzima foi incubada, na ausência de substrato, em temperaturas de 40 a 70 ºC, em intervalos de 10 ºC, com retirada de alíquotas em intervalos de tempo variados (1 a 240 minutos). Assim que coletadas, as alíquotas foram levadas para banho de gelo e a atividade enzimática foi prontamente determinada em tampão imidazol 0,05 M, pH 6,5 a 55 ºC. A avaliação do efeito do NaCl sobre a estabilidade da enzima foi realizada nas mesmas condições, em presença de 0,5 e 2,5 M do sal no meio reacional.

4.5.6 Efeito de íons metálicos e compostos químicos sobre a atividade xilanase bruta e purificada

O efeito de íons metálicos e algumas substâncias sobre a atividade xilanase bruta e purificada foi avaliado incubando-se a enzima em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0, na presença dos íons Cu^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, e NH_4^+ e na presença de $(NH_4)_2SO_4$, acetato de amônio, acetato de chumbo, glicerol, sulfato de amônio, SDS (dodecil sulfato de sódio), Triton X-100, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), DTT (1,4-ditio-D-treitol) e β-mercaptoetanol, nas concentrações de 2,0 e 10,0 mM. As atividades residuais foram expressas como a porcentagem de atividade xilanase em relação ao ensaio controle, na ausência das substâncias.

4.5.7 Especificidade da xilanase bruta e purificada pelo substrato

A especificidade da xilanase a diferentes substratos foi avaliada usando xilana *oat spelt*, xilana de *birchwood*, xilana de *beechwood*, ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (ρNPX), carboximetilcelulose (CMC) e avicel, na concentração de 1,0% (m/v). As atividades foram realizadas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 55 °C e avaliadas por meio da quantificação de açúcares redutores liberados, conforme **Itens 4.3.1**, **4.3.2** e **4.3.3**, utilizando curvas padrão de xilose (1,0 mg/mL) para as xilanas, de ρ-nitrofenol (0,1 mg/mL) para ρNPX e de glicose (1,0 mg/mL) para a CMC e Avicel. Os resultados dos ensaios foram submetidos a análise de variância e as médias de atividade enzimática referentes a cada substrato foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5.8 Produtos de hidrólise da xilana oat spelt pela Xyl 3 purificada

Os produtos solúveis da hidrólise enzimática da xilana foram verificados por cromatografia em camada delgada como descrito por Fontana et al. (1988). Para tanto, 250,0 µL da enzima purificada foram incubados com solução de xilana *oat spelt* comercial 1,0% (m/v) em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 50 °C. Em períodos de tempo pré-determinados, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas dessa solução, fervidas por 2 minutos, transferidas para banho de gelo pelo mesmo tempo, centrifugadas por 15 minutos a 10000 rpm e armazenadas em geladeira. A cromatografia foi realizada em placas de sílica gel 60G (Merck) utilizando glicose, xilose e xilobiose (1,0 mg/mL) como padrões e uma solução de acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água destilada (9:3:1:4 v/v/v/v) como fase móvel. As bandas foram reveladas com a vaporização de solução de orcinol 0,2% (m/v) em ácido sulfúrico/metanol (1:9 v/v) seguida de incubação em estufa a 90,0 ºC por 5 min.

4.5.9 Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$

As constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$ da xilanase purificada foram determinadas conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver-Burk (1934). Para tanto, a atividade enzimática foi determinada na presença de xilana *birchwood* em concentrações crescentes de 1,0 a 20,0 mg/mL. Os parâmetros cinéticos foram obtidos por meio de regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software Inc., La jolla, CA, USA).

4.6 Caracterização dos subprodutos sabugo, palha e folha de milho

4.6.1 Determinação da composição química dos subprodutos in natura

Os três subprodutos da agroindústria do milho - sabugo, palha e folha - foram caracterizados quanto a composição em carboidratos, lignina e teor de extrativos. O teor de extrativos foi determinado por meio de lavagens de 1,0 g dos substratos com etanol (96%) por 8 h, seguidas de lavagens com 200 mL de água ultrapura por mais 24 horas, em aparelho soxlet. O teor de extrativos em cada amostra foi determinado pela diferença de massas antes e depois das lavagens. A composição de carboidratos e lignina foi determinada pelo método de Klasson, segundo normas constantes no protocolo do National Renewable Energy Laboratory (SLUITER et al., 2012). Para tanto, 0,3 g das amostras livres de extrativos foram previamente tratados com 3,0 mL de ácido sulfúrico 72% a 30 °C por 1 h, em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 84,0 mL de água destilada. Essa mistura foi, então, autoclavada por 1 h a 121 °C e filtrada em cadinhos de placa porosa de vidro sinterizado nº 4, previamente tarados. Para a determinação da massa de lignina insolúvel, o resíduo sólido dos cadinhos foi lavado com água destilada, seco em estufa a 105 °C até atingir massa constante. A fração líquida do filtrado foi utilizada para a determinação do teor de lignina solúvel, por leitura em espectrofotômetro a 215 e 280 nm e, para a determinação dos teores de carboidratos por HPLC.

4.6.2 Extração de hemicelulose dos subprodutos

O processo de extração da xilana foi realizado conforme método otimizado descrito por Brienzo, Siqueira e Milagres (2009), modificado: Para tanto, inicialmente, as amostras dos resíduos foram trituradas em moinho de facas, selecionadas em peneira de abertura 0,074 mm (20 mesh) e tratadas com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,2% (m/v) durante 1 h a 90 °C para remoção de metais. Desse material, 10,0 g foram coletados e adicionados a 200,0 mL de peróxido de hidrogênio (6%) em frascos tipo Boeco de 1,0 L, o pH da solução foi ajustado para 11,6 e os frascos foram mantidos sob agitação de 100 rpm durante 24 h. Após esse período, o resíduo insolúvel foi separado por filtração em papel de filtro, a fração sobrenadante teve seu pH ajustado para 6,0 e foi concentrada a aproximadamente 1/3 de seu volume original em estufa a 70 °C. À essa solução concentrada foi adicionado etanol 96%, para a precipitação da hemicelulose. Na sequência, quatro etapas de lavagem com etanol 70%

foram realizadas. Por fim, a hemicelulose decantada foi seca em estufa a 40 °C e armazenada para posteriores análises.

4.6.3 Determinação da composição química das hemiceluloses extraídas dos subprodutos

A caracterização química da xilana extraída dos subprodutos (sabugo, palha e folha de milho) quanto aos teores em carboidratos e lignina foi realizada conforme método descrito por BRIENZO et al., 2009: 0,3 g das amostras livres de extrativos foram, primeiramente, tratados com 3,0 mL de ácido sulfúrico 72,0% a 45 °C por 7 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 84,0 mL de água destilada e, a mistura, autoclavada por 30 min a 121 °C e filtrada em cadinhos de vidro de placa porosa, previamente tarados. Para a determinação das massas de lignina solúvel e insolúvel, bem como do teor de carboidratos presentes na amostra, seguiu-se o procedimento descrito no **Item 4.6.1**, sem modificações.

4.7 Hidrólise enzimática dos subprodutos

Os ensaios de hidrólise enzimática dos subprodutos *in natura*, bem como das hemiceluloses extraídas dessas biomassas, foram conduzidos em tubos de ensaio de 25,0 mL, contendo 0,1 g de substrato diluído em de tampão imidazol 0,05 M, pH 6,5, sob agitação de 120 rpm, a 55 °C. Para hidrólise dos materiais, foi aplicada atividade endoxilanase (30,0 U/g) e a reação foi conduzida em diferentes tempos (2 a 24 h). As alíquotas, após serem retiradas nos tempos determinados, foram fervidas por 5 minutos e resfriadas à temperatura ambiente.

4.7.1 Análise da produção de XOS por ADNS

A análise da produção de XOS pelo método do ADNS foi realizada determinando-se a atividade enzimática do hidrolisado conforme descrito no **Item 4.3.1** utilizando curva de calibração de xilose (0,0 a 1,0 mg/mL).

4.7.2 Análise da produção de XOS por CLAE

Para a análise e elaboração da curva de calibração dos XOS foram pesados aproximadamente 1,0 mg dos padrões: xilose (X_1 – Sigma), xilobiose (X_2), xilotriose (X_3), xilotetraose (X_4), xilopentose (X_5) e xilohexose (X_6) (Megazyme-Irlanda) e transferidos para um balão volumétrico de 5 mL separadamente, resultando em uma solução pura de 0,2 g/L para cada padrão em estudo. Essa solução foi analisada por cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE-SHIMADZU, modelo NEXERA XR), nas seguintes condições: coluna BIORAD Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm); temperatura: 80 °C; eluente: água Mili-Q, com fluxo 0,6 mL/min; volume de amostra: 20 µl; detector : índice de refração a 60 °C (Shimadzu, modelo RID 20-A) com um tempo de análise de 19 min.

A curva de calibração dos XOS foi determinada através do preparado de soluções com os padrões de grau analítico citados acima, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo. Para a realização da cura de calibração foi realizada uma solução mista dos padrões citados acima, onde 4 mg de cada padrão foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 5 mL, resultando na solução mão mista de 0,8 g/L. Diluições sucessivas foram realizadas com a solução mãe mista gerando as seguintes concentrações para cada padrão em estudo: 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 g/L. As diferentes concentrações das soluções mistas foram analisadas por CLAE nas mesmas condições citadas acima.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

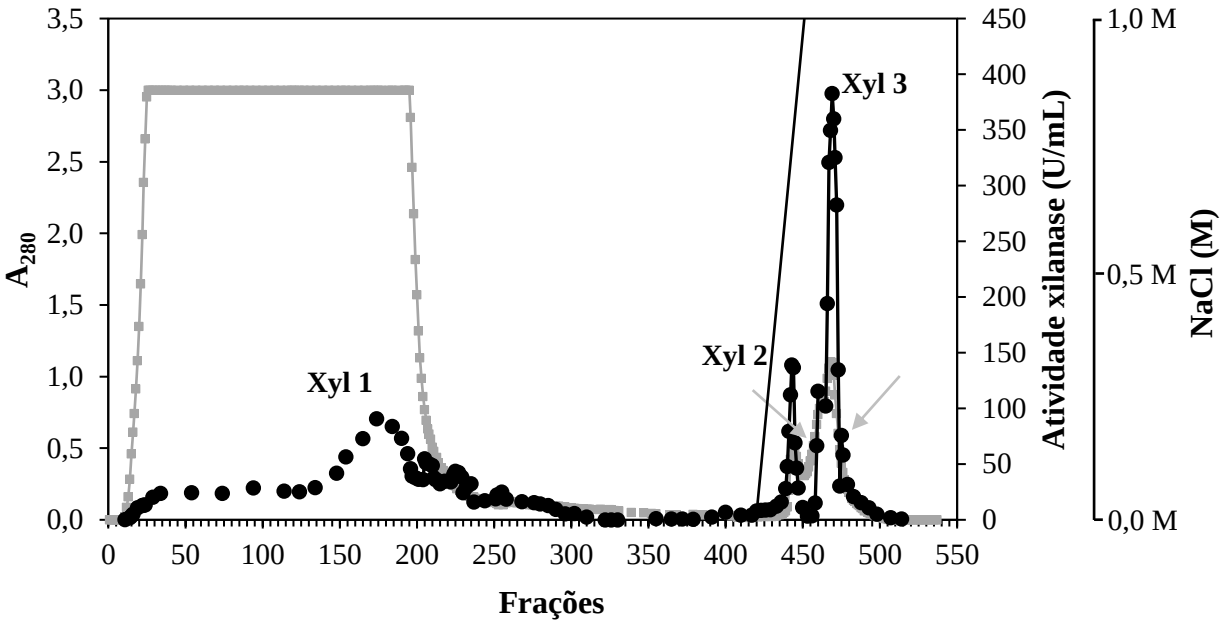
5.1 Purificação da principal xilanase extracelular de *A. hortai* cultivado por FES

Pelo perfil cromatográfico evidencia-se a presença de três picos de atividade identificados como Xyl 1, correspondente a fração não retida; Xyl 2, correspondente ao pico eluído em 0,3 M de NaCl, e Xyl 3, correspondente ao pico eluído em 1,0 M do sal (**Figura 8**). As frações correspondentes a principal xilanase (Xyl 3) foram reunidas e, subsequentemente, aplicadas em coluna de interação hidrofóbica. Ao final desta etapa, Xyl 3 apresentou recuperação de 19,9% e fator de recuperação de 2,6 vezes (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Etapas de purificação da principal xilanase do filtrado bruto de *A. hortai* em fermentação sólida.

	Atividade total (U)	**Proteína total (mg)**	**Atividade específica (U/mg)**	**Recuperação (%)**	**Fator de purificação**
Filtrado Bruto	12874,30	266,67	48,28	100,0	1,0
CM Sephadex C-50	2562,00	20,44	125,34	19,9	2,6
Fenil Sepharose	1730,17	9,98	173,29	13,4	3,5
Sephadex G-50	145,49	0,19	597,88	1,1	12,3

Figura 8 - Perfil cromatográfico da xilanase bruta de *A. hortai* em coluna CM Sephadex C-50.

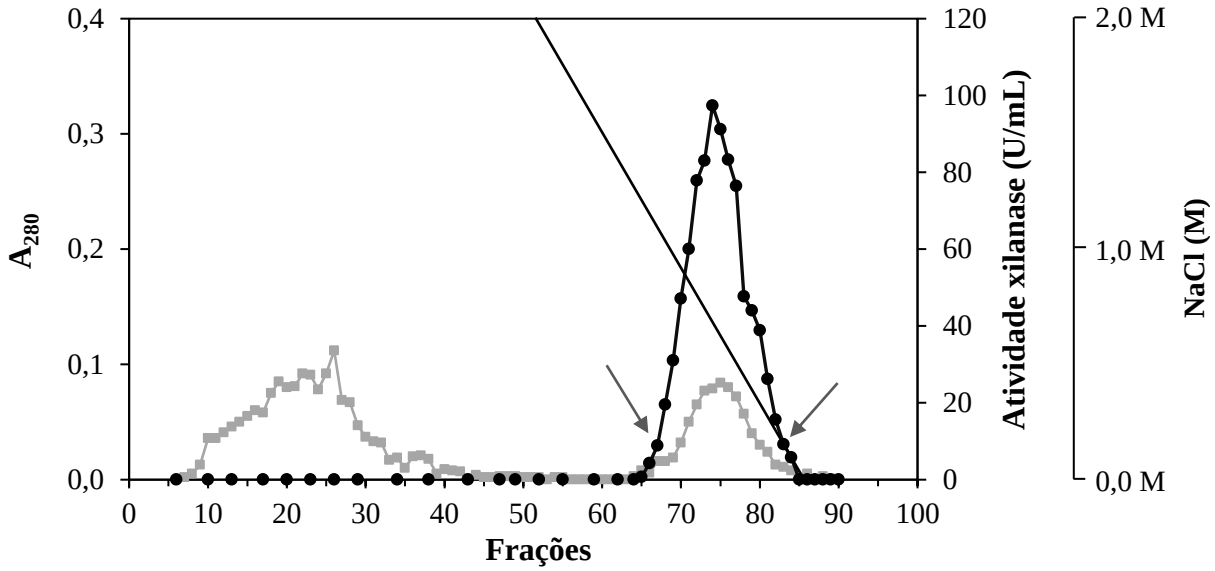


Coluna equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0. Eluição das frações retidas com gradiente salino (1,0-0,0 M), no mesmo tampão. A_{280} (■), atividade xilanase (●), gradiente salino (—). Setas indicam as frações reunidas.

Um perfil cromatográfico semelhante foi observado por Nascimento (2017). Nesse estudo, a mesma linhagem de *A hortai* utilizada no presente trabalho foi empregada na produção de xilanases, em cultivo submerso, com sabugo de milho como fonte de carbono. Como primeira etapa da purificação das enzimas foi utilizada uma cromatografia de troca iônica cujo perfil foi bastante similar ao obtido em nosso trabalho. Dessa forma, todos os resultados da caracterização por nós obtidos, serão comparados aos do trabalho de Nascimento (2017) a fim de demonstrar as diferenças e similaridades entre as enzimas.

A fração reunida, correspondente ao pico Xyl 3, foi aplicada em coluna de interação hidrofóbica Fenill Sepharose. O perfil cromatográfico evidencia a presença de apenas um pico de atividade xilanase eluído em 0,5 M de NaCl, correspondente a um pico de proteínas. Ao final dessa segunda etapa, a enzima foi purificada 3,6 vezes com rendimento de 13,4%.

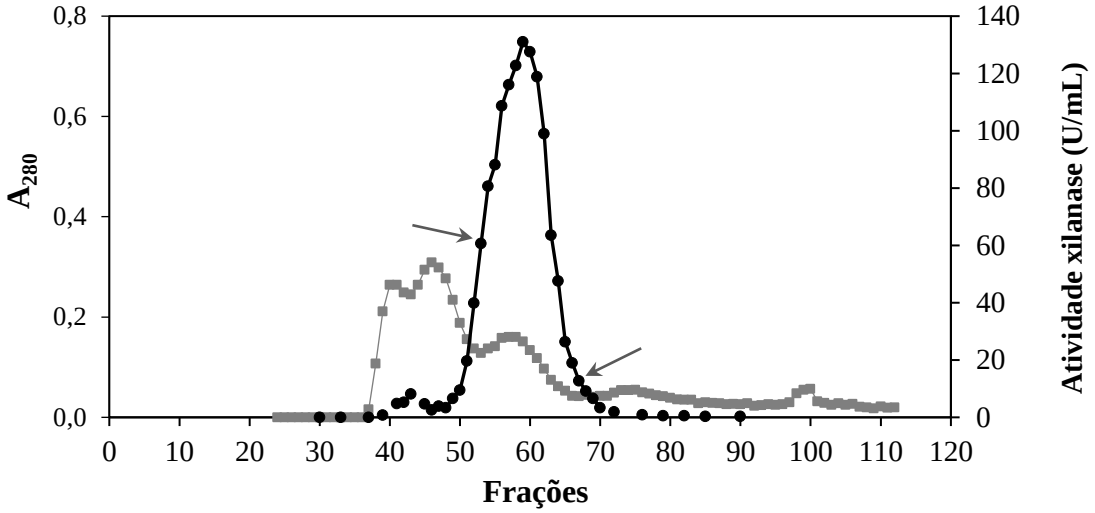
Figura 9 - Perfil cromatográfico de Xyl 3 em coluna Fenil Sepharose.



