



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

MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDO- β -1,4-XILANASE POR *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 E APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO NA SÍNTESE DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS E CLARIFICAÇÃO DE SUCO

NATHIÉLI BASTOS DE SOUZA

SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

Rio Grande, RS

2020

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

MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDO- β -1,4-XILANASE POR *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 E APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO NA SÍNTESE DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS E CLARIFICAÇÃO DE SUCO

NATHIÉLI BASTOS DE SOUZA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

Rio Grande, RS

2020

Ficha Catalográfica

S729m Souza, Nathiéli Bastos de.
Maximização da produção de Endo- β -1,4-Xilanase por
Aureobasidium pullulans CCT 1261 e aplicação do extrato enzimático
na síntese de Xilo-oligossacarídeos e clarificação de suco / Nathiéli
Bastos de Souza. – 2020.
95 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

Orientadora: Dra. Susana Juliano Kalil.

1. Material Lignocelulósico 2. Levedura 3. Endo- β -1,4-Xilanase
4. Oligossacarídeos 5. Clarificação de Sucos I. Kalil, Susana Juliano
II. Título.

CDU 664.642:663.81

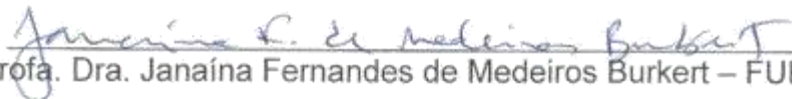
Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Nathieli Bastos de Souza e aprovada em 21 de fevereiro de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil - FURG



Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert – FURG



Profa. Dra. Susan Hartwig Duarte – FURG



Profa. Dra. Ana Paula Manera - UNIPAMPA

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a minha eterna rainha, minha mãe Luci Mara, que mesmo do céu sempre foi meu exemplo de honra, carinho e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

Ao longo da vida, Deus coloca pessoas em nosso caminho que de alguma maneira modificam nossa história, tornando-se parte dela, como as pessoas citadas abaixo que agradeço de coração pelo auxílio, convivência, conversas, risadas e até lágrimas que compartilhamos.

Primeiramente gostaria de agradecer a minha eterna rainha, **Luci Mara**, pois ao partir deixou uma imensa saudade, porém sempre será o padrão de pessoa que desejo seguir, guerreira, honesta e batalhadora, sempre serás meu exemplo de vida.

A minha atual família, meu pai **Valdeci**, meu irmão **Nathan**, ao meu amor **Francisco Munhoz** e **Lilian Teixeira**, minha boadrasta (kkk), pois sem o incentivo, apoio e o amor de vocês nada disso seria possível. Que por muitas vezes aguentaram meus momentos de raiva, angústia, tristeza e alegrias, mesmo longe me apoiaram e me acalmaram nos piores momentos e celebraram comigo minhas vitórias.

A minha orientadora **Susana J. Kalil** pelos ensinamentos, conselhos, conversas e por ter tido o prazer de disfrutar um pouco do seu conhecimento. Sou grata pelos puxos de orelha e conselhos, me fizeram crescer não só como profissional, mas como pessoa.

As minha colegas de Laboratório **Ana, Gabi** e a **Igreine**, gostaria de agradecer, pela companhia, conversas, conselhos e risadas (teve choro também mas essa parte a gente não conta), se tornaram pessoas muito especiais e jamais as esquecerei, sempre terá um lugar no meu coração pra uma abraço de vocês. A **Marina, Thais** e ao **Junior**, também só tenho a agradecer, por mais que tenhamos convidado um pouco menos vocês têm a minha admiração e são profissionais e pessoas maravilhosas, obrigada por tudo. E a minha bolsista **Dyhane**, pelas tardes de conversa, pela imensa colaboração no trabalho e pela compreensão nos meus momentos de correria e estresse, você terá um futuro brilhante. Um agradecimento especial a **Gabi**, que tanto me ajudou nas análises de XOs e durante todo o mestrado, és uma pessoa e profissional incrível, obrigada por tudo.

Aos demais **professores e funcionários da EQA**, o meu muito obrigada pelos conhecimentos compartilhado, tempo disponibilizado e auxílio sempre que necessário.

Aos meus colegas de mestrado, principalmente ao **Mayke, Bruna, Ana Luiza, Pedro, Francisco** e a **Laura** o meu muito obrigada pela alegria de vocês, pelas conversas, conselhos, vocês além de ótimas pessoas são profissionais incríveis e temos ai pela frente uma longa caminhada e só quero desejar-lhes boa sorte, no caminho que escolherem seguir, seja doutorado, indústria ou outros caminhos. Ao **Mayke** um agradecimento especial, pois sem a tua amizade aqui, tudo teria sido mais pesado, e tua presença fez minha vida mais leve, obrigada pela tua amizade.

À banca examinadora **Professoras Susana J. Kalil, Janaina Burkert, Susan Duarte e Ana Paula Manera**, muito obrigada por dedicarem seu tempo a ler minha dissertação, desde já agradeço pelas contribuições que sei que serão feitas para que cada vez mais o trabalho fique melhor.

À **FURG** e ao **Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECA)** pela oportunidade de crescer e me desenvolver como profissional. À **CAPES** e ao **CNPq** pelo auxílio financeiro e apoio a pesquisa.