Coluna equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0 adicionado de 2,0 M de NaCl. A_{280} (■), atividade xilanase (●), gradiente salino de eluição (—). Setas indicam as frações reunidas.

Na terceira etapa de purificação, a Xyl 3 proveniente da interação hidrofóbica foi aplicada em coluna de exclusão molecular de Sephadex G-50 (**Figura 10**). O perfil cromatográfico, novamente, evidencia a presença de apenas um pico de atividade xilanase. A massa molecular da enzima, após calibração da coluna com os padrões, foi estimada em 14,8 kDa. Ao final dessa última etapa cromatográfica, a xilanase apresentou um fator de purificação final de 12,4 vezes com recuperação de 1,1%. A baixa recuperação pode ser explicada, em parte, em razão dos cálculos de recuperação serem realizados em função da atividade enzimática no filtrado bruto, o qual possuía pelo menos mais duas xilanases, que contribuíram com a elevada atividade total do filtrado a qual, portanto, não corresponde apenas a atividade da Xyl 3.

Figura 10 - Perfil cromatográfico de Xyl 3 em coluna Sephadex G-50.

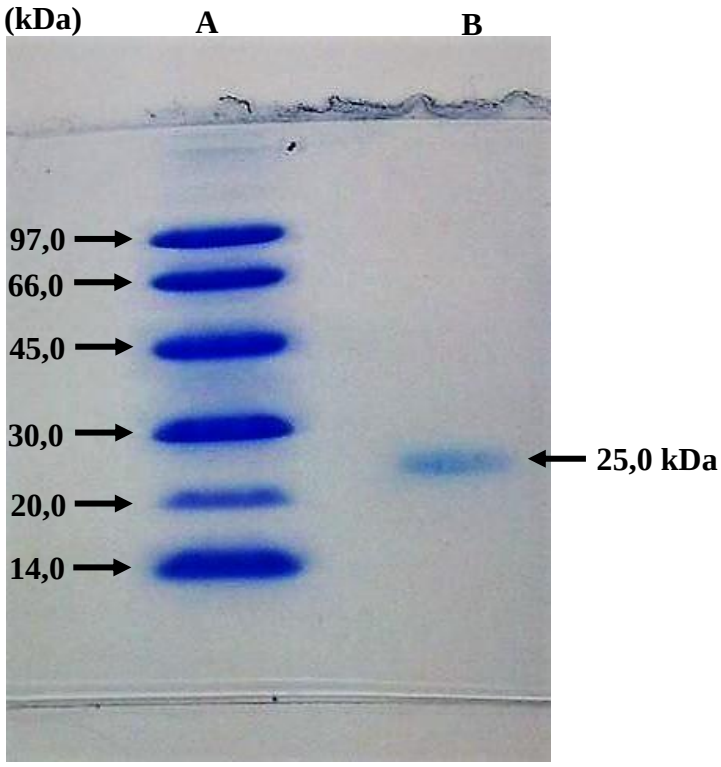


Resina Sephadex G-50 equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 4,0. A_{280} (■), atividade xilanase (●). Setas indicam as frações reunidas. Padrões de calibração: anidrase carbônica (29,0 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

5.1.1 Eletroforese em condição desnaturante

A purificação da amostra, após as etapas cromatográficas, foi confirmada pela presença de apenas uma banda na SDS PAGE, cuja massa molecular foi estimada em 25 kDa, com base em sua mobilidade aparente no gel (**Figura 11**). De acordo com os resultados obtidos por meio da eletroforese e da filtração em gel, sugere-se que a massa molecular aparente da xilanase em estudo seja entre 14,8 e 25,0 kDa. Essa diferença entre as massas moleculares pode sugerir certo grau de glicosilação da enzima, uma vez que enzimas glicosiladas podem apresentar alguma interação com a resina da filtração em gel, atrasando a sua eluição e, consequentemente, induzindo a uma subestimação do valor da sua massa molecular aparente. Além disso, deve-se levar em conta que o formato da molécula também pode influenciar na sua eluição. Enzimas comerciais possuem, geralmente, formato globular, enquanto enzimas nativas são mais alongadas; essa diferença nos formatos e, portanto, nos raios hidrodinâmicos entre as enzimas resultam em diferentes interações com a resina da coluna e, consequentemente, em massas moleculares inacuradas (GE HEALTHCARE).

Figura 11 - Perfil em eletroforético da Xyl 3 purificada de *A. hortai* cultivado em meio sólido.



PAGE-SDS em gel de poliacrilamida 18,0%. (**A**) Padrões de peso molecular: fosforilase b (97,0 kDa), albumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,0 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa), (**B**) amostra proveniente da cromatografia de exclusão molecular.

Como mostrado na **Tabela 2**, as xilanases apresentam uma ampla variabilidade em relação às suas massas moleculares. Além das citadas na tabela, pode-se encontrar, ainda, na literatura, relatos de xilanases com massas menores que 20 kDa até maiores que 200 kDa (SHAO; DEBLOIS; WIEGEL, 1995; WONG; TAN; SADDLER, 1988). A Xyl III purificada no trabalho de Nascimento (2017) apresentou massa molecular de 29 kDa por SDS-PAGE, valor próximo daquele determinado para Xyl 3, porém, pela exclusão molecular, a massa da Xyl III foi determinada em 28 kDa, valor duas vezes maior que o determinado para a Xyl 3.

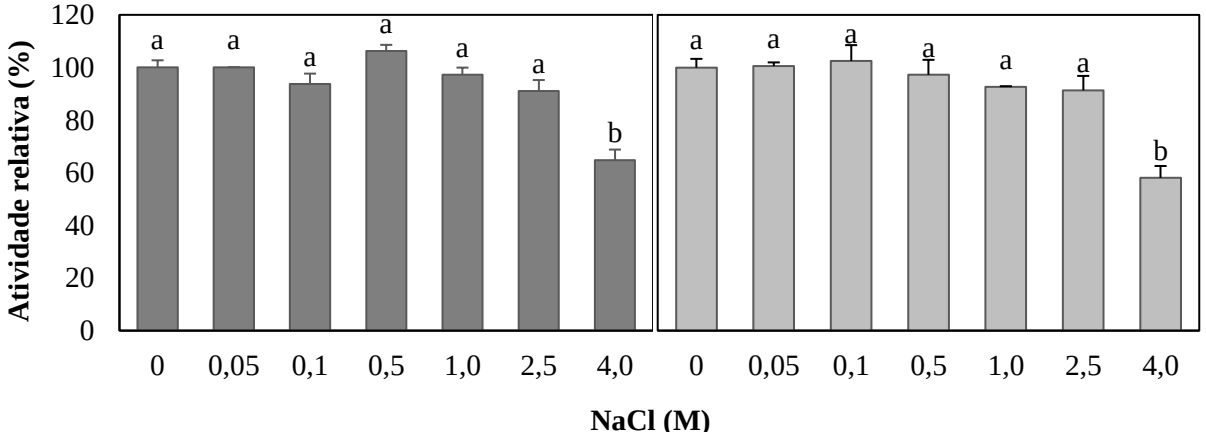
5.2 Caracterização da xilanase bruta e purificada de *A. hortai* cultivado em FES

5.2.1 Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade xilanase bruta e purificada e estabilidade na presença do sal

Considerando que o fungo utilizado neste trabalho foi isolado de ambiente salino e, tendo como base, o trabalho de Nascimento (2017), no qual foram purificadas duas xilanases halotolerantes e uma halofílica, decidiu-se por avaliar, ao longo desse trabalho, os efeitos do NaCl, sobre a atividade e estabilidade da xilanase bruta e da enzima purificada (**Figura 12**).

No geral, os perfis de atividade para a enzima bruta e purificada foram similares. Não foram observadas variações significativas de atividade na ausência e na presença de NaCl até 2,5 M no meio reacional, de forma que a enzima foi capaz de manter mais de 90,0% da atividade controle (ausência de sal) nesses casos. Com o aumento da concentração salina para 4 M, observou-se uma queda de cerca de 40% na atividade, em relação ao controle. De qualquer forma, esse, ainda sim, é um comportamento bastante interessante, tendo em vista uma condição salina extrema.

Figura 12 - Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade xilanase. Enzima bruta (■) e purificada (■) de *A hortai*.



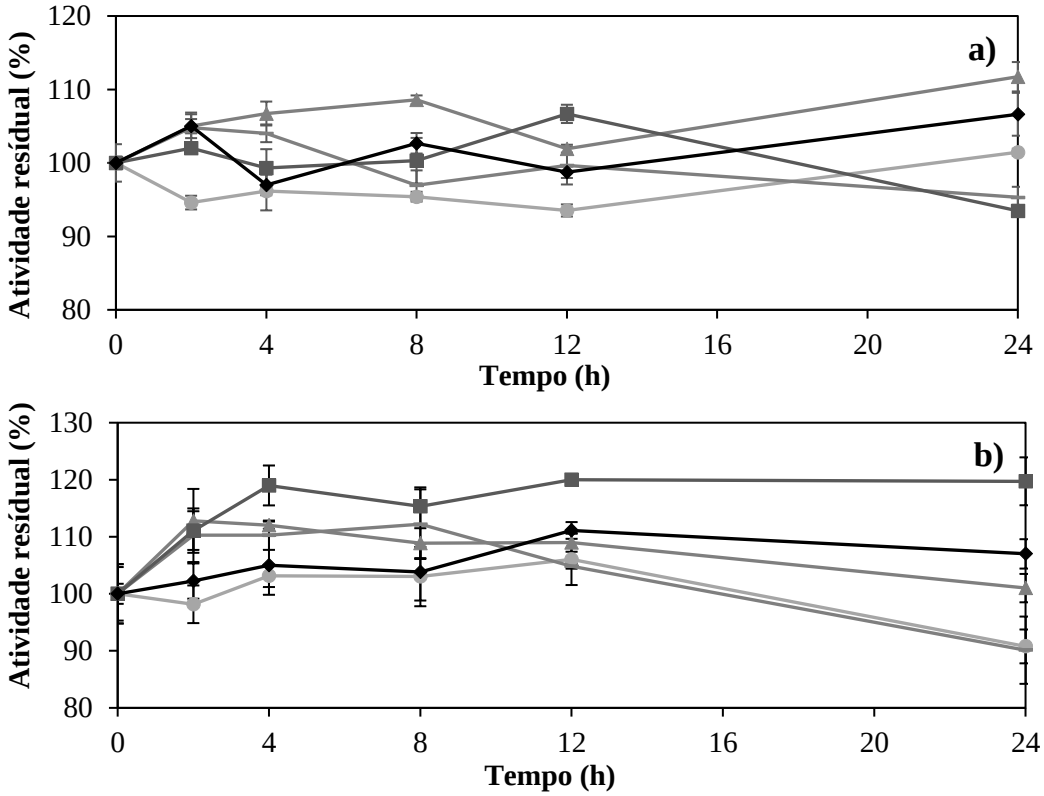
Atividades relativas da enzima determinadas a 55 °C em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5. Os controles (atividades na ausência de NaCl) correspondem a 28,04 U/mg para a enzima bruta e a 554,76 U/mg para a enzima purificada. Letras iguais representam médias de atividade não estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5,0% de significância.

No trabalho de Nascimento (2017) a xilanase purificada, Xyl III, foi capaz de manter atividades relativas entre 58,0% e 85,0% na presença de 0,5 a 2,0 M de NaCl, diferente do observado para a Xyl 3 a qual manteve acima de 90,0% da atividade controle nas mesmas

condições. Também, no trabalho de Carli (2016), uma xilanase halotolerante purificada do filtrado de *Colletotrichum graminicola* manteve cerca de 85,0% da atividade controle na presença de 0,5 M de NaCl, a qual foi gradativamente reduzida com o aumento da concentração do sal, chegando a 50,0% em 3,0 M.

Os perfis de estabilidade da enzima às diferentes concentrações de NaCl são mostrados na **Figura 13**. A enzima bruta e purificada se mostrou, nesse caso, halotolerante, sendo capaz de manter mais de 90,0% da atividade controle em todas as concentrações de sal avaliadas. É interessante observar, no entanto, que na presença de 0,5 M de NaCl, a enzima bruta foi estimulada e apresentou atividade superior a 100,0% em relação ao controle durante todo o período de incubação, caracterizando um comportamento halofílico. Este comportamento, associado às altas taxas de atividade na presença do sal representa um potencial com vistas a aplicação da enzima em processos que se realizem sob elevadas condições de salinidade. Entre potenciais processos, cita-se o biobranquamento da polpa de papel Kraft, na hidrólise de material lignocelulósico, submetido a pré-tratamento alcalino, ou ainda na hidrólise de biomassa marinha, haja vista que as grandes quantidades de sal presentes nesses processos podem inibir a ação enzimática e, consequentemente, diminuir o rendimento da hidrólise (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; LEE et al., 2015). Ademais, recentes trabalhos têm estudado a possibilidade de utilização de água do mar como substituta à água doce nas etapas de lavagem do material lignocelulósico, em regiões costerias, para a remoção de compostos formados durante o pré-tratamento e, com isso, diminuir gastos e tornar a produção de biocombustíveis mais sustentável (CARLI, 2016; CARVALHO, 2017). A aplicação da xilanase bruta ou purificada, portanto, se mostra bastante interessante nesses casos, uma vez que demonstrou ser altamente tolerante a diferentes concentrações de sal, além de ter sido estimulada na presença de NaCl 0,5 M, concentração próxima da encontrada na água do mar (0,46 M).

Figura 13 - Estabilidade da xilanase ao NaCl. Enzima bruta (**a**) e purificada (**b**) na presença de NaCl 0,05 M (●), 0,5 M (▲), 1,00 M (-), 2,50 M (■) e 4,00 M (◆).



Atividades residuais determinadas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 55 °C durante 24 h de incubação. Os controles 100% (atividades sem incubação) correspondem a 28,43 U/mg para a enzima bruta até 2,5 M e a 27,84 U/mg em 4,0 M de NaCl, e a 358,33 U/mg para a enzima purificada até 2,5 M e a 320,00 U/mg em 4,0 M de NaCl.

Tal comportamento apresentado tanto pela enzima bruta quanto pela purificada se mostrou mais tolerante ao NaCl do que algumas xilanases de bactérias halofílicas como *Halorhabdus utahensis*, isolada de lago salino (WAINO; INGVORSEN, 2003), e *Bacillus* sp. NTU-06, isolada de uma bacia de sal (WANG, C et al., 2010).

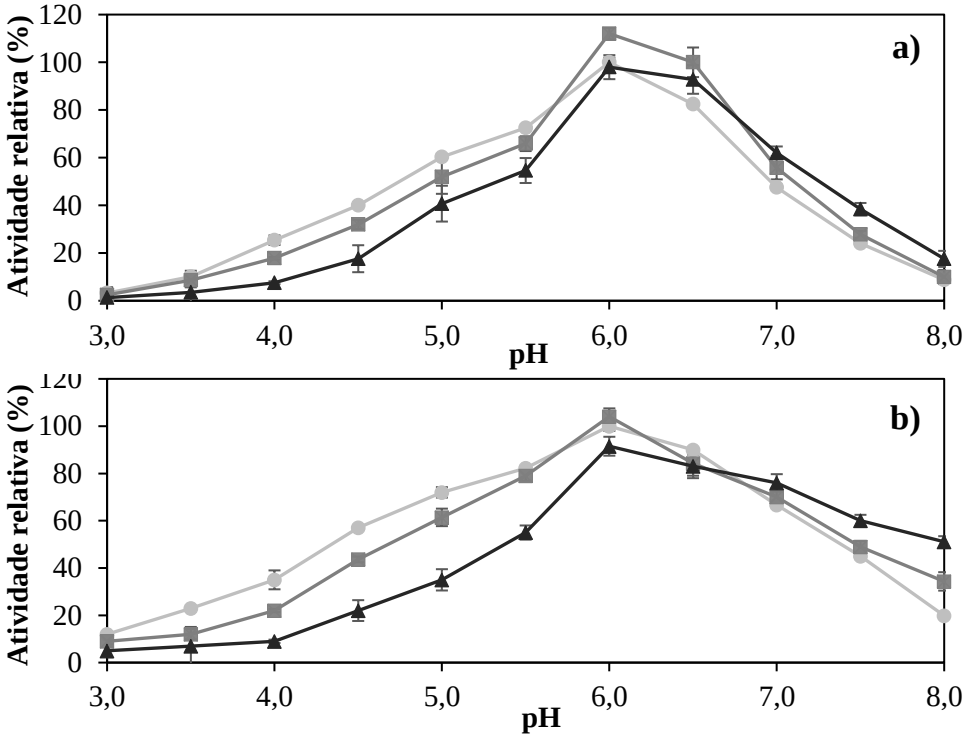
Resultados semelhantes foram observados para uma xilanase (CARLI, 2016) e para uma β-xilosidase (CARVALHO, 2017) halotolerantes produzidas por *Colletotrichum graminícola*, as quais foram capazes de manter no mínimo 90,0% das atividades controle na presença de NaCl 0,5-3,0 M.

Tendo em vista o comportamento halofílico/halotolerante demonstrado pela enzima e, visando explorar esta característica, a posterior caracterização bioquímica da xilanase foi realizada na ausência e na presença de 0,5 M e 2,5 M de NaCl.

5.2.2 Efeito do pH sobre a atividade xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl

O efeito do pH na atividade da xilanase é mostrado na **Figura 14**. No geral, os perfis de atividade da enzima bruta e purificada foram semelhantes. As atividades máximas tanto na presença, quanto na ausência de NaCl, observadas na faixa de pH entre 6,0 e 6,5, com a melhor condição em 0,5 M do sal. Fora desta faixa, a atividade diminuiu gradativamente, seja com o aumento ou decréscimo do pH do meio de reação até atingir cerca de 12% da atividade controle em pH 8,0 e 2,3% em pH 3,0, para a enzima bruta. Quando purificada, a enzima apresentou maior atividade em pHs alcalinos, mantendo cerca de 51% da atividade controle em pH 8,0 na presença de 2,5 M de NaCl. Embora a atividade máxima em ambos os casos tenha ocorrido em pH 6,0 e, os perfis de atividade terem se mostrado bastante parecidos na ausência e na presença do sal, pode-se observar, em pHs menores que 6,0, uma pequena tendência ao aumento na atividade enzimática, em resposta à diminuição da concentração de NaCl, sugerindo certa ação desestabilizadora resultante da presença de sal em condições mais ácidas. Já em pHs maiores que 6,0 observa-se um efeito contrário, visto que, nesse caso, a adição do sal proporcionou aumento na estabilidade da enzima, tanto no filtrado bruto, quanto purificada.

Figura 14 - Efeito do pH sobre a atividade xilanase. Enzima bruta (**a**) e purificada (**b**) na ausência (●) e na presença de NaCl 0,5 M (■) e 2,5 M (▲).



Atividades relativas determinadas em tampão McIlvaine, nos respectivos pHs, a 55 °C. Os controles (atividades máximas na ausência de NaCl) correspondem a 46,39 U/mg para a enzima bruta, e a 513,73 U/mg para a enzima purificada.

Em estudos com o gênero *Aspergillus*, o pH ótimo comumente encontrado para as xilanases é de 5,0 (DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009; SHAH; MADAMWAR, 2005; ZIMBARDI et al., 2013). No entanto, condições ótimas em torno de 6,0 e 6,5 são, também, bastante comuns, tendo sido descritas por diversos autores (CARMONA et al., 1998; ABDEL-SATER; EL-SAID, 2001; SOUZA, 2012; TERRONE, 2013; CHEN; LI; WANG, 2016; NASCIMENTO, 2017). As variações observáveis nos perfis de atividade enzimática em função do pH são resultado, principalmente, de alterações na estrutura da enzima devido ao favorecimento da repulsão de cargas entre aminoácidos próximos ou por alterações de cargas dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da enzima, os quais afetam o mecanismo de ligação e catálise do substrato (VOET; VOET, 2013).

Resultados semelhantes também foram observados para as xilanases de *Aspergillus versicolor* (CARMONA et al., 1997), *Aspergillus giganteus* (FIALHO; CARMONA, 2004) e *Penicillium oxalicum* (LIAO et al., 2015). Por outro lado, a adição de NaCl ao meio de reação resultou em um deslocamento do pH ótimo de atividade de uma xilanase (CARLI, 2016) e de uma β-xilosidase (CARVALHO, 2017) de *C. graminicola*, o que pode estar relacionado a

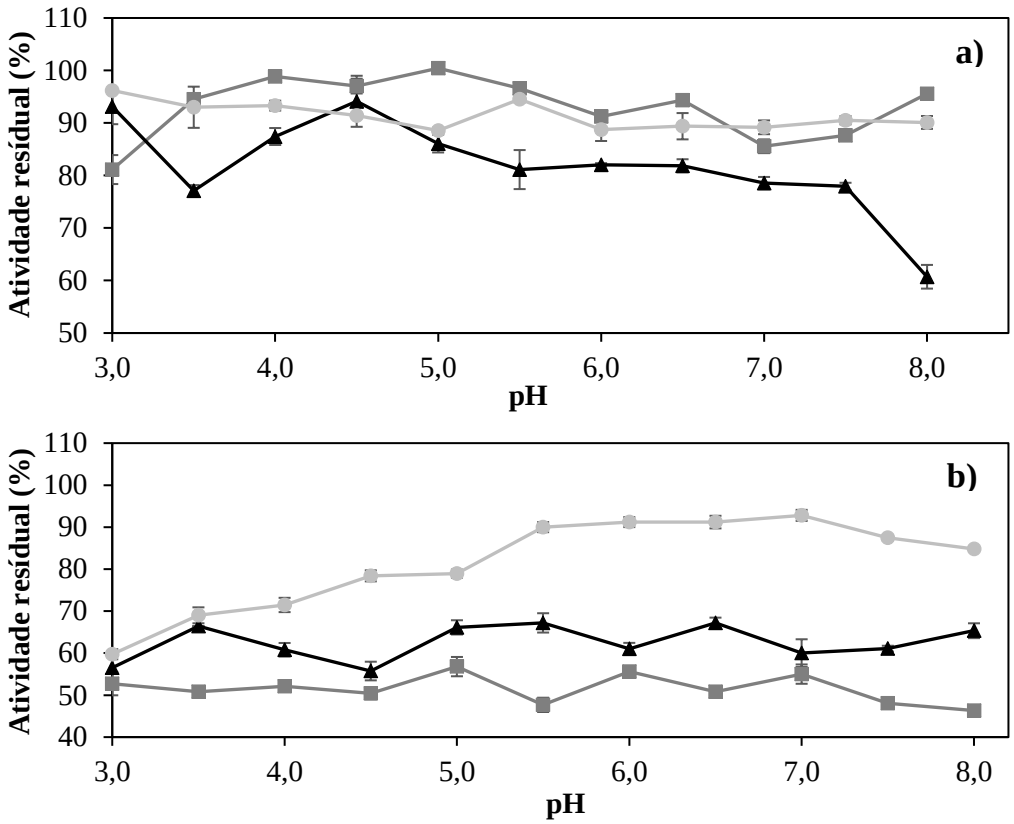
mudanças nos valores de pKa das cadeias laterais dos resíduos catalíticos em resposta ao aumento da força iônica do meio. Já, no trabalho de Nascimento (2017), o pH ótimo de atividade para o filtrado bruto e para a Xyl III purificada, em tampão McIlvaine, se deu em 6,5.

Considerando aplicações industriais, os perfis de atividade ótima apresentados tanto pela xilanase bruta quanto pela purificada, na ausência e na presença de NaCl, indicam um potencial para uso em processos de biopurga de fibras têxteis, uma vez que esses, geralmente, são conduzidos em uma faixa de pH de 6,0 a 8,0 (SILVA, 2013). Visando o seu emprego na sacarificação da biomassa lignocelulósica, cujos processos são, geralmente, conduzidos em uma faixa de pH de 4,0-5,0, a enzima pode se mostrar também atraente tendo em vista a manutenção de mais de 60,0% da atividade inicial em pH 5,0 na ausência NaCl.

5.2.3 Estabilidade da xilanase bruta e purificada ao pH na presença e ausência de NaCl

Os perfis de estabilidade da xilanase bruta e da Xyl 3 em diferentes valores de pH são mostrados na **Figura 15**. A enzima bruta se mostrou bastante estável na faixa de pH entre 3,0 e 8,0, na ausência e na presença de NaCl 0,5 M, mantendo, nesses casos, um mínimo de 80% da atividade controle. Já na presença de 2,5 M do sal, a estabilidade foi ligeiramente menor em quase todos os pH estudados. Entretanto, mesmo nessa condição, exceto em pH 8,0, a enzima foi capaz de manter no mínimo 77% da atividade controle. A enzima purificada, por sua vez, também se mostrou bastante estável ao pH, especialmente na ausência de NaCl, tendo sido capaz de manter uma atividade mínima de 60% em relação ao controle nessa condição. Em oposição ao observado para a enzima bruta, a presença de 0,5 M do sal no meio de reação foi mais prejudicial à atividade da enzima que a presença de 2,5 M, sendo que, em tais condições, respectivamente, um mínimo de 46% e 55% da atividade controle foi mantida em toda a faixa de pH analisada.

Figura 15 - Estabilidade da xilanase ao pH. Enzima bruta (**a**) e purificada (**b**) na ausência (●) e na presença de NaCl 0,5 M (■) e 2,5 M (▲).



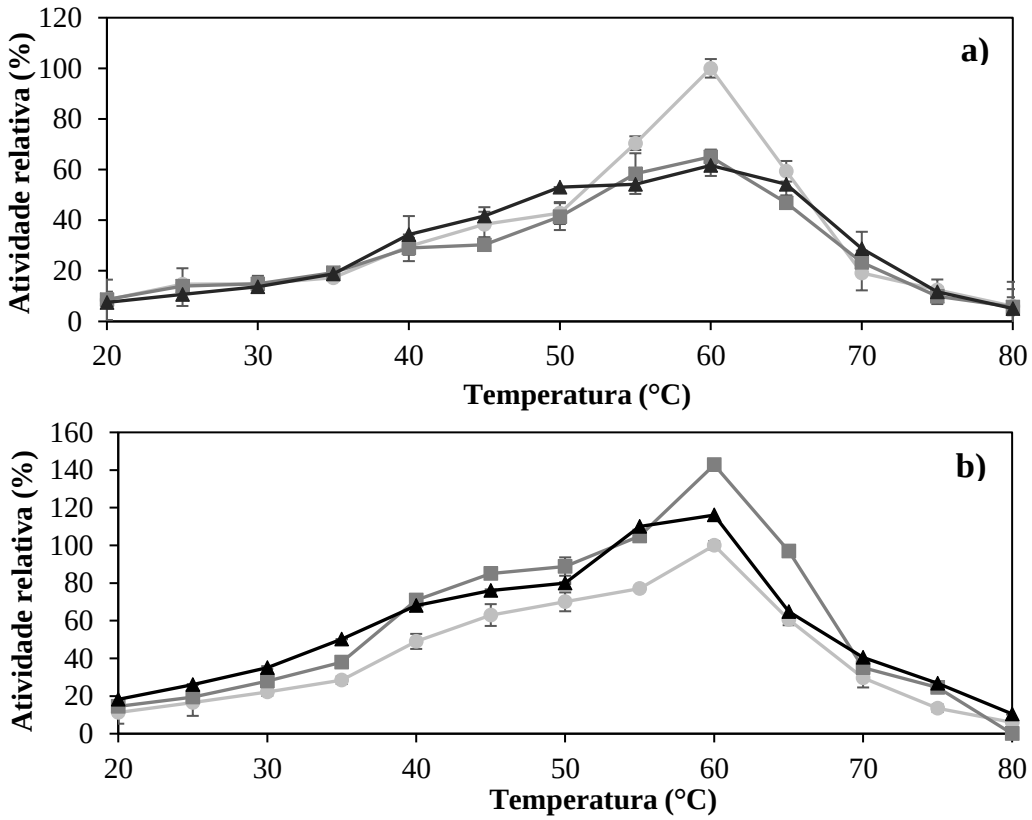
Atividades residuais determinadas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 55 °C após incubação por 24 h a 4 °C. Os controles (atividades sem incubação) correspondem a 25,87 U/mg para a enzima bruta, e a 357,38 U/mg para a enzima purificada.

Perfis de estabilidade das xilanases ao pH são bastante variáveis, sendo possível encontrar na literatura relatos de enzimas estáveis a amplas faixas de pH e, até mesmo, comportamentos variáveis entre diferentes xilanases produzidas por um mesmo micro-organismo, como observado por Nascimento (2017). Nesse mesmo trabalho, a enzima bruta, na ausência de sal, foi estável ao pH de 3,0 a 7,0 mantendo, nesses casos, não menos que 85% da atividade controle. Em nosso trabalho, nas mesmas condições, um mínimo de 88% da atividade controle foi mantido. Após a purificação, a Xyl III apresentou comportamento bastante variável, com atividades entre 70% e 110% enquanto que, a Xyl 3 foi capaz de manter entre 60% e 92% da atividade controle. Uma xilanase purificada de *C. graminicola* (CARLI, 2016) também se mostrou bastante estável na faixa de pH de 4,0 a 10,0, mantendo mais de 80% da atividade controle em todos os ensaios. Em pH mais ácidos (3,0-3,5), no entanto, a presença de NaCl foi bastante prejudicial para a atividade enzimática, levando a perdas de 60% e 75% da atividade residual quando na presença de 0,5 e 2,5 M do sal, respectivamente.

5.2.4 Efeito da temperatura sobre a atividade xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl

Os perfis de atividade da xilanase bruta e da Xyl 3 em função da temperatura são apresentados na **Figura 16**. A temperatura ótima de reação, para a xilanase bruta, se deu a 60 °C tanto na ausência quanto na presença de NaCl 0,5 e 2,5 M. Nota-se, no entanto, que nessa temperatura e, também a 55 °C, a presença do sal foi prejudicial para a sua atividade, haja vista a perda de aproximadamente 40,0% em comparação ao ensaio na ausência de NaCl. Para temperaturas fora dessa faixa, os perfis de atividade foram muito parecidos independentemente da presença do sal sendo que, acima de 60 °C, a atividade diminuiu gradativamente com o aumento da temperatura, chegando a 6,0% da atividade controle a 80,0 °C. Já, abaixo de 55 °C, a diminuição, também gradual, na atividade se deu com a diminuição da temperatura, chegando a 8% da atividade máxima a 20 °C. A Xyl 3, por sua vez, apresentou um perfil bastante similar ao da enzima bruta e, da mesma forma, a adição de NaCl não resultou em alterações na temperatura ótima de reação, a qual foi, também, observada a 60 °C. Contudo, nota-se que o sal favoreceu a atividade da enzima em todas as faixas de temperatura sendo a condição ótima de atividade na presença de 0,5 M, indicando, novamente, um caráter halofílico dessa enzima.

Figura 16 - Efeito da temperatura sobre a atividade xilanase. Enzima bruta (**a**) e purificada (**b**) na ausência (●) e na presença de NaCl 0,5 M (■) e 2,5 M (▲).



Atividades relativas determinadas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 55 °C. Os controles (atividades máximas na ausência de NaCl) correspondem a 41,39 U/mg para a enzima bruta, e a 529,76 U/mg para a enzima purificada.

Diversos trabalhos com fungos filamentosos têm descrito temperaturas ótimas de atividade xilanase em torno de 55 e 60 °C (**Tabela 2**) assim como algumas xilanases comerciais como Sumizyme, Multifect XL, Pulpzyme e Cartazyme, também produzidas por fungos, apresentam atividade ótima nesta faixa de temperatura (POLIZELI et al., 2005). De fato, em grande parte dos casos, a atividade ótima de reação das xilanases se dá em temperaturas entre 40 e 60 °C (CHEN; WANG, 2016). Condições extremas de temperatura ótima de atividade também são relatadas na literatura, como as das xilanases de *Marasmium* sp. (RATANACHOMSRI et al., 2006) e *Thermothoga* sp. (SIMPSON; HAUFLER; DANIEL, 1991) cujas atividades máximas se dão a 90,0 e 105,0 °C, respectivamente. Tais enzimas, no entanto, estão sempre associadas a micro-organismos termófilos de ambientes extremos (CHEN; WANG, 2016), os quais são quase sempre de difícil cultivo em laboratório, além de apresentarem, geralmente, baixa produção enzimática, características não interessantes do

ponto de vista industrial e comercial (SCHIRALDI; ROSA, 2002; GOMES; STEINER, 2004; ZWEERINK et al., 2017).

No trabalho de Nascimento (2017) a xilanase bruta apresentou atividade ótima a 55 °C e a Xyl III a 65 °C, valores diferentes do observado no presente estudo, que foi de 60 °C, tanto para a enzima bruta quanto para a purificada. Além dessa, outras xilanases, como as de *Aspergillus niveus* (DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009) e *Aspergillus niger* (JIN et al., 2012) quando cultivados em estado sólido, utilizando sabugo de milho, também apresentaram temperatura ótima a 55 ºC. É interessante destacar que tanto a enzima bruta, quanto a Xyl 3, apresentaram temperatura ótima maior que a relatada para xilanases de alguns micro-organismos termófilos como *Myceliophthora thermophila* (PEREIRA et al., 2015) e *Bacillus pumilus* (MAHILRAJAN; BALAKUMAR; ARASARATNAM, 2012), as quais apresentaram atividade máxima a 55 °C.