EPIGRAFE

*Para quem parte emponchado de razões, não há cansaço
nem distância na jornada. Em cada légua de saudade
percorrida faz da partida um novo sonho de chegada...*

(Jairo Lambari Fernandes)

RESUMO

Endo- β -1,4-xilanases são enzimas capazes de hidrolisar a cadeia da xilana e produzir xilo-oligossacarídeos (XOs), que apresentam uma ampla gama de aplicações industriais. A maximização da produção de endo- β -1,4-xilanases por micro-organismos pode reduzir custos e fornecer uma enzima com alta capacidade catalítica, para aplicação no processo de clarificação de sucos e produção de XOs. Esse estudo teve como objetivo, maximizar a produção de endo- β -1,4-xilanases por *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 utilizando casca de aveia pré-tratada como fonte de xilana, bem como a caracterização e aplicação da enzima na síntese de XOs e clarificação de suco de laranja. Primeiramente, os pré-tratamentos alcalinos e de ultrassom foram aplicados na casca de aveia, após, foi utilizada como substrato na produção de enzimas, realizada em frascos Erlenmeyer com 150 mL de meio de cultura e 2% de inóculo da levedura, incubados a 28 °C por 120 h. A maximização da produção da endo- β -1,4-xilanase, foi realizada por Delineamento Composto Central (DCC) 2⁴, e os efeitos do pH (3,0-7,0), concentrações de casca de aveia pré-tratada (10-50 g/L), extrato de levedura (0,5-1,5 g/L) e KH₂PO₄ (0-5 g/L) foram avaliados. A atividade da endo- β -1,4-xilanase, proteínas solúveis e pH, foram medidas durante o tempo de cultivo. O efeito das ondas ultrassônicas sobre a atividade enzimática quando aplicada no extrato enzimático bruto e na xilana de madeira de faia foram avaliados, utilizando uma frequência de 20 kHz e intensidade de 0,5 a 7 W/mL, durante o período de 1, 3 e 5 min. A precipitação fracionada de sal com sulfato de amônia (0-30%/30-60%) foi aplicado para purificação do extrato enzimático. Também foram determinados temperatura e pH ótimos, parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) e estabilidade térmica para o extrato enzimático bruto. Posteriormente a endo- β -1,4-xilanase foi aplicada na hidrólise enzimática de xilana de madeira de faia e na clarificação de suco de laranja. A produção máxima da xilanase foi obtida utilizando 50 g/L de casca de aveia pré-tratada, pH 3,0, 1,5 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de KH₂PO₄. Após os ensaios de maximização, a atividade da endo- β -1,4-xilanase foi 6,37 vezes maior que no ensaio controle. A aplicação de ondas ultrassônicas no extrato enzimático bruto (1 W/mL por 3 min) e na xilana de madeira de faia (5 W/mL por 5 min) melhorou a atividade da endo- β -1,4-xilanase em 4,3% e 16,6%, respectivamente. A purificação enzimática pela precipitação de sal não foi possível. Quanto à caracterização do extrato bruto, observou-se uma faixa de temperatura e pH ótimos de 45 a 50 °C e 5,0, respectivamente. A meia vida a 40 °C foi determinada em 11 dias e valor z 4,63 °C. O extrato enzimático bruto apresentou V_{max} de 2000 U/mL e K_m de 69,8 mg/mL. Durante a clarificação do suco de laranja com aplicação de endo- β -1,4-xilanase bruta, observou-se um aumento 28,3% na claridade e 5,9% do teor de açúcares redutores e redução de 23,9% na turbidez. Por aplicação do extrato enzimático bruto na hidrólise da xilana, foi observada uma concentração final de 12,9 mg/mL de XOs totais com 24 h de processo. Além disso, o uso de xilana de madeira de faia pré-tratada por ultrassom, aumentou a concentração de oligômeros em 20%. Concluindo com o estudo, que foi possível a maximização da produção de endo- β -1,4-xilanase, a caracterização do extrato enzimático bruto e a aplicação eficiente da enzima em processos de produção de XOs e clarificação de suco de laranja.

Palavras Chaves: Material lignocelulósico. Levedura. Endo- β -1,4-xilanase. Oligossacarídeos. Clarificação de sucos.

ABSTRACT

Maximization the of production of endo- β -1,4-xylanase by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 and application of the enzyme extract in the synthesis of xylooligosaccharides and juice clarification

Endo- β -1,4-xylanase are enzymes capable of hydrolyzing the xylan chain and produce xylooligosaccharides (XOs), while they have a wide range of industrial applications. Maximization of endo- β -1,4-xylanase production by microorganisms can reduce costs and provide an enzyme with high catalytic capacity for application in processes such as juice clarification and XOs production. This study aimed to maximize the endoxylanase production by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 using pretreated oat hulls as xylan source, as well as the enzyme characterization and application in XOs synthesis and juice clarification. Firstly, the alkaline and ultrasound pretreatments were applied on the oat hull; then, it was used as substrate in the enzyme production, which was performed in Erlenmeyer flasks containing 150 mL of culture medium and 2% of yeast inoculum. Maximization of endoxylanase production was performed by a 2^4 Central Composite Design, and the effects of pH (3.0-7.0) and concentrations of pretreated oat hull (10-50 g/L), yeast extract (0.5-1.5 g/L), and potassium phosphate (KH_2PO_4) (0-5 g/L) were evaluated. Endo- β -1,4-xylanase activity, soluble proteins and pH were measured during the cultivation time. The effect of ultrasonic waves on the enzymatic extract and beechwood xylan was evaluated using a frequency of 20 kHz and intensity of 0.5 to 7 W/mL during the period of 1, 3 and 5 min. Fractioned salt precipitation with ammonium sulfate (0-30%/30-60%) was applied to purify the enzyme extract. Optimum temperature and pH, kinetic parameters (K_m and V_{max}) and thermal stability for the crude enzymatic extract were also determined. Posteriorly, the endoxylanase was applied in the hydrolysis of beechwood xylan and in the orange juice clarification. Maximum xylanase production was obtained using 5.0 g/L of KH_2PO_4 , 1.5 g/L of yeast extract, 50 g/L of pretreated oat hulls and pH 3.0. After the maximization assays, endoxylanase activity was 6.37 times higher than in the control trial. The application of ultrasonic waves in the crude enzymatic extract (1 W/mL for 3 min) and in the beechwood xylan (5 W/mL for 5 min) improved the endoxylanase activity in 4.3% and 16.6%, respectively. The enzyme purification by the salt precipitation was not possible to achieve. Regarding the characterization of the crude extract, it was observed an optimal temperature and pH of 45 to 50 °C and 5.0, respectively. The half-life at 40 °C was determined as 11 days and z-value as 4.63 °C. Crude enzymatic extract exhibited V_{max} of 2000 U/mL and K_m of 69.8 mg/mL. During the orange juice clarification using the crude extract, it was observed an increase of 28.3% and 5.9% in clarity and in the reducing sugar content, respectively, and a reduction of 23.9% in turbidity. By application of the crude extract in xylan hydrolysis, it was observed a final concentration of 12.9 mg/mL of XOs in 24 h of reaction. Furthermore, the use of pretreated xylan by ultrasound in XOs production improved the oligomers concentration in 20%. In conclusion, this study enabled the maximization of endoxylanase production, the characterization of the crude extract, and the efficient application of enzymes in processes related to the food industry.