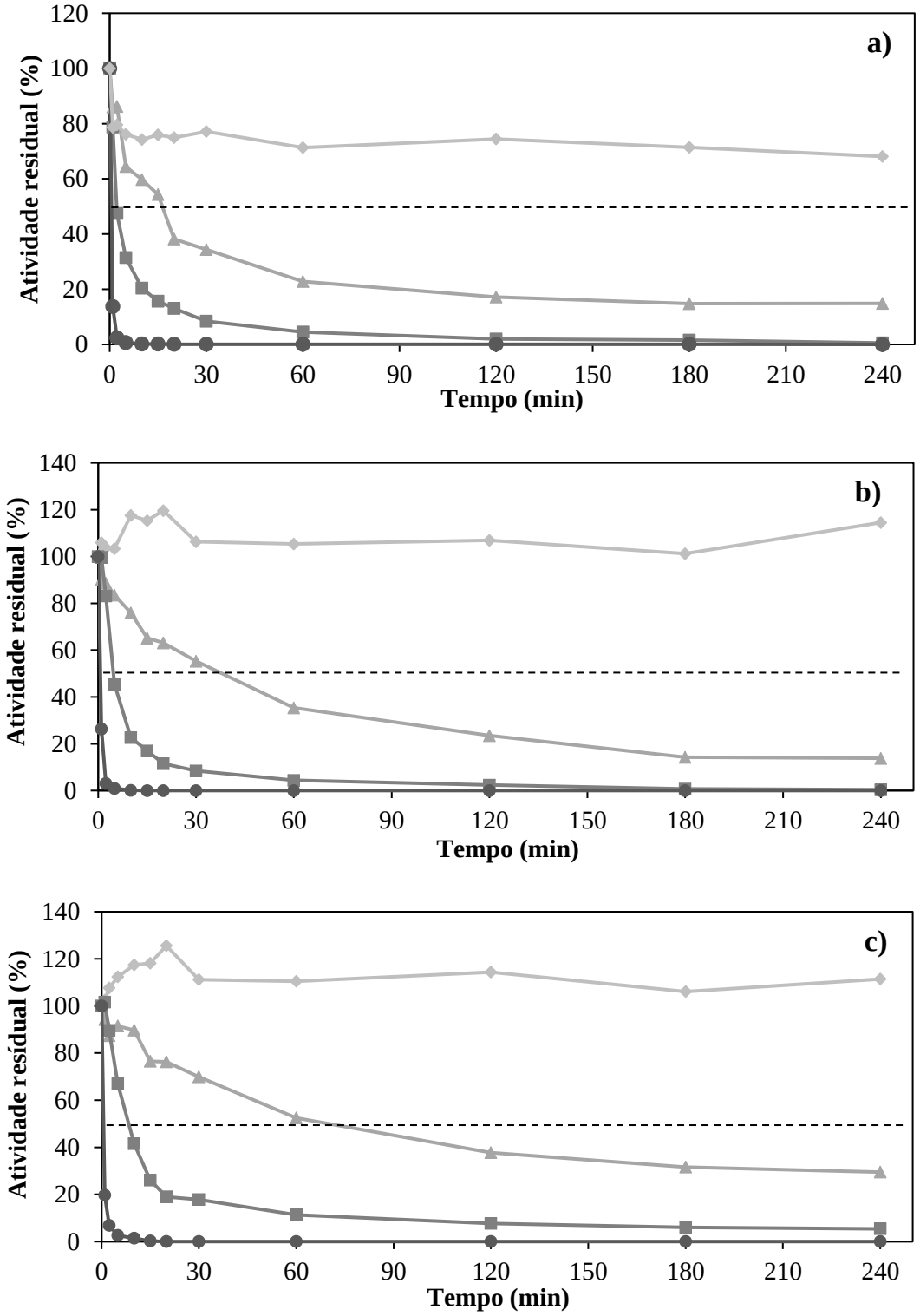
5.2.5 Estabilidade térmica da xilanase bruta e purificada na presença e ausência de NaCl

Os perfis de estabilidade térmica da xilanase bruta e da Xyl 3 são mostrados nas **Figuras 17 e 18**. A enzima bruta, quando incubada a 40 °C na ausência de NaCl, foi completamente estável, mantendo aproximadamente 80% da sua atividade inicial durante as 4 h de incubação. Já na presença do sal, em ambas as concentrações, foi estimulada, mantendo mais de 100% da atividade inicial durante o mesmo período de incubação. De maneira geral, a estabilidade térmica da enzima foi favorecida com a presença de NaCl no meio reacional. Tal comportamento é claramente observado nos ensaios a 50 °C, no qual o tempo de meia vida da enzima foi duplicado na presença de 0,5 M do sal e quadruplicado na presença de 2,5 M, quando comparado ao ensaio sem a presença do NaCl. Esse, consiste em mais uma evidência do caráter halofílico de alguma/algumas das xilanases presentes nessa amostra bruta. Já, em temperaturas mais elevadas observa-se um acentuado decréscimo na atividade enzimática de forma que, mesmo nas melhores condições de estabilidade, 2,5 M de NaCl, aproximadamente 60% e 99% da atividade foi perdida logo nos primeiros 10 minutos de incubação a 60 e a 70 °C, respectivamente.

Com a Xyl 3 purificada observa-se, de maneira geral, uma pequena diminuição na estabilidade térmica, o que pode ser explicado pela retirada de componentes protetores da enzima durante as etapas de purificação. Quando a 40 °C, na ausência de NaCl, a enzima

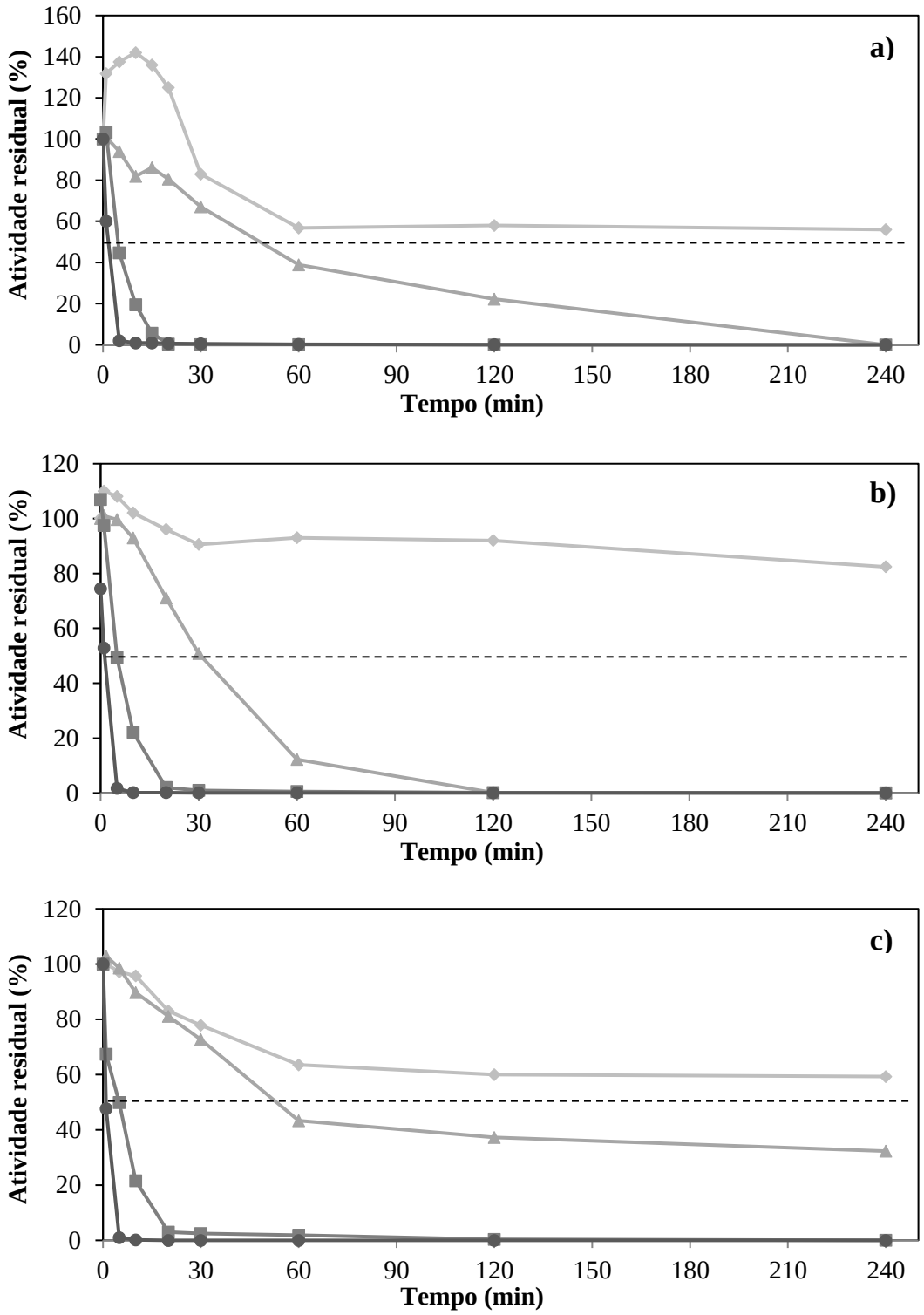
apresentou aumento da atividade durante os primeiros 30 min de incubação, e depois foi capaz de manter aproximadamente 50% da sua atividade inicial em até 4 horas de incubação. Já, na presença de 0,5 M de NaCl, a enzima também foi ativada durante os 10 primeiros minutos de incubação, após esse período, se manteve estável, com atividades entre 80 e 92% em relação ao controle durante todo o período de 4 h. A 50 °C, na ausência de NaCl, a enzima foi capaz de manter mais de 50,0% da atividade controle por mais de 30 minutos. A adição de 2,5 M do sal, nessa temperatura, também favoreceu a atividade enzimática, elevando esse tempo para 60 minutos. Já, a 70 °C, assim como observado para a enzima bruta, há um acentuado decréscimo na atividade da Xyl 3, a qual perdeu mais de 98% da atividade controle logo nos primeiros 5 minutos de incubação. No trabalho de Nascimento (2017), a enzima bruta, na ausência de sal, foi estável tanto a 40 °C quanto a 50 °C, mantendo mais de 70% da atividade controle durante 4 h de incubação. A Xyl III, por sua vez, perdeu aproximadamente 50% da sua atividade inicial logo nos primeiros 10 min de incubação a 55 °C, temperatura não avaliada para a Xyl 3.

Figura 17 - Estabilidade térmica da xilanase bruta. Enzima na ausência (**a**) e na presença de NaCl 0,5 M (**b**) e 2,5 M (**c**) a 40 °C (♦), 50 °C (▲), 60 °C (■) e 70 °C (●).



Atividades residuais determinadas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 55 °C. Os controles (atividade sem incubação) correspondem a 33,14 U/mg (♦) e a 28,42 U/mg (▲, ■ e ●).

Figura 18 - Estabilidade térmica da xilanase purificada. Enzima na ausência (**a**) e na presença de NaCl 0,5 M (**b**) e 2,5 M (**c**) a 40 °C (♦), 50 °C (▲), 60 °C (■) e 70 °C (●).



Atividades residuais determinadas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 55 °C. Os controles (atividade sem incubação) correspondem a 182,62 U/mg (♦) e a 494,12 U/mg (▲, ■ e ●).

A termoestabilidade é uma importante propriedade a ser considerada quando se busca a aplicação industrial da enzima, tendo em vista as severas condições geralmente empregadas nos processos biotecnológicos (BHALLA; BISCHOFF; SANI, 2015). Estudos comparativos têm demonstrado que a maior resistência das enzimas termoestáveis, em relação aos seus pares, resulta de pequenas substituições de aminoácidos e/ou da troca de suas localizações na molécula, aumentando o número de interações estabilizadoras intramoleculares. Além disso, sabe-se que a termoestabilidade de algumas enzimas pode ser alcançada por fatores como, pela redução de resíduos suscetíveis a oxidação; pela síntese, pelo micro-organismo, de diferentes estabilizadores; pelo aumento no grau de glicosilação da molécula e/ou ainda, pelo aumento nas concentrações de sais e proteínas intracelulares (GUPTA, 1991; SKROPETA, 2001; VIEILLE; ZEIKUS, 2001; FUKUCHI; NISHIKAWA, 2001). De fato, alguns trabalhos têm relatado aumento na estabilidade térmica de enzimas xilanolíticas quando na presença de NaCl (LIU et al., 2014; CARLI, 2016; CARVALHO, 2017). Apesar dos mecanismos físico-químicos responsáveis por esse efeito termoestabilizador ainda não serem completamente elucidados, sugere-se que tal comportamento possa estar relacionado ao sequestro das moléculas de água da camada de hidratação da enzima, pelos íons do sal, criando um microambiente hidrofóbico, que causaria perturbações nas interações eletrostáticas entre grupos carregados adjacentes, ou favoreceria a formação de interações hidrofóbicas, resultando em uma maior rigidez na estrutura da enzima, que se tornaria termodinamicamente mais estável.

A ativação a 40 °C, bem como a estabilidade a 50 °C apresentadas pela enzima bruta são características bastante interessantes visando a sua aplicação em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica, uma vez que tais processos são comumente conduzidos em temperaturas iguais ou abaixo de 50 °C (BHALLA et al., 2013). Por outro lado, para procedimentos típicos aplicados no biobraqueamento da polpa celulósica (temperaturas ≥ 50 °C por 120-180 minutos) (BRIJILALL et al., 2011; VALLS et al., 2010), a utilização da enzima não se mostra interessante, uma vez que, nessas condições, mais de 60% da sua atividade é perdida.

5.2.6 Efeito de íons metálicos e compostos químicos sobre a atividade xilanase bruta e purificada

O efeito de íons metálicos e alguns compostos sobre a atividade xilanase é apresentado na **Tabela 5**. De modo geral, houve perda de atividade da enzima bruta e da Xyl 3 quando na presença de todos os íons e compostos testados exceto na presença de DTT e β-mercaptoetanol a 10 mM para a enzima bruta, a qual foi estimulada em cerca de 13,0 e 19,0%, respectivamente. É interessante destacar o forte efeito negativo na atividade da enzima quando em presença de 10 mM dos íons Cu^{2+} e Hg^{2+}, onde as perdas foram maiores que 90% em relação ao controle. Tal comportamento tem sido comumente atribuído à oxidação de grupos -SH presentes no sítio ativo (ou próximo dele) da enzima, os quais desempenham importante papel na manutenção da estrutura tridimensional da proteína (NELSON; COX, 2011; SCOPES, 1994). Nesse caso, a presença de tais grupos pode ser confirmada pela ativação da enzima na presença de DTT e β-mercaptoetanol (10 mM), esses, são agentes redutores que contém grupos sulfidril em sua molécula, os quais, quando presentes no meio, são oxidados no lugar dos -SH da enzima, promovendo um efeito protetor sobre ela. De fato, alguns íons metálicos têm a capacidade de afetar significativamente a eficiência das xilanases, sendo bastante comum a perda de atividade quando em presença de íons como Hg^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+} e Pb^{2+} (ZHOU et al., 2009). Apesar da perda de atividade na presença de todos os íons metálicos testados, foi observado que a enzima bruta e purificada também perdeu atividade na presença de EDTA, um quelante de íons divalentes, o que sugere que a enzima necessita de algum, ou alguns, íons metálicos para a sua atividade.

Tabela 5 - Efeito de íons e compostos químicos sobre a atividade xilanase bruta e purificada.

Íons e Compostos	Enzima Bruta		Enzima Purificada	
	Atividade relativa (%)*			
	2 mM	**10 mM**	**2 mM**	**10 mM**
Controle	100,0	100,0	100,0	100,0
$CaCl_2$	59,9 ± 0,3	43,8 ± 0,3	31,0 ± 0,3	24,0 ± 0,0
$MgSO_4$	56,8 ± 0,4	63,1 ± 1,2	36,2 ± 1,2	32,8 ± 0,1
$ZnSO_4$	66,3 ± 0,0	56,3 ± 0,0	33,5 ± 0,0	31,0 ± 0,1
$BaCl_2$	64,4 ± 0,1	64,9 ± 0,7	36,0 ± 0,1	33,7 ± 0,1
$MnSO_4$	71,1 ± 1,8	70,2 ± 0,7	34,4 ± 0,5	33,1 ± 0,5
$CuCl_2$	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,0	2,39 ± 0,0	4,4 ± 0,0
$HgCl_2$	39,3 ± 0,8	6,4 ± 0,1	24,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0
$MgCl_2$	66,2 ± 0,4	59,4 ± 1,5	31,1 ± 0,6	27,4 ± 0,4
NH_4Cl	68,2 ± 0,8	67,6 ± 0,9	35,7 ± 0,1	33,4 ± 0,5
$(NH_4)_2SO_4$	59,8 ± 0,6	66,2 ± 1,6	43,0 ± 0,1	45,1 ± 0,8
Acetato de amônio	61,6 ± 0,4	60,0 ± 0,0	33,8 ± 0,0	33,2 ± 0,4
Acetato de chumbo	55,3 ± 0,1	44,5 ± 0,3	28,4 ± 0,0	21,4 ± 0,1
SDS	25,6 ± 0,3	2,1 ± 0,0	19,5 ± 0,2	1,0 ± 0,0
Triton X-100	13,3 ± 0,4	12,3 ± 0,5	38,1 ± 0,7	81,2 ± 1,0
Tween-20	12,0 ± 0,0	13,3 ± 0,9	36,4 ± 0,5	60,7 ± 0,4
Tween-80	12,9 ± 0,7	13,2 ± 0,8	32,8 ± 0,3	60,0 ± 0,6
Glicerol	54,05 ± 0,3	46,2 ± 2,3	40,2 ± 2,4	39,5 ± 1,3
EDTA	63,3 ± 0,7	56,5 ± 1,7	43,7 ± 0,5	41,5 ± 0,0
PMSF	60,5 ± 0,1	38,0 ± 0,8	39,9 ± 0,1	30,0 ± 0,0
DTT	66,5 ± 0,1	113,1 ± 0,1	48,3 ± 0,4	86,1 ±1,8
β-mercaptoetanol	67,5 ± 0,7	119,2 ± 4,5	46,2 ± 0,5	76,4 ± 0,9

*Atividades relativas determinadas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 55 °C. Os controles (atividade na ausência dos íons e compostos químicos) correspondem a 30,55 U/mg para a enzima bruta e, a 476,38 U/mg para a enzima purificada.

Fortes efeitos negativos na atividade também podem ser observados na presença dos surfactantes SDS, Tween e Triton sugerindo a presença de interações hidrofóbicas importantes na manutenção da estrutura da xilanase (NELSON; COX, 2011). A enzima purificada, por sua vez, não foi estimulada por nenhum dos íons e compostos analisados. Verifica-se, também, nesse caso, um forte efeito negativo em resposta à presença de Cu^{2+}, Hg^{2+} e SDS em ambas as

concentrações. É interessante notar, no entanto, que na presença de Tween 20/80 e Triton X-100, a perda de atividade foi menor, quando comparada a enzima bruta.

Em contraste a esses resultados, os mesmos íons e compostos testados, com exceção de Glicerol, SDS, Cu^{2+}, Ca^{2+}, Hg^{2+} e Pb^{2+} na concentração de 2 mmol/L e 10 mmol/L, estimularam a atividade da Xyl III purificada do filtrado bruto de *A. hortai* cultivado em meio líquido (NASCIMENTO, 2017).

A tolerância à presença de metais e outros compostos químicos é uma característica importante quando se visa a aplicação de uma enzima em processos industriais, já que muitos destes componentes podem estar presentes no meio de reação. É comum, por exemplo, a presença de traços de metais como ferro, cobre, zinco, manganês e magnésio na madeira e na polpa de papel Kraft. Esses metais são adsorvidos do solo, da água, dos reagentes e do contato com os equipamentos utilizados no processamento dos materiais (VENSON, 2008; CHEN, 2014). Como consequência da presença desses íons, as enzimas podem perder grande parte da sua atividade, reduzindo o rendimento de hidrólise do processo.