Key-words: Lignocellulosic Material. Yeast. Endo- β -1,4-xylanase. Oligosaccharides. Juice clarification.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos de produção de xilanases por leveduras em meio de cultivo com substrato agroindustrial, maiores atividades observadas, tempo de cultivo, substrato agroindustrial e parâmetros analisados.....	27
Tabela 2 - Valores reais e codificados das variáveis independentes avaliados no planejamento experimental DCC 2 ⁴	40
Tabela 3 - Condições testadas para hidrólise enzimática de xilana de madeira de faia para síntese de XOs, com pH reacional ajustado para 5,0.....	42
Tabela 4 - Recuperação e Redução da biomassa durante o pré-tratamento na casca de aveia	47
Tabela 5 - Matriz do delineamento DCC 2 ⁴ , valores codificados e reais das variáveis independentes e a atividade enzimática (Ativ Enz) e a produtividade (Prod.) nas 72 e 96 h de cultivo	50
Tabela 6 - Efeitos das variáveis (Ef), Coeficiente de Regressão (CR), Erro Padrão (EP), valor-t e nível de significância (p-valor) para a resposta atividade da endo- β -1,4-xilanase nas 96 h de cultivo da levedura.....	55
Tabela 7 - Valores reais e preditos pelo modelo para a variável resposta, atividade enzimática e o desvio relativo entre os valores obtidos.....	56
Tabela 8 - ANOVA para a atividade de endo- β -1,4-xilanase do DCC 2 ⁴	56
Tabela 9 – Ensaio adicionais, avaliação da atividade enzimática e produtividade com variações na concentração de extrato de levedura.....	61
Tabela 10 – Extratos tratados com ultrassom nas frequências de 0,5, 1, 1,6, 3,0, 5,0 e 7,0 W/mL na temperatura de 40 °C nos tempos de 1, 3 e 5 min.....	62
Tabela 11 – Aplicação de ultrassom no extrato enzimático bruto, na intensidade de 1 W/mL por 1, 3 e 5 min, comparativo da temperatura de 40 °C e 4 °C (banho de gelo).....	63
Tabela 12 – Solução de xilana de madeira de faia tratada com ultrassom nas intensidades de 1, 3, 5 e 7 W/mL na temperatura de 40 °C por 1, 3 e 5 minutos, previamente ao uso na atividade enzimática.....	64
Tabela 13 - Precipitação fracionada do extrato enzimático bruto com sulfato de amônia nas concentrações de 0-30% e 30-60%	66
Tabela 14 - Valores de meia vida ($t_{1/2}$), constante de desnaturação térmica (Kd), valor D e valor z para o extrato enzimático bruto.	71
Tabela 15 - Síntese de XOs por hidrólise enzimática de xilana de madeira de faia na concentração de 6% (m/v), avaliação da concentração dos XOs produzidos	73
Tabela 16 – Comparativo da síntese de XOs com xilana bruta e xilana tratada com ultrassom, na concentração de 1% (m/v)	75
Tabela 17 - Parâmetros de clarificação de suco de laranja com aplicação de 12,5 U/mL de extrato enzimático bruto produzido em cultivo submerso.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Estrutura básica da biomassa lignocelulósica.....	21
Figura 2 - Estrutura da xilana e os sítios de ataque de enzimas xilanolíticas.....	24
Figura 3 - Cinética de produção (atividade enzimática, pH e proteínas solúveis) de endo- β -1,4-xilanase por <i>A. pullulans</i> com casca de aveia pré-tratada.	49
Figura 4 - Cinética da produção de endo- β -1,4-xilanase durante cultivo da levedura <i>A. pullulans</i> CCT 1261 em ensaios do planejamento DCC 2 ⁴ aplicado	51
Figura 5 - Comportamento do pH de cultivo da levedura <i>A. pullulans</i> CCT 1261 durante produção de endo- β -1,4-xilanase em ensaios do planejamento DCC 2 ⁴ aplicado	52
Figura 6 - Comportamento do teor de proteínas solúveis do cultivo da levedura <i>A. pullulans</i> CCT 1261 durante produção de endo- β -1,4-xilanase em ensaios do planejamento DCC 2 ⁴ aplicado.....	54
Figura 7 - Curva de contorno para a atividade de endo- β -1,4-xilanase em função da concentração de casca de aveia e do pH.....	57
Figura 8 - Curva de contorno para a atividade de endo- β -1,4-xilanase em função da concentração de KH ₂ PO ₄ e do pH	59
Figura 9 - Efeito da temperatura de 35 a 80 °C sobre a atividade relativa da endo- β -1,4-xilanase em pH fixo em 5,3	67
Figura 10 - Efeito da variação de pH 2,5 a 8,0 sobre a atividade relativa da endo- β -1,4-xilanase com temperatura fixa em 50 °C.	69
Figura 11 - Avaliação da temperatura de 45 °C no processo de clarificação do suco de laranja, análise de claridade, turbidez e açúcares redutores	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	21
3.1.1 Casca de aveia como fonte de xilana	22
3.2 COMPLEXO XILANOLÍTICO	23
3.3 PRODUÇÃO DE XILANASES	24
3.4 EFEITOS DO ULTRASSOM NAS ENZIMAS	28
3.5 XILANASES E SUAS APLICAÇÕES	30
3.5.1 Xilo-oligossacarídeos: conceito e aplicação	31
3.5.2 Aplicação de xilanase na clarificação de sucos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL	37
4.2 MÉTODOS	37
4.2.1 Preparo da casca de aveia	37
4.2.2 Pré-tratamentos da casca de aveia	37
4.2.2.1 Tratamento térmico alcalino	38
4.2.2.2 Tratamento ultrassônico.....	38
4.2.3 Preparo de pré-inóculo e inóculo de levedura <i>Aureobasidium pullulans</i>	38
4.2.4 Parâmetros do ensaio controle	39
4.2.5 Maximização da produção de endo-β-1,4-xilanase	39
4.2.6 Estudo da aplicação de ultrassom no extrato enzimático bruto e na xilana	40
4.2.7 Purificação parcial do extrato enzimático bruto	41
4.2.8 Caracterização do extrato enzimático bruto	41
4.2.9 Produção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática	42
4.2.10 Clarificação de suco de laranja	43
4.2.11 Determinações analíticas.....	44
4.2.11.1 Atividade enzimática de endo- β -1,4-xilanase.....	44
4.2.11.2 Atividade enzimática da β -xilosidase	45
4.2.11.3 Concentração de proteínas solúveis e pH	45
4.2.11.4 Análise de XOs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	46
4.2.12 Análise estatística dos resultados	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 PRÉ-TRATAMENTO NA CASCA DE AVEIA.....	47
5.2 ENSAIO CONTROLE UTILIZANDO BIOMASSA PRÉ-TRATADA.....	48
5.3 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDO-B-1,4-XILANASE.....	50
5.4 APLICAÇÃO DE ULTRASSOM NO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO	61
5.5 PURIFICAÇÃO PARCIAL COM SULFATO DE AMÔNIO.....	65
5.6 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA BRUTA	66
5.6.1 Temperatura ótima de atuação da endo-β-1,4-xilanase	67
5.6.2 pH ótimo para atuação da endo-β-1,4-xilanase.....	68
5.6.3 Parâmetros Cinéticos.....	70

5.6.4 Estabilidade térmica da endo-β-1,4-xilanase	71
5.7 PRODUÇÃO DE XOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	72
5.8 CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE LARANJA POR VIA ENZIMÁTICA	76
6 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria brasileira produz grande quantidade de resíduos lignocelulósicos de baixo valor comercial. Por esse motivo são destinados, na maioria das vezes, para queima e geração de energia ou para alimentação animal (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Contudo, alguns desses materiais podem ser utilizados como substrato lignocelulósico para obtenção de produtos de maior valor agregado, como etanol (SINDHU et al., 2017), filmes biodegradáveis (PEREIRA et al., 2017), enzimas (AHMED et al., 2018; BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2016), xilo-oligossacarídeos (XOs) (BALDEZ, 2018; DOTSENKO et al., 2018), entre outros. Devido à complexa estrutura dos materiais lignocelulósicos, alguns pré-tratamentos são aplicados para aumentar a disponibilidade dos compostos e assim, aumentar o rendimento dos produtos obtidos (CHEN et al., 2017), tais como, auto-hidrólise (CHEN et al., 2014), ultrassom (LEITE et al., 2016), tratamentos alcalinos e ácidos (DEMIREL et al., 2018; GERMEC et al., 2017), aumentando a disponibilidade dos polímeros para sua conversão em carboidratos mais simples (CHEN et al., 2017).

Dentre os materiais lignocelulósicos destaca-se a aveia e, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a sua produção no Brasil, na safra 2018, foi de 819,0 mil toneladas. No estado do Rio Grande do Sul (RS) essa cultura já está substituindo o plantio de trigo e cevada e sua produção no mesmo período foi de 609,5 mil toneladas, caracterizando o RS como um dos principais produtores no país (CONAB, 2018). A casca é o principal subproduto da moagem dos grãos, representando em média 30% de seu peso, seu principal destino é a queima para geração de energia, sendo o restante descartado durante o processamento, tornando-se um poluente para o meio ambiente (CHAUD et al., 2012; COSTA, 2018). Porém, esse material rico em celulose (30-50%), hemicelulose (20-30%) e lignina (10-25%) apresenta-se como alternativa de substrato para a produção de biomoléculas (CORTIVO et al., 2018; TAMANINI et al., 2004). No grupo das hemiceluloses, a xilana é o principal representante e sua complexa estrutura requer um conjunto de enzimas com distintas especificidades, para que ocorra a quebra completa da cadeia do polissacarídeo. Essas enzimas compreendem o complexo xilanolítico (maior grupo de hidrolases capaz de degradar a xilana), que apresentam aplicações nas indústrias têxtil, alimentícia, farmacêutica e de papel (POLIZELI et al., 2005).

Dentre os micro-organismos capazes de produzir a xilanase, estão as leveduras, pois algumas cepas sintetizam elevadas concentrações de endo- β -1,4-xilanases, enzimas que atuam diretamente no esqueleto da cadeia da xilana, quebrando as ligações glicosídicas β -1,4 para a

liberação XOs. Porém, produzem baixas concentrações de β -xilosidases, enzima que atua nas extremidades não redutoras da cadeia das xilobioses ou de outros XOs, resultando no monossacarídeo xilose. O que é interessante, uma vez que esse açúcar simples reduz o rendimento de XOs (GAUTÉRIO et al., 2018; SHENG et al., 2014), por esse motivo as endo- β -1,4-xilanases de leveduras têm sido estudadas para produção desses oligômeros de baixo grau de polimerização.

Alguns parâmetros podem afetar a atividade e produtividade das xilanases durante o processo de produção enzimática pelo micro-organismo, tais como, pH inicial do meio de cultivo, temperatura, fonte de carbono orgânico e inorgânico e fonte de nitrogênio, dentre outros. Esses fatores demonstram influência na produção da enzima, contudo, as condições ótimas dos meios de cultivo para a otimização do processo de produção enzimática são únicas para cada micro-organismo e substrato utilizado (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; LI et al., 2007). Por esse motivo observa-se a necessidade de aplicação de métodos de maximização da produção da enzima para cada micro-organismo e substrato proposto.