5.2.7 Especificidade da xilanase bruta e purificada pelo substrato

A especificidade da xilanase bruta e da Xyl 3 por diferentes substratos é mostrada na **Tabela 6**. A enzima, apresentou maior atividade para hidrolisar as xilanas, em especial, a xilana de *birchwood*, e não apresentou atividades detectáveis sobre CMC, AVICEL e ρNPX, exceto para a enzima bruta, que apresentou atividade celulase sobre CMC.

Tabela 6 - Especificidade da xilanase purificada por diferentes substratos.

Substrato	**Atividade xilanase (U/mL)***	
	Bruta	**Purificada**
Xilana *birchwood*	16,80 ± 2,64 [a]	11,79 ± 0,40 [a]
Xilana *beechwood*	13,79 ± 2,62 [a]	9,51 ± 0,48 [a]
Xilana *oat spelt*	12,68 ± 1,40 [a]	9,08 ± 0,89 [a]
ρNPX	ND	ND
CMC	0,12 ± 0,02	ND
AVICEL	ND	ND

Atividades realizadas em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 a 55 °C. Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5,0% de significância.
*Valores de atividade correspondentes a média de triplicatas (n=3), ND: não detectado.

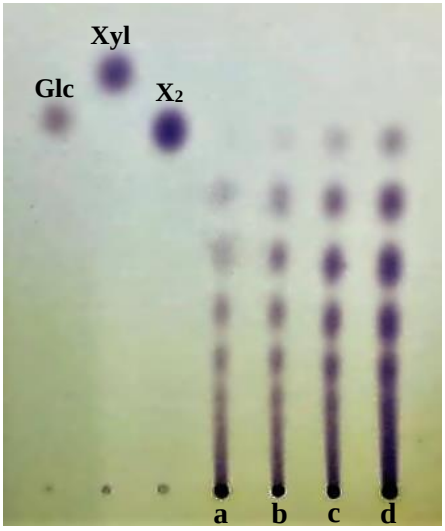
Dada a complexidade dos tipos de xilanas presentes na natureza, sua degradação requer uma grande diversidade de enzimas xilanolíticas com diferentes especificidades, características físicas, químicas e bioquímicas (POLIZELI et al., 2005). De acordo com Gonçalves et al. (2012), os principais fatores que influenciam a eficiência da hidrólise da xilana são o comprimento da molécula e o seu grau de substituição. As múltiplas formas de xilanases produzidas pelos diversos organismos apresentam diferentes especificidades pelo substrato: enquanto algumas são capazes de hidrolisar apenas resíduos de xilose não substituídos, outras dependem fortemente desses substituintes para poderem atuar (DE VRIES; VISSER, 2001). A xilana de *birchwood* é composta em mais de 90% por resíduos de xilose unidos por ligações do tipo β-1,4. A xilana de *beechwood* também exibe mais que 90% de resíduos de xilose, além de arabinoses em algumas ramificações. Já, a xilana *oat spelt* é a mais ramificada entre as três e possui uma composição bastante variada, sendo formada, geralmente, por mais de 70% de resíduos de xilose, menos de 15% de glicose e menos de 10% de arabinose (SIGMA-ALDRICH). A xilanase bruta e a Xyl 3 não apresentaram diferenças significativas de atividade sobre as três xilanas testadas, sugerindo não haver uma preferência de hidrólise por moléculas mais ou menos ramificadas. Tal comportamento, associado à ausência de atividade celulase é bastante interessante visando a sua aplicação no branqueamento da polpa de celulose e no processamento de fibras vegetais, uma vez que tais processos requerem preparações enzimáticas livres de atividade celulolítica (PAES, BERRIN e BEAUGRAND, 2012; DE SOUZA MOREIRA et al., 2013). Resultados semelhantes foram, também, observados para diversas xilanases de *Aspergillus* (MAITAN-ALFENAS et al., 2016; TAKAHASHI; KAWABATA; MURAKAMI, 2013; YANG et al., 2010), as quais foram capazes de hidrolisar exclusivamente xilanas. Também, a Xyl III purificada por Nascimento (2017), apresentou atividade apenas sobre xilanas, tendo maior afinidade pela xilana *oat spelt*, o que indica a preferência dessa enzima por xilanas mais ramificadas.

5.2.8 Produtos de hidrólise da xilana oat spelt pela Xyl 3 purificada

O perfil da cromatografia de camada delgada (CCD) revelou que os principais produtos solúveis de hidrólise da xilana *oat spelt* pela Xyl 3 foram xilobiose, mais evidente a partir de 2 horas de incubação, e xilo-oligossacarídeos superiores, produzidos durante as 18 horas de incubação (**Figura 20**). Neste período, não houve indícios da formação de xilose. Tal comportamento, associado a ausência de atividade β-xilosidase, permite a classificação da

enzima em estudo como uma endoxilanase. Ademais, nenhuma diferença foi observada entre os produtos formados durante os diferentes períodos de hidrólise, indicando a ausência de atividade transxilosidase.

Figura 19 - Produtos de hidrólise da xilana *oat spelt* pela Xyl 3 purificada. Incubação por 10 min (**a**), 30 min (**b**), 2 h (**c**) e 18 h (**d**).



Padrões de glicose (**Glc**), xilose (**Xyl**) e xilobiose (**X_2**).

A produção exclusiva de xilo-oligossacarídeos de cadeias curtas de xilose, como produtos solúveis, é uma interessante característica da enzima visando sua aplicação industrial, haja vista a ampla possibilidade de aplicações desses compostos como, por exemplo, na indústria farmacêutica, como agentes ativos contra osteoporose e otites, antioxidantes e na prevenção e tratamento de infecções gastrointestinais; na indústria de alimentos, como prebióticos e outros compostos funcionais e na agricultura, como estimulantes do crescimento e amadurecimento vegetal (KUMAR; PUSHPA; PRABHA, 2012; VÁZQUEZ et al., 2000). Diferentemente do observado em nosso trabalho, o perfil dos produtos de hidrólise da xilana *oat spelt* pela Xyl III (NASCIMENTO, 2017) revelou a formação de xiloses a partir de 2 h de hidrólise seguida do aumento da sua concentração até 24 h o que não é comum em xilanases e pode estar relacionado à presença de atividade transglicosidase ou à contaminação da amostra por β-xilosidases não evidenciadas no gel de eletroforese.

5.2.9 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$

A **Tabela 7** mostra os parâmetros cinéticos da xilanase purificada, utilizando xilana de *birchwood* como substrato, na ausência e na presença de NaCl 0,5 e 2,5 M. Nas três condições

de ensaio, a xilanase seguiu o modelo Michaeliano de cinética enzimática, no qual, em baixas concentrações de substrato, a taxa de reação dobra com a concentração do substrato enquanto, em altas concentrações, essa taxa se aproxima de um máximo (LOPES, VALERI, PESSOA-JÚNIOR, 2013). De acordo com os resultados, a enzima apresentou maior afinidade pelo substrato quando em presença de 2,5 M de NaCl no meio de reação (K_m 3,13 mg/mL) comparado aos ensaios na ausência (K_m 5,12 mg/mL) e presença de 0,5 M do sal (K_m 9,56 mg/mL). A maior velocidade, ou o menor tempo de conversão do substrato em produto, foi atingida quando em presença de 0,5 M de NaCl no meio ($V_{máx}$ 20,80 U/mL) em comparação aos ensaios na ausência ($V_{máx}$ 14,25 U/mL) e presença de 2,5 M do sal ($V_{máx}$ 9,22 U/mL). Em razão dos valores apresentados, a enzima demonstrou ser cataliticamente mais eficiente na presença de 2,5 M de NaCl com K_{cat}/K_m 40,91 mL/mg.s, valor próximo ao obtido na ausência de sal, cuja eficiência foi de 38,65 mL/mg.s, e cerca de 26,0% maior que o obtido na presença de 0,5 M de NaCl.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos da xilanase purificada.

NaCl (M)	**K_m (mg/mL)**	**$V_{máx}$ (µmol/min.mL)**	**k_{cat} (s^{-1})**	**k_{cat}/K_m (mL/mg.s)**
0	5,12	14,25	197,92	38,65
0,5	9,56	20,80	288,85	30,21
2,5	3,13	9,22	128,05	40,91

A xilanase purificada apresentou resultados cinéticos concordantes com diversas xilanases de *Aspergillus* sp. já descritas **(Tabela 8)**. Uma xilanase purificada de *C. graminicola* (CARLI, 2016) também apresentou variações nos parâmetros cinéticos em resposta a presença de sal. Nesse caso, a adição de 2,5 M de NaCl resultou na queda dos valores de Km e Vmáx levando a uma perda na eficiência catalítica de 56,3%, em relação à eficiência na ausência do sal. Já, no trabalho de Nascimento (2017), os parâmetros cinéticos para a Xyl III utilizando, respectivamente, xilanas de *birchwood* e *oat spelt*, na ausência de NaCl, foram K_m 1,64 mg/mL e 16,08 mg/mL e $V_{máx}$ 22,22 U/mL e 79,70 U/mL, valores diferentes dos encontrados para a Xyl 3 utilizando o mesmo substrato.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de algumas xilanases de *Aspergillus* sp.

Micro-organismo	K_m (mg/mL)	$V_{máx}$	Substrato (xilana)	Referência
Aspergillus hortai	5,5	12,9 U/mL	*beechwood*	Este trabalho
Aspergillus fischeri	4,8	588,0 U/mL	-	RAJ; CHANDRA, 1996
Aspergillus Awamori	28,6 6,6	80,0 U/mL 26,6 U/mL	*birchwood*	BAKALOVA et al., 2002
Aspergillus niger	8,9	11,1 U/mg	*birchwood*	KRISANA et al., 2005
Aspergillus ficuum	3,7	11,1 U/mg	*birchwood*	LU et al., 2008
Aspergillus niger	0,10	24,8 U/mg	*birchwood*	YANG et al., 2010
Aspergillus niger	9,24	54,0 U/mL	*birchwood*	DAI, et al., 2011
Aspergillus niger	10,4	3,3 U/mg	*birchwood*	BENEDETTI et al., 2013
Aspergillus terreus	0,42 13,0	0,1 U/mL 1,0 U/mL	*birchwood*	DE SOUZA MOREIRA et al., 2013
Aspergillus niger	2,0	6,9 U/g	-	LOPES; VALERI; PESSOA-JUNIOR, 2013
Aspergillus niger	2,8	127,0 U/mg	*beechwood*	TAKAHASHI; KAWABATA; MURAKAMI, 2013
Aspergillus niger	0,6	13,8 U/mg	*oat spelt*	VIMALASHANMUGAM; VIRUTHAGIRI, 2014
Aspergillus flavus	15,3	200,0 U/mL	-	BHUSHAN et al., 2015
Aspergillus fumigatus	12,7	59,0 U/mg	*oat spelt*	MIAO et al., 2015
Aspergillus fumigatus	11,6	87,6 U/mg	*birchwood*	DESHMUKH et al., 2016
Aspergillus nidulans	1,66 4,23	193,2 U/mg 435,8 U/mg	*beechwood*	MAITAN-ALFENAS et al., 2016
Aspergillus parasiticus	1,5	9,19 U/mL	*beechwood*	SILVA et al., 2016
Aspergillus hortai	2,1 2,2 16,0	0,4 U/mL 546,0 U/mL 79,7 U/mL	*oat spelt*	NASCIMENTO, 2017

5.3 Caracterização dos subprodutos sabugo, palha e folha de milho

5.3.1 Determinação da composição química dos subprodutos in natura

Os resultados da análise da composição química dos subprodutos na forma *in natura* estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Composição química dos subprodutos da indústria do milho *in natura*.

Biomassa	**Composição (%, base massa seca)**				
	Celulose	**Hemicelulose**	**Lignina***	**Extrativos**	**Umidade**
Sabugo de milho	22,8 ± 1,4	12,9 ± 1,3	19,7 ± 0,4	9,0 ± 0,2	7,1 ± 0,2
Palha de milho	26,9 ± 3,2	24,0 ± 2,8	14,2 ± 0,7	17,4 ± 0,6	7,0 ± 0,2
Folha de milho	18,3 ± 0,9	16,6 ± 0,8	17,6 ± 3,3	24,0 ± 0,5	6,8 ± 0,4

*Lignina: correspondente ao somatório do teor de lignina solúvel e insolúvel em ácido sulfúrico. Valores médios de triplicatas e respectivos desvios padrão.

Os teores de hemicelulose e lignina estão de acordo com os observados por diversos autores, entre eles Liu et al. (2010), Silva et al. (2015), Van Dongen et al. (2011), Xu (2010) e Zhou et al. (2016). Por outro lado, discordantes dos observados por Harmsen et al. (2010), Mourtzinis et al. (2016) e Pointner et al. (2014). Entretanto, como já mencionado, a composição do material lignocelulósico é uma propriedade bastante variável e, diversos são os fatores que podem exercer influência sobre essa variabilidade como, por exemplo, as condições ambientais e climáticas em que a planta se desenvolveu, o período de colheita, o tipo de cultivar e, também, o método de extração utilizado (BARTEN, 2013), o que pode justificar os valores distintos. Já, os teores de celulose estão abaixo daqueles encontrados na literatura para biomassas de milho.

5.3.2 Extração e determinação da composição química das hemiceluloses extraídas dos subprodutos

A extração das hemiceluloses dos subprodutos por método alcalino oxidativo resultou em um rendimento de 64% para o sabugo, 18% para a palha e 50% para a folha (**Tabela 10**). Assim como a composição química dos materiais lignocelulósicos, o rendimento em hemiceluloses para cada subproduto pode ser bastante variável, dependendo das condições de extração e da sua otimização. Por exemplo, no trabalho de Doner; Hicks (1997), o primeiro a relatar a extração de hemiceluloses da fibra de milho utilizando peróxido de hidrogênio, foi obtido um

rendimento máximo de 51.3%. Já, Silveira (2010) alcançou um rendimento de 40,0% na extração de xilanas de sabugo de milho, utilizando uma combinação de meio alcalino com ondas de ultra-som, e Cheng et al. (2011) obtiveram rendimento maior que 90,0% utilizando NaOH 10,0%. Como apresentado na **Tabela 10**, os teores em glicose e xilose presentes nas hemiceluloses extraídas foram similares para cada tipo de subproduto. Já, o teor de lignina residual apresentou maior variação, de 6,5 a 12,3%, sendo a maior quantidade encontrada na folha e, a menor, no sabugo. Para aplicações da xilana é interessante menores teores de lignina residual na amostra, a qual pode contribuir para aumentar da dificuldade na hidrólise do material.

Tabela 10 - Rendimento de extração e composição química das hemiceluloses extraídas dos subprodutos.

Biomassa	**Rendimento de Extração (%)**	**Composição (%, base seca)**		
		Glicose	**Xilose**	**Lignina***
Sabugo de milho	64,0 ± 1,6	17,0 ± 0,6	16,2 ± 1,4	6,5 ± 1,3
Palha de milho	18,0 ± 4,3	10,2 ± 0,7	15,0 ± 1,5	8,9 ± 0,9
Folha de milho	50,0 ± 3,2	19,7 ± 21,4	19,1 ± 4,0	12,3 ± 0,3

*Lignina: correspondente ao somatório do teor de lignina solúvel e insolúvel em ácido sulfúrico. Valores médios de triplicatas e respectivos desvios padrão.

Ainda em relação aos rendimentos finais das extrações, é interessante observar que, no trabalho de Brienzo; Siqueira; Milagres (2009), referência da metodologia de extração utilizada neste trabalho, o rendimento alcançado em hemiceluloses, a partir do bagaço de cana-de-açúcar, foi superior a 80,0%, com teores de lignina de 5,9%. Já, no trabalho de Terrone (2017), utilizando essa mesma metodologia, o rendimento em hemiceluloses, a partir do bagaço de cana-de-açúcar, foi de 60,0%, com teor de lignina de 19,8%. Tais resultados mostram que, para as biomassas lignocelulósicas utilizadas em nosso trabalho, seria necessária uma otimização das condições experimentais, a fim de se maximizar o rendimento da extração e minimizar os teores de lignina resíduais. Entretanto, é importante ressaltar que esse não foi um dos objetivos do trabalho, o qual pretendia apenas a obtenção de quantidade de xilana suficiente para a caracterização, e posterior aplicação da xilanase em estudo na sua hidrólise.

5.4 Hidrólise enzimática dos subprodutos

5.4.1 Análise da produção de XOS pelo método do ADNS

Os resultados dos ensaios de hidrólise dos subprodutos *in natura*, pelo método do ADNS, estão apresentados na **Tabela 11**. Observa-se que, nas condições aplicadas, a enzima purificada apresentou baixa capacidade de hidrólise, para as três amostras, mesmo após 24 h de reação. No entanto, é importante ressaltar que, tais resultados podem ser melhorados com a suplementação de outras enzimas como celulases, β-xilosidases e/ou arabinofuranosidases uma vez que a ação sinérgica entre tais enzimas pode ser mais eficaz no processo de hidrólise da biomassa como sugerido por Bura; Chandra; Saddler (2009), Carvalho (2017) e Terrone (2017). A enzima bruta, por sua vez, se destacou na hidrólise da palha de milho, com um rendimento em XOS, cerca de 6 vezes maior em comparação à enzima purificada. Destaca-se que, de acordo com a análise da composição química dessas biomassas (**Tabela 9**), a palha de milho foi a que apresentou o menor conteúdo em lignina e, o maior em carboidratos. Tal condição, favorece maior contato entre a enzima e seu substrato, o que, consequentemente, pode levar a maiores rendimentos finais em XOS.

Tabela 11 – Produtos da hidrólise enzimática dos subprodutos *in natura* pela xilanse bruta e purificada de *A. hortai*. Análise pelo método do ADNS.

Biomassa	**Concentração XOS (mg/mL)***	
	Enzima Bruta	**Enzima Pura**
	24h	**24h**
Sabugo de milho	0,09 ± 0,02	0,00 ± 0,00
Palha de milho	0,39 ± 0,07	0,06 ± 0,01
Folha de milho	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01

*Valores médios de duplicatas e respectivos desvios padrão.

Na **Tabela 12** são apresentados os resultados dos ensaios de hidrólise das xilanas extraídas dos subprodutos pelo método do ADNS. Nesse caso, a enzima bruta também se mostrou mais eficiente que a enzima purificada na produção de XOS, o que pode estar relacionado à presença de outras enzimas do complexo xilanolítico no filtrado enzimático bruto como, as arabinofuranosidases, que ampliam a capacidade de hidrólise dos materiais. Assim, como observado para os ensaios com as biomassas *in natura*, os maiores rendimentos em xilo-oligossacarídeos foram obtidos a partir da hidrólise do material com o menor conteúdo em

lignina, nesse caso, o sabugo de milho (**Tabela 10**), reafirmando a hipótese de que menores teores de lignina favorecem o acesso das enzimas à molécula de xilana, levando a maior rendimento final em XOS.

Tabela 12 - Produtos da hidrólise enzimática das xilanas extraídas dos subprodutos pela xilanase bruta e purificada de *A. hortai*. Análise pelo método do ADNS.

Biomassa	**Concentração XOS (mg/mL)***			
	Enzima Bruta			
	2 h	**4 h**	**6 h**	**24 h**
Sabugo de milho	0,53 ± 0,19	0,58 ± 0,15	1,24 ± 0,06	0,74 ± 0,03
Palha de milho	0,11 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,27 ± 0,15	0,41 ± 0,04
Folha de milho	0,08 ± 0,06	0,17 ± 0,03	0,36 ± 0,08	0,53 ± 0,16
Biomassa	**Enzima Pura**			
	2 h	**4 h**	**6 h**	**24 h**
Sabugo de milho	0,53 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,22 ± 0,12
Palha de milho	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,03
Folha de milho	0,03 ± 0,03	0,23 ± 0,11	0,27 ± 0,08	0,31 ± 0,03

*Valores médios de triplicatas e respectivos desvios padrão.

5.4.2 Análise da produção de XOS por CLAE

Na **Tabela 13** estão apresentados os resultados dos ensaios de hidrólise da biomassa *in natura* analisados por cromatografia liquida de alta eficiência. De modo geral, a enzima bruta se mostrou mais eficiente que a enzima pura na produção dos XOS. A hidrólise das três biomassas da indústria do milho pela enzima bruta e purifica produziu, de forma majoritária, xilopentoses e xilohexoses. A partir da hidrólise do sabugo de milho, não foram produzidos XOS com grau de polimerização menor que xilopentoses e xilohexoses; a partir da hidrólise da palha de milho foram produzidos, além de xilopentoses e xilohexoses, xilobioses e xilotrioses e, a hidrólise da folha *in natura*, produziu xilopentoses, xilohexoses e xilobioses em menor proporção.

Tabela 13 - Produtos da hidrólise enzimática dos subprodutos *in natura* pela xilanase bruta e purificada de *A. hortai*. Análise por CLAE.

Biomassa	**XOS***	**Concentração XOS (% m/m)**	
		Enzima Bruta	**Enzima Pura**
		24h	**24h**
Sabugo de milho	X_5-X_6	19,2 ± 0,9	9,3 ± 2,1
	X_4	-	-
	X_3	-	-
	X_2	-	-
Palha de milho	X_5-X_6	25,2 ± 1,5	12,6 ± 5,8
	X_4	-	-
	X_3	2,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1
	X_2	9,0 ± 2,1	-
Folha de milho	X_5-X_6	18,5 ± 1,3	0,9 ± 3,2
	X_4	-	-
	X_3	-	-
	X_2	11,5 ± 0,4	2,3 ± 0,0

*X_5-X_6: xilopentose e xiloheose, X_4: xilotetraose, X_3: xilotriose, X_2: xilobiose.

Na **Tabela 14** estão apresentados os resultados da hidrólise da xilana extraída dos subprodutos analisados por cromatografia liquida de alta eficiência. Observa-se, também, nesse caso, a produção majoritária de X_5 e X_6, como resultado da hidrólise das três biomassas pela enzima bruta e pela purificada. A enzima bruta foi mais eficiente na hidrólise das xilanas da palha e da folha enquanto a enzima pura foi mais eficiente na hidrólise do sabugo de milho.

Tabela 14 - Produtos da hidrólise enzimática das xilanas extraídas dos subprodutos pela xilanase bruta e purificada de *A. hortai*. Análise por CLAE.

Biomassa	**XOS***	**Concentração XOS (% m/m)**			
		Enzima Bruta			
		2h	**4h**	**6h**	**24h**
Sabugo de milho	X_5-X_6	65,6 ± 6,7	61,6 ± 7,0	67,6 ± 9,9	70,14 ± 8,4
	X_4	-	-	-	-
	X_3	-	6,3 ± 1,1	9,2 ± 7,7	10,3 ± 2,1
	X_2	-	9,4 ± 6,6	11,3 ± 6,8	14,4 ± 7,7
Palha de milho	X_5-X_6	76,3 ± 3,9	78,6 ± 7,8	86,7 ± 5,7	89,4 ± 3,2
	X_4	-	-	-	-
	X_3	-	-	-	-
	X_2	-	-	-	-
Folha de milho	X_5-X_6	62,27 ± 3,5	65,5 ± 7,6	71,81 ± 9,0	70,45 ± 3,9
	X_4	-	-	-	3,20 ± 0,8
	X_3	-	4,3 ± 1,4	2,3 ± 0,4	0,89 ± 0,0
	X_2	2,3 ± 0,4	11,9 ± 8,2	14,9 ± 5,4	19,7 ± 4,3
Biomassa	**XOS***	**Enzima Pura**			
		2h	**4h**	**6h**	**24h**
Sabugo de milho	X_5-X_6	83,5 ± 6,7	73,8 ± 10,1	68,2 ± 9,6	82,7 ± 8,1
	X_4	-	2,8 ± 1,2	-	-
	X_3	3,8 ± 1,1	3,5 ± 1,5	6,89 ± 7,1	6,2 ± 0,6
	X_2	-	-	1,2 ± 1,0	0,9 ± 0,0
Palha de milho	X_5-X_6	65,3 ± 6,6	68,9 ± 9,6	72,4 ± 7,0	76,9 ± 5,2
	X_4	-	-	-	-
	X_3	-	-	-	-
	X_2	-	-	-	-
Folha de milho	X_5-X_6	51,0 ± 7,9	54,7 ± 4,3	62,5 ± 6,4	50,9 ± 9,7
	X_4	2,98 ± 0,3	4,47 ± 1,3	4,25 ± 0,7	2,3 ± 0,4
	X_3	-	0,79 ± 0,0	1,0 ± 0,3	1,9 ± 1,0
	X_2	-	-	-	-

*X_5-X_6: xilopentose e xiloheose, X_4: xilotetraose, X_3: xilotriose, X_2: xilobiose.

Por fim, vale ressaltar que, assim como no trabalho de Kocabas; Guder; Ozben (2015), no qual um aumento de aproximadamente 100% no rendimento em açúcares redutores foi alcançado apenas com o aumento de 20 °C na temperatura de hidrólise, novos testes são necessários para a otimização do processo de hidrólise, a fim de se alcançar melhores resultados.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a principal endoxilanase produzida por fermentação sólida de sabugo de milho por uma linhagem de *Aspergillus hortai* foi purificada, caracterizada tanto na forma bruta quanto purificada, e aplicada, também em ambas as formas, na hidrólise de alguns subprodutos lignocelulósicos da indústria do milho.

A purificação da xilanase foi alcançada após três etapas cromatográficas, sendo sua massa molecular aparente estimada entre 14,8 e 25,0 kDa por exclusão molecular e SDS-PAGE, respectivamente.

A enzima, tanto bruta quanto purificada destacou-se pelo seu comportamento halotolerante a até 4,0 M de NaCl, o que a torna interessante para a aplicação em processos conduzidos sob elevada salinidade, como na hidrólise de biomassas marinhas ou daquelas submetidas a pré-tratamento alcalino.

O seu comportamento em resposta a variações do pH e da temperatura permite, também, a sua aplicação em processos como os de biopurga de fibras têxteis e de sacarificação de biomassas lignocelulósicas.

A sua maior afinidade por xilanas e a produção exclusiva de xilo-oligossacarídeos como produtos da hidrólise da hemicelulose, associadas à ausência de atividades celulase e β-xilosidase a torna, ainda, interessante para a aplicação em processos voltados à produção de xilo-oligossacarídeos.

Os ensaios de hidrólise dos subprodutos mostraram que a enzima bruta foi mais eficiente que a purificada, tendo sido obtidos os melhores resultados com a hidrólise da palha na forma *in natura* e da xilana extraída do sabugo de milho. Contudo, a xilanase purificada foi ais eficaz na hidrólise da hemicelulose extraída do sabugo de milho. Deve-se, no entanto, levar em conta que tais resultados podem ser maximizados com a otimização do processo de aplicação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SATER, M. A.; EL-SAID, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 1, p. 15-21, 2001.

ABIB – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DA BIOMASSA. **Inventário residual Brasil**. 2011. Disponível em: <http://pt.calameo.com/accounts/200968>. Acesso em: 05 jul. 2016.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AHMAD, Z.; BUTT, M.S.; AHMED, A.; RIAZ, M.; SABIR, S.M.; FAROOQ, U.; REHMAN, F.U. Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 10, p. 2445-2453, 2014.

AHUJA, S. K.; FERREIRA, G. M.; MOREIRA, A. R. Utilization of enzymes for environmental applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 24, p. 125–154, 2004.

AKHTAR, N.; GUPTA, K.; GOYAL, D.; GOYAL, A. Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass**. Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 35, n. 2, 2016.

ALFENAS, G. P. A.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 44-49, 2015.

ALI, Z.; ANWAR, M.; IRSHAD, S.; MUKHTAR, N. T.; WARRAICH. Bio-synthesis of citric acid from single and co-culture-based fermentation technology using agro-wastes. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 57-62, 2016

ÁLVAREZ, C.; REYES-SOSA, F. M.; DÍEZ, B. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 149-156, 2016.

AMARASEKARA, A. S. Feedstocks for cellulosic ethanol production. In:_____. **Handbook of cellulosic ethanol**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2014. 608 p.

AN, J.; XIE, Y.; ZHANG, Y.; TIAN, D.; WANG, S.; YANG, G.; FENG, Y. Characterization of a thermostable, specific GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii* with high catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 117, p. 13-20, 2015.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.

AZARPIRA, A.; RALPH, J.; LU, F. Catalytic alkaline oxidation of lignin and its model compounds: a pathway to aromatic biochemicals. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 1, p. 78-86, 2014.

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

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification, characterization, gene cloning and expression of GH-10 xylanase (*Penicillium citrinum* isolate HZN13). **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 169, 2016.

BAILEY, M. J., BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.

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

BAJPAI, P. Biobleaching. In:_____. **Biotechnology for pulp and paper processing**. 2th ed. Springer Science & Business Media, 2011. 414 p.

BAJPAI, P. Microbial xylanolitic enzyme system: properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 43, p. 141-194, 1997.

BAKALOVA, N. G.; PETROVA, S. D.; BENADOVA, S. R.; ATEV, A. P.; KOLEV, D. N. Purification and characterization of two endo-1,4-β-xylanases from *Aspergillus Awamori* K-1. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 16, n. 1, p. 91-97, 2002.

BANSOD, S. M.; DATTA-CHOUDHARY, M.; SRINIVASAN, M. C.; RELE, M. V. Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium* species. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 965-970, 1993.

BARTEN, T. J. **Evaluation and prediction of corn stover biomass and composition from commercially available corn hybrids**. 143 f. Tese (Doutorado em Produção e Fisiologia de grãos) – IOWA State University, 2013.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 353-368, 1992.

BATTAN, B.; DHIMAN, S. S.; AHLAWAT, S.; MAHAJAN, R.; SHARMA, J. Application of thermostable xylanase of *Bacillus pumilus* in textile processing. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 222-229, 2011.

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

BENEDETTI, A. C. E. P.; COSTA, E. D.; ARAGON, C. C. SANTOS, A. F.; GOULART, A. J.; ATILI-ANGELIS, D.; MONTI, R. Low-cost carbon sources for the production of a thermostable xylanase by *Aspergillus niger*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 25-31, 2013.

BHALLA, A.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. Highly thermostable xylanase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. strain WSUCF1 utilizing lignocellulosic biomass. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.3, n. 84, 2015.

BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 751-759, 2013.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

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

BIELY, P.; MARKOVIC, O.; MISLOVICOVÁ, D. Sensitive detection of endo-1,4-β-glucanases and endo-1,4-β-xylanases in gels. **Analytical Biochemistry**, v. 144, n. 1, p. 147-151, 1985.

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

BIELY, P.; PUCART, V.; STRINGER, M. A.; MØRKEBERG KROGH, K. B. *Trichoderma reesei* XYN VI - a novel appendage-dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 17, p. 3894-3903, 2014.

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

BRASIL (Distrito Federal). Ministério do Meio Ambiente. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília, 2011. 268p. (Caderno diagnósticos – Resíduos Agrosilvopastoris I. Disponível em: <http://www.cnrh.gov.br/projetos/pnrs/documentos/cadernos/08_CADDIAG_Res_Agrosilvopastoril_Org.pdf >. Acesso em: 05 jul. 2017.

BRASIL. Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência de República. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília, 2012. 129 p. (IPEA Relatório de Pesquisa). Disponível em: <http://www.cnrh.gov.br/projetos/pnrs/documentos/cadernos/08_CADDIAG_Res_Agrosilvopastoril_Org.pdf >. Acesso em: 06 set. 2017.

BRIDGWATER, A. V. Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. **Biomass and Bioenergy**, v. 38, p. 68-94, 2012.

BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilo-oligossacarideos**. 2010. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

BRIENZO, M.; CARVALHO, A. F. A.; FIGUEIREDO, F. C.; OLIVA NETO, P. Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. Food Waste: Practices, Management and Challenges. 1th ed. New York: Nova Science Publishers, 2016, p. 155-188.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1195-1205, 2010.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

BRIJILALL, N.; MANIMARAN, A. KUMAR, K. S.; PERMAUL, K.; SINGH, S. High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* NC38 in a 5 L fermenter and its efficiency in biobleaching of bagasse pulp. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9723-9729, 2011.

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Research**, 2011.

BURA, R.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, 2009.

CARLI, S. **Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola***. 2016. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

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

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

CARVALHO, D. R. **Purificação e caracterização de uma β-xilosidase halotolerantes de *Colletotrichum graminicola***. 2017. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

CASAS, G.A.; STEIN, H. H. Effects of microbial xylanase on digestibility of dry matter, organic matter, neutral detergent fiber, and energy and the concentrations of digestible and metabolizable energy in rice coproducts fed to weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 5, p. 1933-1939, 2016.

CASTIGLIONI, G, L.; STANESCU, G.; ROCHA, L. A. O.; COSTA, J. A. V. Analytical modeling and numerical optimization of the biosurfactants production in solid-state fermentation by *Aspergillus fumigatus*. **Acta Scientiarum**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2014.

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, n. 6, p. 1085-1093, 2015.

CAZYPEDIA. **Glycoside Hydrolase Families**, 2016. Disponível em: < https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Families>. Acesso em: 20 set. 2017.

CHANG, X.; XU, B.; BAI, Y.; LUO, H.; MA, R.; SHI, P.; YAO, B. Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris.* **PloS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.

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

CHAVEZ, R.; SCHACHTER, K.; NAVARRO, C.; PEIRANO, A.; AGUIRRE, C.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. Differences in expression of two endoxylanase genes (xynA and xynB) from *Penicillium purpurogenum*. **Gene**, v. 293, n. 1–2, p. 161-168, 2002.

CHEN, G. G.; MING, X.; GUAN, Y.; PENG, F.; YAO, C. L.; SUN, R. C. High strength hemicellulose-based nanocomposite film for food packaging applications. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 4, p. 1985-1993, 2016.

CHEN, H. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In: _____. **Biotechnology of lignocellulose**: theory and practice. 1th ed.: Netherlands: Springer Netherlands, 2014. 510 p.

CHEN, H.; WANG, L. Pretreatments strategies for biochemical conversion of biomass. In:_____. **Technologies for biochemical conversion of biomass**. 1th ed. Academic Press, 2016. 284 p.

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

CHENG, H.; ZHAN, H.; FU, S.; LUCIA, L. A. Alkali extraction of hemicellulose from depithed corn stover and effects on soda-AQ pulping. **BioResources**, v. 6, n. 1, 2011.

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

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. I. Amorphous celulose: structure and characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, p. 13-21, 2011.

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

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v. 3, n. 3, p. 1-74, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_portugues_-3o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em: 01 set. 2017.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, A. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

DAI, X. J.; LIU, M. Q.; JIN, H. X.; MING, M. Y. Optimisation of solid-state fermentation of *Aspergillus niger* jl-15 for xylanase production and xylooligosaccharides preparation. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. 5, p. 557-567, 2011.

DAMM, T.; COMMANDEUR, U.; FISCHER, R.; USADEL, B.; KLOSE, H. Improving the utilization of lignocellulosic biomass by polysaccharide modification. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 288-296, 2016.

DAS, R. K.; BRAR, S. K.; VERMA, M. A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* 1526 utilizing apple industry waste biomass. **Fungal Biology**, v. 119, n. 12, p. 1279-1290, 2015.

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

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

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

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

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 65, p. 497-522, 2001.

DHYANI, V.; BHASKAR, T. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**, doi: 10.1016/j.renene.2017.04.035, 2017.

DIAZ, A. B.; BLANDINO, A.; WEBB, C.; CAROL, I. Modelling of different enzyme productions by solid-state fermentation on several agro-industrial residues. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9555-9566, 2016.

DINAND, E.; VIGNON, M. R. Isolation and characterization of a (4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylan from sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 330, p. 285-288, 2001.