Alguns fatores externos também podem influenciar na atividade enzimática, um deles é a aplicação de ultrassom. Assim, alguns autores como Dalagnol et al. (2017), Oliveira et al. (2017) e Tran, Nguyen e Le (2018) têm estudado o efeito da aplicação de ultrassom como um tratamento na enzima. Essa tecnologia atinge diretamente a estrutura e as características enzimáticas que, quando aplicado em baixas intensidades e frequências adequadas, gera cavitação no meio aquoso que causa alterações funcionais nas enzimas, podendo aumentar a atividade catalítica, reduzir os tempos de processo e facilitar a interação entre enzima e substrato (WANG et al., 2018).

As endo- β -1,4-xilanases vem sendo estudadas para aplicação em vários setores, como na indústria de papel Kraft (WU et al., 2018), ração animal (PANWAR; SRIVASTAVA, 2014), xilitol (CORTIVO et al., 2018), indústria de sucos e panificação (AHMED et al., 2016; ROSMINE et al., 2017) e na produção de XOs (BALDEZ, 2018). Dentre suas aplicações destacam-se a síntese de XOs por hidrólise enzimática e a clarificação de sucos de frutas.

Entre as biomoléculas que podem ser produzidas por hidrólise da xilana, destacam-se os XOs, compostos não digeríveis constituídos basicamente de 2 a 10 unidades de xilose unidas por ligações β -1,4, com proporções variadas de substituintes laterais como grupos acetila, ácidos urônicos e arabinoses (MONIZ et al., 2016). As funções prebióticas dos XOs, como a promoção do crescimento de bactérias benéficas ao intestino humano, têm despertado o interesse para a aplicação na indústria de alimentos, visto que funcionam como aditivos ou adoçantes nas dietas (NIETO DOMÍNGUEZ et al., 2017). Para sua aplicação é necessário

conhecer sua estrutura, grau de polimerização (GP), propriedades biológicas e funcionais e estabilidade durante o processamento. Os XOs de baixo GP (menor ou igual a 5) são rapidamente fermentados por bactérias probióticas, colaborando para a colonização da microflora intestinal benéfica, enquanto os de GP maior não são assimilados pelas bactérias e não auxiliam no seu desenvolvimento (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015).

Dentre as utilizações de endo- β -1,4-xilanases na indústria destaca-se a sua aplicação em processos de clarificação de sucos, por vezes em complexos enzimáticos, compostos por pectinases, celulasas, xilanases e outras enzimas (ADIGÜZEL; TUNÇER, 2016). Os processos de clarificação de sucos por métodos enzimáticos vem sendo estudados devido ao aumento geral do consumo de sucos naturais nos últimos anos, porém o suco *in natura* apresenta uma elevada turbidez e viscosidade, por isso tendem a assentar no fundo da embalagem durante o armazenamento (UZUNER; CEKMECELIOGLU, 2019). Por esse motivo necessitam de clarificação antes de sua comercialização, e as xilanases são enzimas que podem auxiliar nesse processo um vez que hidrolisam polissacarídeos como as hemiceluloses, que aumentam a turbidez dos sucos provenientes da parede celular dos frutos, juntamente com outros constituintes como amidos, pectinas e celulosas (NAGAR; MITTAL; GUPTA, 2012; SINGH et al., 2019).

Embora o número de trabalhos existentes na literatura com a produção de xilanases para obtenção de XOs seja elevado (AZELEE et al., 2016; CHANG et al., 2017a; DOTSENKO et al., 2018; GAUTÉRIO et al., 2018; KALLEL et al., 2015; RAHMANI et al., 2017; SHENG et al., 2014; YEGIN, 2016), até o presente momento, na bibliografia consultada, não foram encontrados trabalhos com enfoque na maximização da produção de endo- β -1,4-xilanases por *Aureobasidium pullulans* e sua aplicação na hidrólise para produção de XOs e clarificação de suco de laranja. Com base na problemática exposta foi desenvolvido o presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral a maximização da produção de endo- β -1,4-xilanase por *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 utilizando casca de aveia como fonte de xilana, bem como o uso de extrato enzimático na síntese de XOs e na clarificação de suco de laranja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

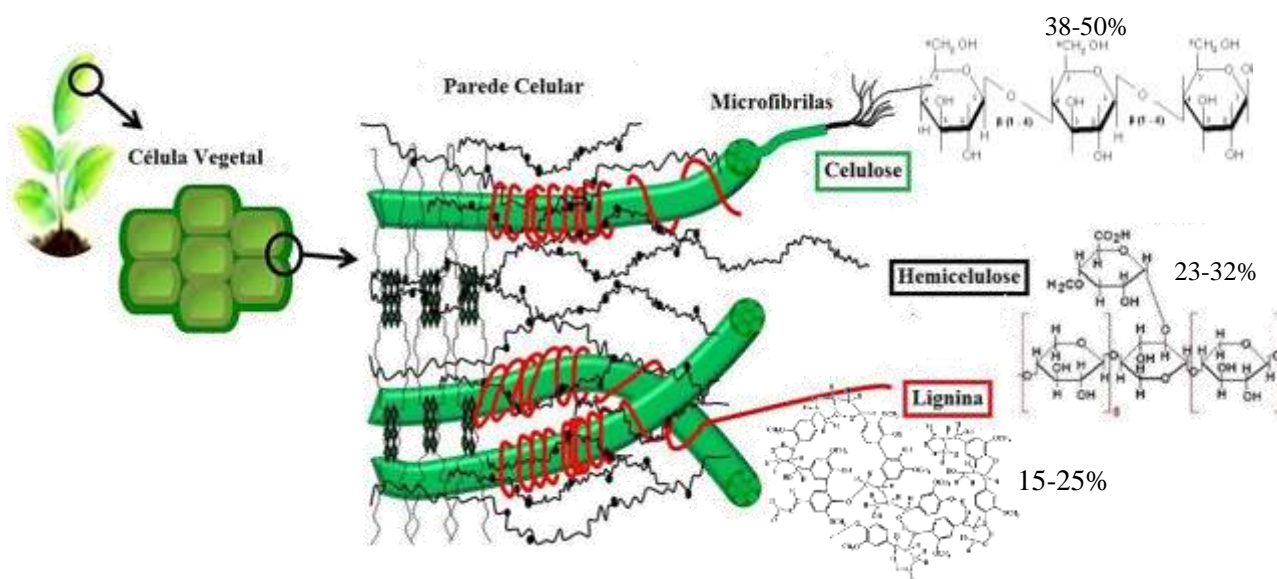
- Maximizar a produção de endo- β -1,4-xilanase em cultivo submerso em meio contendo casca de aveia pré-tratada como substrato;
- Avaliar o efeito da aplicação de ultrassom como pré-tratamento no extrato enzimático bruto e na xilana de madeira de faia sobre a atividade enzimática;
- Caracterizar parcialmente o extrato enzimático bruto, quanto às condições ótimas de temperatura e pH para ação da enzima, cinética de desnaturação e parâmetros cinéticos de atuação da enzima em xilana de madeira de faia;
- Produzir XOs por hidrólise da xilana de madeira de faia com e sem tratamento com ultrassom, utilizando extrato enzimático bruto;
- Clarificar suco de laranja utilizando extrato enzimático bruto de endo- β -1,4-xilanase produzida em cultivo submerso.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é considerada a matéria-prima renovável mais abundante e largamente distribuída na natureza (CARVALHO et al., 2013; KUMAR et al., 2017), sendo constituída principalmente por carboidratos que representam aproximadamente 75% da matéria seca total dos vegetais (TAVARES; BUCKERIDGE, 2015). A parede celular dos vegetais é formada por três compostos principais, ligados entre si por ligações covalentes ou não covalentes: celulose (38 a 50%), hemicelulose (23 a 32%) e lignina (15 a 25%), além de compostos minoritários como pectina, proteínas, lipídeos e outras substâncias inorgânicas (SUN et al., 2016). A Figura 1 ilustra a estrutura básica da biomassa lignocelulósica e apresenta os três constituintes majoritários.

Figura 1 -Estrutura básica da biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de Tomme, Warren e Gilkes (1995)

A celulose, o componente majoritário, é o composto orgânico mais abundante na natureza, pois se regenera durante a fotossíntese (PANDEY et al., 2000). Este composto orgânico é formado por unidades de D-glicose unidas aos pares (celobiose) por ligações β -1,4 e apresenta grau de polimerização (GP) variando entre 500 a 25.000 unidades (MARIANO; KISSI; DUFRESNE, 2014; SUN et al., 2016).

A hemicelulose, o segundo carboidrato em maior proporção, é um heteropolissacarídeo linear ou ramificado composto por diversos monossacarídeos (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). Essa molécula apresenta menor grau de polimerização (80 a 200 unidades) quando comparado à celulose. Dentre as hemiceluloses presentes na parede celular das plantas a mais abundante é a xilana, que constitui de 30% a 35% da biomassa seca total de madeiras duras e plantas herbáceas, e até 50% em cereais e gramíneas (RODRIGUES et al., 2016).

A estrutura da xilana varia de uma cadeia linear, composta por resíduos de D-xilopiranosil unidos por ligações do tipo β -1,4, até um heteropolissacarídeo altamente ramificado. A conformação estrutural determina a estrutura física, solubilidade da molécula em meio aquoso e influencia na extensão da hidrólise enzimática (CARVALHO et al., 2013; GÍRIO et al., 2010). A principal aplicação biotecnológica desse polissacarídeo é na produção de xilose e XOs (FONSECA, 2015; GRACIOLI, 2018) por degradação da molécula.

O terceiro constituinte majoritário da biomassa lignocelulósica é a lignina, polímero ramificado de natureza fenólica, amorfo, heterogêneo e com características hidrofóbicas. O composto confere rigidez à estrutura das plantas, impermeabilidade, impede o estresse oxidativo e a degradação enzimática (MA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016).

A composição química do material lignocelulósico varia de acordo com a sua fonte (MALHERBE; CLOETE, 2002; SANTOS et al., 2012). Após o processamento desses materiais são gerados resíduos que quando descartados inadequadamente sem o devido tratamento, resultam em problemas ambientais, como a poluição de solos, lençóis freáticos e do ar (COSTA, 2018). Por esse motivo, sua utilização como fonte de energia para crescimento celular e produção de biomoléculas tem sido bastante estudada, principalmente os resíduos do processamento de cana-de-açúcar (AFTAB et al., 2017), algodão (AKPINAR et al., 2007) arroz, uva e café (GAUTÉRIO et al., 2018), soja (FONSECA, 2015), milho (AACHARY; PRAPULLA, 2009) e aveia (TAMANINI et al., 2004).

3.1.1 Casca de aveia como fonte de xilana

A aveia é um cereal membro do gênero *Avena*, amplamente cultivado no mundo, segundo o *Departamento da Agricultura dos Estados Unidos* (USDA, 2019), a produção mundial de aveia no período de 2018/2019 foi de 22.265 mil toneladas. No Brasil, na safra 2018 foram colhidos 819,0 mil toneladas de aveia e desse total 609,5 mil toneladas foram produzidas

no Rio Grande do Sul, segundo CONAB (2018). A aveia é utilizada como alimento, ração, forragem, cobertura de solo e adubo verde (TAMANINI et al., 2004).

Durante o processo de moagem dos grãos gera-se uma quantidade significativa de rejeitos, como a casca, que equivale de 25 a 30% do peso do grão (CHAUD et al., 2012). A casca da aveia tradicionalmente é utilizada para geração de energia ou descartada e se torna um poluente para o meio ambiente (CHAUD et al., 2012). Alguns estudos têm sido feitos com a utilização desse substrato como fonte de fibras para alimentação animal (GUISA et al., 1988), produção de etanol, xilitol e glicerol devido ao seu conteúdo de celulose e hemicelulose (CHAUD et al., 2012; CORTIVO et al., 2018; LAWFORD; ROUSSEAU; TOLAN, 2001; SKIBA et al., 2018; TAMANINI et al., 2004). Outros estudos têm utilizado a casca de aveia para aumento da hidrofobicidade de folhas de papel (SIPPONEN et al., 2010) e aplicações de pré-tratamentos na biomassa lignocelulósica para aumento da biodisponibilidade dos constituintes por remoção de lignina (CORRÊA JUNIOR; MATTOS; MACHADO, 2018; GERMEC et al., 2017; MAKAROVA et al., 2017).