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

DONER, L. W.; HICKS, K. B. Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 176-181, 1997.

DRISS, D.; BHIRI, F.; SIELA, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Purification and properties of a thermostable xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 851-863, 2012.

DUMON, C.; SONG, L.; BOZONNET, S.; FAURÉ, R.; O'DONOHUE, M. J. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 346-357, 2012.

DURSUN, D.; DALGIÇ, A. C. Optimization of astaxanthin pigment bioprocessing by four different yeast species using wheat wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7 p. 1-6, 2016.

DUTRA, E. D.; SANTOS, F. A.; ALENCAR, B. R. A.; REIS, A. L. S.; SOUZA, F. R. F.; AQUINO, K. A. S.; MORAIS, M. A.; MENEZES, R. S. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-10, 2017.

EL-HADI, A. A.; EL-NOUR, S. A.; HAMMAD, ALI.; KAMEL, Z.; ANWAR, M. Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai.* **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 23-28, 2014.

ESCLAPEZ, J.; PIRE, C.; BAUTISTA, V.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, R. M.; FERRER, J.; BONETE, M. J. Analysis of acidic surface of *Haloferax mediterranei* glucose dehydrogenase by site-directed mutagenesis. **FEBS Letters**, v. 581, n. 5, p. 837-842, 2007.

ETHAIB, S.; OMAR, R.; KAMAL, S. M. M.; BIAK, D. R. A. Microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Journal of Engineering Science and Technology**, v. 2, p. 97-109, 2015.

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; REIS, R. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 3, p. 347-355, 2011.

FAN, G.; YANG, S.; YAN, Q.; GUO, Y.; LI, Y.; JIANG, Z. Characterization of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from *Malbranchea cinnamomea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 482-489, 2014.

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

FONTANA, J. D.; GEABRARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JOHNSON, G. K. α-4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in enzymology**, n. 160, p. 560-571, 1988.

FOUGERE, D.; NANDA, S.; CLARKE, K.; KOZINSKI, J. A.; LI, K. Effect of acidic pretreatment on the chemistry and distribution of lignin in aspen wood and wheat straw substrates. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 56-68, 2016.

FUKUCHI, S.; NISHIKAWA, K. Protein surface aminoacid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 835-843, 2001.

FUKUCHI, S.; YOSHIMUNE, K.; WAKAYAMA, M.; MORIGUCHI, M.; NISHIKAWA K. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, n.2, p. 347–357, 2003.

GALLARDO, O.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; VALLS, C.; VALENZUELA, S. V.; RONCERO, M. B.; VIDAL, T.; DÍAZ, P.; PASTOR, F. I. J. characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6290-6294, 2010.

GARCÍA-TORREIRO, M.; PALLIN, M. A.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T. A.; LEMA, J. M. Alkali treatment of fungal pretreated wheat straw for bioethanol production. **Bioethanol**, v. 2 p. 32-43, 2016.

GE HEALTHCARE. **Protein Characterization using size exclusion chromatography**. Questions and answers from live sessions. Disponível em: <http://proteins.gelifesciences.com/~/media/images/protein-blog-and-news/protein-skills-blog/qanda-sec-webinar-protein-characterization.pdf?la=en>. Acesso em: 16 out. 2017.

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

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.

GOMES, J.; STEINER, W. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 223–235, 2004.

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

GOULD, J. M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 1, p. 46-52, 1984.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 225-231, 1985.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-22, 2008.

GRAY, K. A.; ZHAO, L. S.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GRAY, M. K. **Alkaline hydrogen peroxide pretreatment for its use in an on-farm bioprocessing facility**. 178 f. Tese (Mestrado em Biosistemas e Engenharia Agrícola) – Universidade de Kentucky, Lexington, 2013.

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

GUO, B.; LI, P. Y.; YUE, Y. S.; ZHAO, H. L.; DONG, S.; SONG, X. Y.; SUN, C. Y.; ZHANG, W. X.; CHEN, X. L.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Gene cloning, expression and characterization of a novel xylanase from the marine bacterium, *Glaciecola mesophila* KMM241. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1173-1187, 2013.

GUPTA, M. N. Thermostabilization of proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 14, p. 1-11, 1991.

GUPTA, S.; SHARMA, P.; DEV, K.; SOURIRAJAN, A. Halophilic bacteria of Lunsu produce an array of industrially important enzymes with salt tolerant activity. **Biochemistry Research International**, v. 2016, 10 p. 2016.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar**: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol. 2010. 315 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HEINZE, S.; MECHELKE, M.; KORNBERGER, P.; LIEBL, W.; SCHWARZ, W. H.; ZVERLOV, V. V. Identification of endoxylanase XynE from *Clostridium thermocellum* as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. **Scientific Reports**, v. 7, n. 11178, 2017.

HEINZE, T.; DAUS, S. Xylan and xilan derivates: basis of functional polymers for the future. In: WILLIAMS, P. **Renewable resources for functional polymers and biomaterials**: polysaccharides, proteins and polyesters. London: Royal Society of Chemistry, 2015. 466 p.

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

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and longterm. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HARMSEN, P. F. H.; HUIJGEN, W. J. J.; BERMUDÉZ LOPÉZ, L. M.; BAKKER, R. R. C. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. 2010. Disponível em: <https://www.ecn.nl/docs/library/report/2010/e10013.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2017.

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

HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 1, p. 88-107, 2009.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v 8, n. 3, p. 301–306, 2005.

HORITA, M.; KITAMOTO, H.; KAWAIDE, T.; TACHIBANA, Y.; SHINOZAKI, Y. On-farm solid state simultaneous saccharification and fermentation of whole crop forage rice in wrapped round bale for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 9, 2015.

IPEA - INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília, 2012 (Relatório de Pesquisa). Disponível em: http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917_relatorio_residuos_organicos.pdf. Acesso em: 05 set. 2015.

IRANMAHBOOB, J.; NADIM, F.; MONEMI, S. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. **Biomass and Bioenergy**, v. 22, n. 5, p. 401–404, 2002.

ISHIHARA, M.; NOJIRI, M.; HAYASHI, N. NISHIMURA, T.; SHIMIZU, K. Screening of fungal xylanases for production of acidic xylooligosaccharides using in situ reduced 4-O-methylglucuronoxylanas substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 170-175, 1997.

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

JEYA, M.; THIAGARAJAN, S.; LEE, J. K.; GUNASEKARAN, P. Identification of new GH 10 and GH 11 xylanase genes from *Aspergillus versicolor* MKU3 by genome-walking PCR. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 13, 2009.

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

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategie for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell wall. **Biotechnology Progress**, v. 7, p. 1-15, 1992.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219-1227, 2012.

KABEL, M. A.; CARVALHEIRO, F.; GARROTE, G.; AVGERINOS, E.; KOUKIOS, E.; PARAJÓ, J. C.; GÍRIO, F. M.; SCHOLS, A. G. J.; VORAGEN, A. G. J. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-olygossacharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 47-56, 2002.

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

KAPILAN, R. Solid state fermentation for microbial products: a review. **Archives of Applied Science Research**, v. 7, n. 8, p. 21-25, 2015.

KAPOOR, M.; PANWAR, D. KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agro-industrial wastes: technical challenges and commercialization potential. In: DHILLON, G. S.; KAUR, S. **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. Alberta: Academic Press, 2016. 32 p.

KARAN, R.; CAPES, M. D.; DASSARMA, S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. **Aquatic Biossystems**, v. 8, n. 4, 2012.

KERSTERS-HILDERSON, H.; CLAEYSSENS, M.; DOORSALER, E. V.; SAMAN, E.; DE BRUYNE, C. K. β-d-xylosidase from *Baccilus pumilus.* **Methods in Enzymology**, v. 83, p. 631-639, 1982.

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

KIM, D. Y.; LEE, S. H.; LEE, M. J.; CHO, H. Y.; LEE, J. S.; RHEE, Y. H.; SHIN, D. H.; SON, K. H.; PARK, H. Y. Genetic and functional characterization of a novel GH10 endo-β-1,4-xylanase with a ricin-type β-trefoil domain-like domain from *Luteimicrobium xylanilyticum* HY-24**. International Journal of Biological Macromolecules**. 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017317361?via%3Dihub>. Acesso em: 15 set. 2017.

KIM, H. M.; LEE, K. H.; KIM, K. H.; LEE, D. S.; NGUYEN, Q. A.; BAE, H. J. Efficient function and characterization of GH10 xylanase (Xyl10g) from *Gloeophyllum trabeum* in lignocellulose degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 172, p. 38-45, 2014.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42-48, 2016.

KIM, S. K.; CHUNG, D.; HIMMEL, M. E.; BOMBLE, Y. J.; WESTPHELING, J. Heterologous expression of family 10 xylanases from *Acidothermus cellulolyticus* enhances the exoproteome of *Caldicellulosiruptor bescii* and growth on xylan substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 176, 2016.

KOCABAS, D. S.; GUDER, S.; OZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 115, p. 66-75, 2015.

KOPPRAM, R.; TOMAS-PEJ́O, E.; XIROS, C.; OLSSON, L. Ligno-cellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trend in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 46–53, 2014.

KRIEGER, N.; CAMILIOS-NETO, D.; MITCHELL, D. A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. **Biosurfactants**, v. 672, p. 203-210, 2010.

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

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems: an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

KUI, H.; LUO, H.; SHI, P.; BAI, Y.; YUAN, T.; WANG, Y.; DONG, S.; YAO, B. Gene cloning, expression, and characterization of a thermostable xylanase from *Nesterenkonia xinjiangensis* CCTCC AA001025. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 953-965, 2010.

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

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.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, 2017.

KUMAR, D.; KUMAR, S. S.; KUMAR, J.; MALYAN, S. K. Xylanases and their industrial applications: a review. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 17, n. 1, p. 353-360, 2017.

KUMAR, G. P.; PUSHPA, A.; PRABHA, H. A review on xylooligosaccharides. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n.8, 2012.

KUMAR, S.; ARUMUGAM, N.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Thermostable Enzymes and their Industrial Application. In: SHUKLA, P. **Microbial Biotechology**: an interdisciplinary approach. New York: CRC Press, 2017. 378 p.

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

LANGERON, M. Sur un champignon d'une otomycose Bresilienne *Sterigmatocysts hortai*. ***Bulletin de la Societe Pathologie Exotique***, v. 15, p. 383–384, 1922.

LEE, C. C.; KIBBLEWHITE-ACCINELLI, R. E.; WAGSCHAL, K.; ROBERTSON, G. H.; WONG, D. W. S. Cloning and characterization of a cold-active xylanase enzyme from an environmental DNA library. **Extremophiles**, v. 10, p. 295–300, 2006.

LEE, J. M.; KIM, Y. R.; KIM, J. K.; JEONG, G. T.; HA, J. C.; KONG, I. S. Characterization of salt-tolerant β-glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from *Bacillus* sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional korean fermented seafood. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 7, p. 1335-1346, 2015.

LENIHAN, P.; OROZCO, A. M.; O'NEILL, E.; AHMAD, M. N. M.; ROONEY, D.; WALKER, G. M. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 395-403, 2010.

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

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

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the Americam Chemistry Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptide in solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 8, p. 657–661, 1999.

LIU, J.; ZHANG, C.; XU, D. QM/MM study of catalytic mechanism of xylanase Cex from *Cellulomonas fimi*. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 37, p. 67-76, 2012.

LIU, L.; PHILIP YE, X.; WOMAC, A. R.; SOKHANSANJ. Variability of biomass chemical composition and rapid analysis using FT-NIR techniques. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 820-829, 2010.

LIU, X.; HUANG, Z.; ZHANG, X.; SHAO, Z.; LIU, Z. Cloning, expression and characterization of a novel cold-active and halophilic xylanase from *Zunongwangia profunda*. **Extremophiles**, v. 18, p. 441-450, 2014.

LIU, Z. H.; CHEN, H. Z. Biomass-water interaction and its correlations with enzymatic hydrolysis of steam exploded corn stover. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 3, p. 1274–1285, 2016.

LI, Z.; CHEN, C. H.; HEGG, E. L.; HODGE, D. B. Rapid and effective oxidative pretreatment of woody biomass at mild reaction conditions and low oxidant loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 119, 2013.

LOPES, A. M.; VALERI, D.; PESSOA-JUNIOR, A. Comparison of kinetic characteristics of xylanases from *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. with pH and temperature baking process parameters. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 19, p. 2640-2645, 2013.

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

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.

MAHILRAJAN, S.; BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V. Screening and identification of a thermophilic and alkalophilic bacterium producing xylanase. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 1, p. 242-250, 2012.

MAI, H. T. N.; LEE, K. M.; CHOI, S. S. Enhanced oxalic acid production from corncob by a methanol-resistant strain of *Aspergillus niger* using semi solid-sate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 9-15, 2016.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, M. B.; NAGEM, R. A. P.; VRIES, R. P.; GUIMARÃES, V. M. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus Nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 60-67, 2016.

MANRICH, A. **Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadase estabilizadas**. 2012. 103 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

MARIANO, M.; KISSI, N. E.; DUFRESNE, A. Cellulose nanocrystals and related nanocomposites: review of some properties and challenges. **Journal of Polymer Science**, v. 52, n. 12, p. 791-806, 2014.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; MARCET, M.; GARCÍA, L.; HERNÁNDEZ, E.; THOMSEN, A. B. Study of the phenolic compounds formed during pretreatment of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion. **Holzforschung**, v. 61, n. 5, p. 483-487, 2007.

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, n. 3, p. 365-373, 2011.

MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 597-609, 2015.

MCCANN, M. C.; CARPITA, N. C. Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property. ***Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4109-4118, 2015.*

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: **ACS symposium series (USA)**, v. 566, p. 292-324, 1994.

MENON, V.; PRAKASH, G.; RAO, M. Value added products from hemicellulose: Biotechnological perspective. **Global Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 36-67, 2010.

MIAO, C.; HAMAD, W. Y. Cellulose reinforced polymer composites and nanocomposites: a critical review. **Cellulose**, v. 20, p. 2221-2262, 2013.

MIAO, Y.; LI, J.; XIAO, Z.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Characterization and identification of the xylanolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* Z5. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 126, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

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

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings: a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.

MONSOUR, A. A.; ARNAUD, T.; LU-CHAU, T. A.; FDZ-POLANCO, M.; MOREIRA, M. T.; RIVERO, J. A. C. Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 1, p. 31-46, 2016.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. S.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 27, p. 77-93, 2013.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reiews**, v. 40, p. 3941-3994, 2011.

MORENO, M. L.; PÉREZ, D.; GARCÍA, M. T.; MELLADO, E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. **Life (Basel)**, v. 3, n. 1, 2013.

MOURTZINIS, S.; CENTRELL, K. B.; ARRIAGA, F. J.; BALKCOM, K. S.; NOVAK, J. M.; FREDERICK, J. R.; KARLEN, D. L. Carbohydrate and nutrient composition of corn stover from three southeastern USA locations. **Biomass and bioenergy**, v. 85, p. 153-158, 2016.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V. K. Enzymatic clarification of fruit juices (apple, pineapple, and tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 16, p. 1165-1175, 2012.

NASCIMENTO, J. M. F. **Produção, purificação, propriedades bioquímicas e aplicação de xilanases de *Aspergillus hortae***. 2017. 120 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: Princípios de Bioquímica. 5. ed. São Paulo: Elsevier, 2011. 1304 p.

NIGAM, D.; ASTHANA, M.; KUMAR, A. *Penicillium*: a fungus in the wine and beer industries. In: GUPTA, V. G.; RODRIGUEZ-COUTO, S. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**: *Penicillium* systems properties and applications. Elsevier, 2017. 474 p.

PAES, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanase: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564–592, 2012.

PAI, C. K.; WU, Z. Y.; CHEN, M. J.; ZENG, Y. F.; CHEN, J. W.; DUAN, C. H.; LI, M. L.; LIU, J. R. Molecular cloning and characterization of a bifunctional xylanolytic enzyme from *Neocallimastix patriciarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1451-1462, 2010.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 879-887, 2011.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

PASSARINHO, A. T. P. **Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene xyna de *orpinomyces* pc-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de sucos.** 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

PAUL, S.; BAG, S. K.; DAS, S.; HARVILL, E. T.; DUTTA, C. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. **Genome Biology**, v. 9, n. 4, 2008.

PENG, F.; REN, J. L.; XU, F.; SUN, R. C. Chemicals from hemicelluloses: a review. In: ZHU, J.; ZHANG, X.; PAN, X. **Sustainable production of fuels, chemical and fibers from forest biomass**. United States: OUP, 2011. 536 p.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 701-720, 2014.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 928-939, 2015.

PÉREZ, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of protein and metabolites by yeast grown in solid state fermentation: present status and perspectives. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1224–1231, 2016.

PETZOLD-WELCKE, K.; SCHWIKAL, K.; DAUS, S.; HEINZE, T. Xylan derivatives and their application potential - mini-review of own results. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, n. 16, p. 80-88, 2014.

POINTNER, M.; KUTTNER, P.; OBRLIK, T.; JAGER, A.; KAHR, H. Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. **Agronomy Research**, v. 12, n. 2, p. 391-396, 2014.

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

POOVAIAH, C. R.; NAGESWARA-RAO, M.; SONEJI, J. R.; BAXTER, H. L.; STEWART, C. N. Altered lignin biosynthesis using biotechnology to improve lignocellulosic biofuel feedstocks. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 9, p. 1163-1173, 2014.

PULIGUNDLA, P.; OH, S. E.; MOK, C. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: a review. **Carbon Letters**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2016.

PUTRO, J. N.; SOETAREDJO, F. E.; LIN, S. Y.; JU, Y. H.; ISMADJI, S. Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. **RSC Advances**, v. 6, n. 52, p. 46834-46852, 2016.

QING, Q.; LI, H.; KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Xylooligosaccharides production, quantification, and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment. In: WYMAN, C. E. **Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals**. 1th. ed. Chichester: John Willey & Sons, 2013.