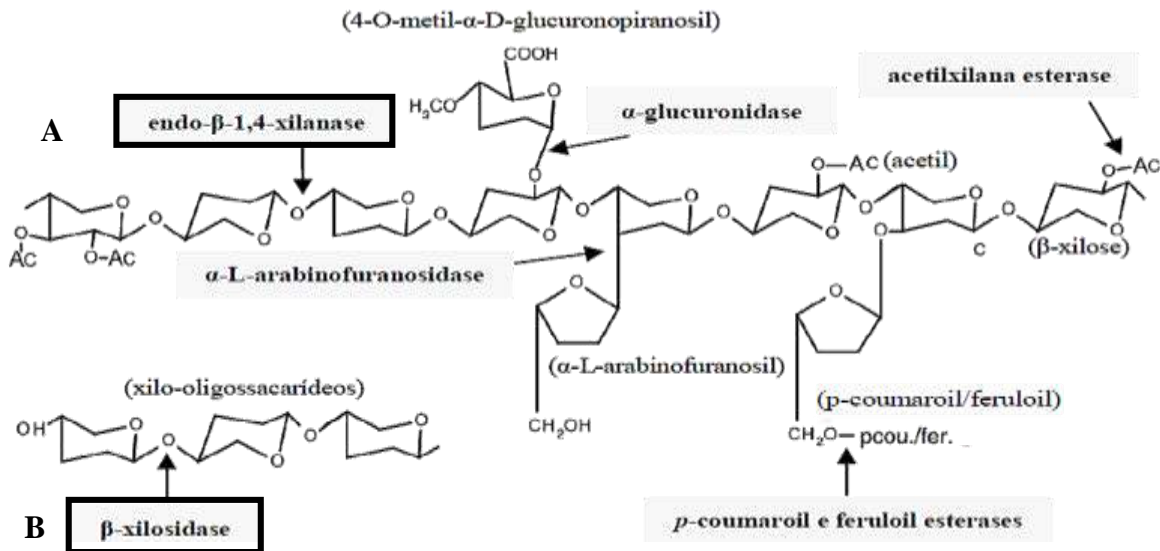
Segundo Tamanini et al. (2004), a composição da biomassa lignocelulósica da casca de aveia é de aproximadamente 29% de celulose, 28% de hemicelulose e 22% de lignina, a qual permite a sua utilização como substrato em processos biotecnológicos. Corrêa Junior, Mattos e Machado (2018), quando aplicaram processos de pré-tratamento em casca de aveia, a fim de utilizar como substrato no meio de cultivo como fonte de xilana, obtiveram uma redução do teor de lignina quando utilizaram processos de hidrólise alcalina combinado com posterior processo de ultrassom, com teores finais de lignina reduzidos de 22,1% para 7,3% nas amostras. Essa deslignificação é resultado do ataque do hidróxido de sódio às ligações entre a lignina e a hemicelulose, levando à ruptura das ligações éter e éster dessa estrutura. Esta redução conseqüentemente aumenta o teor de hemicelulose nas amostras, aumentando sua disponibilidade (CHEN et al., 2013). O processo de ultrassom, de acordo com Bhutto et al. (2017), causa uma degradação de polissacarídeos, degradando inicialmente a lignina, pois é o componente mais acessível do material lignocelulósico.

3.2 COMPLEXO XILANOLÍTICO

A heterogeneidade da hemicelulose, em especial a xilana, demanda um conjunto de enzimas agindo em sinergia para a hidrólise completa de sua estrutura. Essas enzimas compõem o complexo xilanolítico e apresentam capacidade de hidrolisar a hemicelulose, por esse motivo são descritas como hemicelulases (BEG et al., 2001). Assim, quanto maior a complexidade do

polissacarídeo, mais enzimas serão necessárias para a hidrólise completa da molécula (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). A atuação direta dessas enzimas xilanolíticas sobre os sítios de ataque da cadeia da xilana está ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura da xilana e os sítios de ataque de enzimas xilanolíticas.



Fonte: Adaptado de Sunna e Antranikian (1997)

A Figura 2, apresenta a atuação direta das principais enzimas do complexo xilanolítico na cadeia da xilana e no xilo-oligossacarídeo livre. Esse conjunto de enzimas é classificado em dois principais grupos: aquelas que atuam diretamente na cadeia da xilana como a endo-β-1,4-xilanase (A), que despolimeriza a molécula e libera o XOs; e a β-xilosidase que atua na cadeia de um xilo-oligossacarídeo livre (B) produzindo xilose a partir de xilobioses e outros XOs (DOTSENKO et al., 2018). E a segunda classificação é das enzimas auxiliares, que são responsáveis pela remoção das cadeias laterais e a quebra das ramificações presentes na cadeia, tais como, α-L-arabinofuranosidase, α-glucuronidase, acetil xilana esterase, p-coumaroil e feruloil esterase (BEG et al., 2001; DOTSENKO et al., 2018).

3.3 PRODUÇÃO DE XILANASES

Dentre os micro-organismos produtores de enzimas do complexo celulósico (celulases) e xilanolítico (xilanases), os fungos filamentosos são estudados por sua alta capacidade de produzir enzimas em meio contendo substratos lignocelulósicos (ALMEIDA et al., 2014; CHANG et al., 2017b; LIAO et al., 2015). Para a utilização da celulose e xilana pelos

micro-organismos durante seu metabolismo é necessária a clivagem desses polissacarídeos, pois as moléculas maiores não conseguem permear a parede celular e a membrana da célula microbiana, assim, os fungos produzem elevadas concentrações de celulases e xilanases extracelulares, capazes de realizar a quebra desses constituintes para sua utilização como fonte de energia pelo micro-organismo (POLIZELI et al., 2005).