QUIROZ, R. D. C.; ROUSSOS, S.; HERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, R.; CASTILLO, F.; AGUILAR, C. N. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. **Critical Reviews in Biotechnolology**, v. 35, n. 3, p. 326–333, 2015.

QURESHI, N.; MANDERSON, G. J. Bioconversion of renewable resources into ethanol: an economic evaluation of selected hydrolysis, fermentation, and membrane technologies. **Energy Sources**, v. 17, n. 2, p. 241-265, 1995.

RAGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M. F.; DAVISON, B. H.; DIXON, R. A.; GILNA, P.; KELLER, M.; LANGAN, P.; NASKAR, A. K.; SADDLER, J. N.; TSCHAPLINSKI, T. J.; TUSKAN, G. A.; WYMAN, C. E. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 1246843, 2014.

RAIMBAULT, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1-15, 1998.

RAJ, K. C.; CHANDRA, T. S. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 457-461, 1996.

RANJAN, A.; SINGH, S.; MALANI, R. S.; MOHOLKAR, V. S. Ultrasound-assisted bioalcohol synthesis: review and analysis. **RSC Advances**, v. 6, p. 65541-65562, 2016.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. **The genus Aspergillus**, 1965.

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

RAVICHANDRA, K.; YASWANTH, V. V. N.; NIKHILA, B.; AHMAD, J.; RAO, P. S.; UMA, A.; PRAKASHAM, R. S. Xylanase Production by Isolated Fungal Strain, *Aspergillus fumigatus* RSP-8 (MTCC 12039): Impact of agro-industrial material as substrate. **Sugar Tech**, v. 18, n. 1, p. 29-38, 2016.

REDDY, P. A critical review of ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **South African Journal of Science**, v. 111, n. 22, p. 1-9, 2015.

REDDY, S. S; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude β-xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 237-245, 2016.

REINOSO, F. A. M. **Aplicação de uma mistura de enzimas para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 54, 2011.

RIBEIRO, L. F. C.; DE LUCAS, R. C.; VITCOSQUE, G. L.; RIBEIRO, L. F.; WARD, R. J.; RUBIO, M. V.; DAMÁSIO, A. R. L.; SQUINA, F. M.; GREGORY, R. C.; WALTON, P. H.; JORGE, J. A.; PRADE, R. A.; BUCKERIDGE, M. S.; POLIZELI, M. L. T. M. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 115, 2014.

RIES, L. N.; BEATTIE, S. R.; ESPESO, E. A.; CRAMER, R. A.; GOLDMAN, G. H. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 203, n. 1, p. 335-352, 2016.

ROY, S.; DUTTA, T.; SARKAR, T. S.; GHOSH, S. Novel xylanases from *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604: comparative analysis of production, purification and characterization of enzyme from submerged and solid-state fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover for enzymatic saccharification and ethanol production. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 34-41, 2014

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 816-822, 2005.

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, n. 4, p. 337-353, 2014.

SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S.; BHATTI, M. S. Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with *Aspergillus awamori* MTCC-548. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, n. 3, p. 148-157, 2016.

SAMSON, R. A.; PETERSON, S. W.; FRISVAD, J.; VARGA, J. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in Mycology**. v. 69, n. 1, p. 39-55, 2011.

SAMSON, A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.; KLAASEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus.* **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Physicochemical properties of edible seed hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

SCHIRALDI, C.; ROSA, M. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n.12, 2002.

SCHMIDT, A.; SCHLACHER, A.; STEINER, W.; SCHWAB, H.; KRATKY, C. Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*. **Protein Science**, v. 7, p. 2081-2088, 1998.

SCOPES, R. K. Optimization of Procedures; Final Steps. In:_____. **Protein purification**: principles and practice. 3. ed. New York: SpringerVerlag, 1994. 380 p.

SEGURA, B. G.; DURAND, R.; FÈVRE, M. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 164, n. 1, p. 47–53, 1998.

SELIG, M. J.; VINZANT, J. B.; HIMMEL, M. E.; DECKER, S. R. The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, n. 1-3, p. 397-406, 2009.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1763-1771, 2005.

SHANKAR, S.; GUPTA, M. Microbial xylanases: production, applications and challenges. In: GUPTA, V. K.; SHARMA, G. D.; TUOHY, M. G.; GAUR, R. **The Handbook of Microbial Bioresources**. CABI, 2016. 720 p.

SHAO, W.; DEBLOIS, S.; WIEGEL, J. A high-molecular-weight, cell-associated xylanase isolated from exponentially growing *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 937-940, 1995.

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

SHI, Q. Q.; SUN, J.; YU, H. L.; LI, C. X.; BAO, J.; XU, J. H. Catalytic performance of corn stover hydrolysis by a new isolate *Penicillium* sp. ECU0913 producing both cellulase and xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 819-830, 2011.

SIDIRAS, D. K.; SALAPA, I. S. Organosolv pretreatment as a major step of lignocellulosic biomass refining. **ECI Digital Archives**. 2015. Disponível em: <http://dc.engconfintl.org/cgi/viewcontent.cgi?article=1013&context=biorefinery_I>. Acesso em: 30 ago. 2017.

SIGMA-ALDRICH. **Products Catalog**. Disponível em: <www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma>. Acesso em: 16 set. 2017.

SILVA, A. C.; QUEIROZ, A. E. S. F.; CORREIAB, P. C.; BRANDÃO-COSTA, R.; MOREIRA, K. A.; PORTO, A. L. F.; MEDEIROS, E. V. Production and characterization of xylanase from *Aspergillus parasiticus* URM 5963 isolated from soil of caatinga. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 2, 2016.

SILVA, J. C.; OLIVEIRA, R. C.; NETO, A. S.; PIMENTEL, V. C.; SANTOS, A. A. Extraction, addition and characterization of hemicelluloses from corn cobs to development of paper properties. **Procedia Materials Science**, v. 8, p. 793-801, 2015.

SILVA, L. G. M. **Biopurga de malha de algodão utilizando processo enzimático com associação de enzimas**. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

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.

SILVEIRA, R. L.; STOYANOV, S. R.; GUSAROV, S.; SKAF, M. S.; KOVALENKO, A. Plant biomass recalcitrance: effect of hemicellulose composition on nanoscale forces that control cell wall strength. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 19048-19051, 2013.

SIMPSON, H. D.; HAUFLER, U. R.; DANIEL, R. M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium Thermotoga. **Biochemical Journal**, v. 15, n. 277, p. 413-417, 1991.

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

SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 624-631, 2015.

SINGH, R. K.; TIWARI, M. K.; KIM, D.; KANG, Y. C.; RAMACHANDRAN, P.; LEE, J. K. Molecular cloning and characterization of a GH11 endoxylanase from *Chaetomium globosum*, and its use in enzymatic pretreatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7205-7214, 2013.

SINMA, K.; KHUCHAROENPHAISAN, K.; KITPREECHAVANICH, V.; TOKUYAMA, S. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Saccharopolyspora pathumthaniensis* S582 isolated from the gut of a termite. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 10, p. 1957-1963, 2011.

SKROPETA, D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p.2645-2653, 2009.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. National Renewable Energy Laboratory: Laboratory Analytical Procedure. 2012. Disponível em: <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>. Acesso em: 22 set. 2017.

SMAIL, T.; SALHI, O.; KNAPP, J. S. Solid state fermentation of carob pods by *Aspergillus niger* for protein production-effect of particle size. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 171-173, 1995.

SOUZA, A. R.; ARAÚJO, G. C.; ZANPHORLIN, L. M.; RULLER, R.; FRANCO, F. C.; TORRES, F. A. G.; MERTENS, J. A.; BOWMAN, M. J.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Engineering increased thermostability in the GH-10 *endo*-1,4-β-xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 20-26, 2016.

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

SRIDEVI, A.; SANDHYA, A.; RAMANJANEYULU, G.; NARASIMHA, G.; DEVI, P. S. Biocatalytic activity of *Aspergillus niger* xylanase in paper pulp biobleaching. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 165, 2016.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49-58, 2016.

SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood Cellulase enzyme production**. 121 f. Tese (Dutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química – LUND University, Suiça, 2000.

TAHIR, T. A.; DURAND, A.; GEBRUERS, K.; ROUSSEL, A.; WILLIAMSON, G.; JUGE, N. Functional importance of Asp37 from a family 11 xylanase in the binding to two proteinaceous xylanase inhibitors from wheat. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 9–15, 2004.

TAKAHASHI, Y.; KAWABATA, H.; MURAKAMI, S. Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. **Springerplus**, v. 2, n. 447, 2013.

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

TERRONE, C. C. **Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção em um resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

TERRONE, C. C. **α-arabinofuranosidase de *Aspergillus hortae*: produção, purificação, caracterização e aplicação na hidrólise de hemiceluloses de resíduos agroindustriais**. 2017. 119 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2017.

THOMAS, L.; JOSEPH, A.; ARUMUGAM, M.; PANDEY, A. Production, purification, characterization and over-expression of xylanases from actinomycetes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 875-884, 2013.

THOMAS, L.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. **Renewable Energy**, 2016.

TONUKARI, N. J.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WA LTON, J. D. Influence of carbon source on the expression of *Cochliobolus carbonum* xylan-degrading enzyme genes. **African Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 64-66, 2002.

TRAJANO, H. L.; WYMAN, C. E. Fundamentals of biomass pretreatment at low pH. In: WYMAN, C. E. **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**. 1th ed.: John Wilet & Sons, 2013.

TRAVAINI, R.; MARTÍN-JUAREZ, J.; LORENZO-HERNANDO, A.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Biorresource Technology**, v. 199, p. 2-12, 2016.

TRZCINSKI, A. P. **Biofuels from Food Waste**: Applications of saccharification using fungal solid state fermentation. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2017. 130 p.

UMSZA-GUEZ, M. A.; DÍAZ, A. B.; DE ORY, I.; BLANDINO, A.; GOMES, E.; CARO, I. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1585-1597, 2011.

UPTON, B. M.; KASKO, A. M. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: review and perspective. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2275-2306, 2016.

VALENZUELA, S. V.; DÍAZ, P.; PASTOR, F. I. J. Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4814-4818, 2010.

VALLS, C.; VIDAL, T.; RONCERO, M. B. The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 425-430, 2010.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylooligossacharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 387-393, 2000.

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

VENSON, I. **Estudos em deslignificação de polpas kraft de *pinus* spp. com oxigênio e peróxido**. 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p 1-43, 2001.

VIEIRA, D. S. **Estrutura, termoestabilidade e atividade de xilanases: um estudo via simulação molecular**. 2007. 147 f. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

VIJAYALAKSHMI, A.; RANJITHA, J.; RAJESWARI, V. D. Characterization and catalytic property of xylan degrading enzyme from microbial source. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 4, 2013.

VIMALASHANMUGAM, K.; VIRUTHAGIRI, T. Optimization of operating parameters and kinetics of xylanase enzyme production under SSF by *Aspergillus niger* using response surface methodology. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 7, p. 3558-3572, 2014.

VOET, D.; VOET, J. G. Velocidades das reações enzimáticas. In:_____. **Bioquímica**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1512 p.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). **Microbiology and Genetic Bulletin,** v. 13, p. 42-43, 1956.

VOLYNETS, B.; MOZAFFARI, F. E.; DAHMAN, Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. **Green Processing and Synthesis**, v. 6, n. 1, p. 1-22, 2016.

VAN DONGEN, F. E. M.; VAN, E. D.; KABEL, M. A. Characterization of substituents in xylans from corn cobs and stover. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 722-731, 2011.

WAHID, R.; HJORTH, M.; KRISTENSEN, S.; MOLLER, H. B. Extrusion as pretreatment for boosting methane production: effect of screw configurations. **Energy Fuels**, v. 29, n. 7, p. 4030-4037, 2015.

WAINO, M.; INGVORSEN, K. Production of β-xylanase and β-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. **Extremophiles**, v. 7, p. 87-93, 2003.

WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. An extracellular endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus japonicus*: purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 227-229, 2010.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 11, 2017.

WALIA, A.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 187-198, 2013.

WANG, C. Y.; CHAN, H.; LIN, H. T.; SHYU, Y. T. Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from Bacillus sp. NTU-06. **Annals of Applied Biology**, v. 156, n. 2, p. 187–197, 2010.

WANG, F. L.; SHUANG, L.; SUN, Y. X. HAN, H. Y.; ZHANG, B. X.; HU, B. Z.; GAO, Y. F.; HU, X. M. Ionic liquids as efficient pretreatment solvents for lignocellulosic biomass. **RSC Advances**, v. 7, p. 47990-47998, 2017.

WANG, J.; ZHANG, W. W.; LIU, J. N.; CAO, Y. L.; BAI, X. T.; GONG, Y. S.; CEN, P. L.; YANG, M. M. An alkali-tolerant xylanase produced by the newly isolated alkaliphilic *Bacillus pumilus* from paper mill effluent. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 7, p. 3297-3302, 2010.

WANG, K.; SIPILA, T. P.; OVERMYER, K. The isolation and characterization of resident yeasts from the phylloplane of *Arabidopsis thaliana*. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

WEIL, J.; WESTGATE, P.; KOHLMANN, K.; LADISCH, M. R. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 1002-1004, 1994.

WERTZ, J. C.; MERCIER, J. P.; BÉDUÉ, O. Structure and Properties of Cellulose. In:_____. **Cellulose Science and Technology**. Switzerland: CRC Press, 2010. 350 p.

WILLIAMS, C. L.; EMERSON, R. M.; TUMULURU, J. S. Biomass compositional analysis for conversion to renewable fuels and chemicals. In: TUMULURU, J. S. **Biomass volume estimation and valorization for energy**. InTech, 2017. 514 p.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52, p. 305–17, 1988.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. Trichoderma xylanases, their properties and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 5-6, p. 413–435, 1992.

XU, F. Structure, ultrastructure, and chemical composition. In: SUN, R. C. **Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels**: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose. Elsevier, 2010, 300 p.

XU, J. K.; SUN, R. C. Recent Advances in Alkaline Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: MUSSATTO, S. I. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. Netherlands: Elsevier, 2016. 674 p.

YAN, L.; MA, R.; LI, L.; FU, J. Hot water pretreatment of lignocellulosic biomass: an effective and environmentaly friendly approach to enhance biofuel production. **Chemical Engineering and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1759-1770, 2016.

YANG, B.; BOUSSAID, A.; MANSFIELD, S. D.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Fast and efficientalkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 678-684, 2002.

YANG, B.; WYMAN, C. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 26-40, 2008.

YANG, X.; SHI, P.; HUANG, H.; LUO, H.; WANG, Y.; ZHANG, W.; YAO, B. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β-xylosidase/α-arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. **Food Chemistry**, v. 148, p. 381-387, 2014.

YANG, Y.; ZHANG, W.; HUANG, J.; LIN, L.; LIAN, H.; LU, Y.; WU, J.; WANG, S. Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. **African Journal of Microbiology**, v. 4, n. 21, p. 2249-2256, 2010.

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, p. 224, 2017.

ZACCAI, G. The effect of water on protein dynamics. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v .359, n. 1448, p. 1269-1275, 2004.

ZADRAZIL, F.; PUNIA, A. K. Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 1, p. 85-87, 1995.

ZHANG, F.; CHEN, J. J.; REN, W. Z.; LIN, L. B.; ZHOU, Y.; ZHI, X. Y.; TANG, S. K.; LI, W. J. Cloning, expression, and characterization of an alkaline thermostable GH11 xylanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1109-1116, 2012.

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

ZHANG, L.; XU, J.; JIANG, Y.; GAO, F.; ZHOU, G. H. Effects of xylanase supplementation on growth performance, nutrient digestibility and non-starch polysaccharide degradation in different sections of the gastrointestinal tract of broilers fed wheat-based diets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 6, p. 855-861, 2014.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D. J. Pretreatment of biomass using ionic liquids: research updates. **Renewable Energy**, v. 111, p. 77-84, 2017.

ZHANG, W.; QIU, L.; GONG, A.; CAO, Y.; WANG, B. Solid-state fermentation of kitchen waste for production of *Bacillus thuringiensis*-based bio-pesticide. **BioResources**, v. 8, n. 1, 2013.

ZHENG, J.; REHMANN, L. Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18967-18984, 2014.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n. 3, 2009.

ZHOU, C. W.; WANG, Y. T.; ZHU, T. C.; FU, G. H.; WANG, D. D. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a GHF 43 xylanase from *Aspergillus niger* in *Escherichia coli*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, p. 234-240, 2014.

ZHOU, C.; YONGTAO, W.; MINCHEN, W.; WU, W.; DONGFENG, L. Heterologous expression of xylanase II from *Aspergillus usamii* in *Pichia pastoris*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 1, p. 90–95, 2009.

ZHOU, S.; RAOUCHE, S.; GRISEL, S.; NAVARRO, D.; SIGOILLOT, J. C.; HERPOEU-GIMBERT, I. Solid-state fermentation in multi-well plates to assess pretreatment efficiency of rot fungi on lignocellulose biomass. **Microbial Technology**, v 8, n. 6, p. 940-949, 2015.

ZHOU, X.; LI, W.; MABON, R.; BROADBELT, L. J. A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, v. 5, n. 1, p. 52-79, 2016.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4992–5002, 2010.

ZHUANG, X.; WANG, W.; YU, Q.; QI, W.; WANG, Q.; TAN, X.; ZHOU, G.; YUAN, Z. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68-75, 2016.

ZIMBARDI, A. L.; SEHN, C.; MELEIRO, L. P.; SOUZA, F. H.; MASUI, D. C.; NOZAWA, M. S.; GUIMARÃES, L. H.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. Optimization of β-glucosidase, β-xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2875-2902, 2013.

ZWEERINK, S.; KALLNIK, V.; NINCK, S.; NICKEL, S.; VERHEYEN, J.; BLUM, M.; WAGNER, A.; FELDMANN, I.; SICKMANN, A.; ALBERS, S. A.; BRASEN, C.; KASCHANI, F.; SIEBERS, B.; KAISER, M. Activity-based protein profiling as a robust method for enzyme identification and screening in extremophilic Archaea. **Nature Communications**, v. 8, n. 15352, 2017.