Dentre os principais fungos filamentosos produtores de xilanases estão os do gênero *Aspergillus* (CHANG et al., 2017b; TAKAHASHI; KAWABATA; MURAKAMI, 2013), *Fusarium* (ALMEIDA et al., 2014), *Trichoderma* e *Penicillium* (GOYAL et al., 2008; LIAO et al., 2015). Além desses, Rosmine et al. (2017) avaliaram a influência de vários parâmetros sobre a produção de endo- β -1,4-xilanases por *Streptomyces* sp., os autores encontraram o máximo de rendimento da xilanase através de aplicação de delineamento composto central (DCC). O modelo previu uma produção máxima ao empregar a concentração ótima de azeite de oliva de 33,10 mg/L, xilana 0,37%, agitação de 43 rpm e idade do inóculo de 21 h, apresentando uma produção máxima de 10220 U/mL, 1,56 vezes maior que a atividade inicial 3986,44 U/mL, após 120 h de cultivo.

Irfan, Nadeem e Syed (2014) avaliaram a influência de vários parâmetros, como tempo de processo, pH inicial, temperatura de incubação, tamanho do inóculo, concentração e tipo de substrato, pré-tratamento à biomassa, fontes de carbono e nitrogênio, dentre outros parâmetros otimizados para maior produção de xilanases por *Trichoderma viride* –IR05. Dentre os resultados encontrados pelos autores, foi observado o maior rendimento de xilanase de $56,6 \pm 1,21$ U/g quando utilizado cana de açúcar como substrato. Os autores observaram que a maior produção de xilanase ocorreu na concentração de 20 g/L de substrato, em concentrações maiores foi verificada queda da atividade, os autores notaram ainda um pH inicial 4,5 e temperatura de 30 °C foram ótimos para o cultivo.

Alguns fungos produzem além de endo- β -1,4-xilanases, celulases e β -xilosidases. Estudos de Menezes, Rossi e Ayub (2017), com *Aspergillus brasiliensis* BLf1 e *Aspergillus* sp. BLf11 apresentaram atividade de xilanases (76 U/g e 88 U/g), celulases (7 U/g e 18 U/g) e β -xilosidase (23 e 19 U/g), respectivamente. Marques et al. (2018) avaliaram a produção de xilanases, β -xilosidase e celulases (endoglucanase, β -glucosidase) em meio de cultivo com diferentes composições de materiais lignocelulósicos por diversas cepas de fungos e encontraram maior produção de xilanase (442,5 U/g) em meio com mistura de farelo de trigo e algodão pelo fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01. Contudo, esse meio de cultivo apresentou a maior atividade de celulases 230,7 U/g e 10,4 U/g de β -xilosidase.

Alguns fungos apesar a elevada atividade de xilanases no extrato enzimático, apresentam uma atividade considerável de celulases e β -xilosidases o que limita a sua aplicação. A presença dessas enzimas como as celulases, por exemplo, no processamento de papel podem reduzir o rendimento final do processo, pela degradação da celulose (WU et al., 2018). Algumas celulases como as variações da glucanase podem levar a conversão de celulose a glicose e produção de etanol (MARQUES et al., 2018). Já a presença de β -xilosidase reduz os rendimentos de XOs pelo aumento dos níveis de xilose, pois a atividade da endo- β -1,4-xilanase é inibida na presença de elevadas concentrações desse monossacarídeo (ADSUL; BASTAWDE; GOKHALE, 2009).

Por esse motivo, as leveduras vêm sendo estudadas na produção de xilanases, apesar do número de trabalhos com esses micro-organismos ser relativamente menor, quando comparado aos estudos com fungos filamentosos e bactérias. As leveduras são promissoras para a produção de enzimas com elevada atividade de endo- β -1,4-xilanase, baixa produção de β -xilosidase e celulase e apresentam a capacidade de produzir enzimas em meio de cultivo composto por substratos agroindustriais. Portanto, esses micro-organismos mostram-se propícios para aplicação na produção de endo- β -1,4-xilanases, para utilização na hidrólise enzimática para produção de XOs (ADSUL; BASTAWDE; GOKHALE, 2009; OTERO et al., 2015; YANG et al., 2011).

Contudo, a busca por pools enzimático com essa característica tem atraído atenção para aplicação industrial, tais como indústrias de papel e celulose (WU et al., 2018), ração animal (PANWAR; SRIVASTAVA, 2014) e alimentícia (CUNHA et al., 2018; REDDY; KRISHNAN, 2016). A Tabela 1, apresenta alguns estudos com aplicação de leveduras na produção de endo- β -1,4-xilanases em meios contendo substratos agroindústrias com fonte de xilana e os principais parâmetros de cultivo analisados.

Visto que a produção de enzima é influenciada por diversos fatores, estudos para a otimização dos meios de cultivo para a maximização da produção da enzima por leveduras têm sido realizado. Gomes, Gomes e Steiner (2000) em estudos com a levedura *Cryptococcus adeliae* observaram um aumento da atividade de xilanase em 4,3 vezes quando o meio de cultivo foi otimizado, utilizando xilana de madeira de faia como substrato, observaram ainda uma baixa atividade de β -xilosidases e ausência de atividade de celulases.

Tabela 1 – Estudos de produção de xilanases por leveduras em meio de cultivo com substrato agroindustrial, maiores atividades observadas, tempo de cultivo, substrato agroindustrial e parâmetros analisados.

Levedura	Atividade enzimática (U/mL)	Tempo de cultivo (h)	Substrato reacional (g/L)	Parâmetros reacionais analisados	Observações	Referências
<i>Moesziomyces aphidis</i>	492,0	96	Grão gastos de cervejaria 40,0	Fontes de carbono, estirpe de levedura	Livre de celulase β -xilosidase: 0,32 U/mL	(FARIA et al., 2019)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Candida tropicalis</i> (co-cultura)	20,24	48	Bagaço de cana de açúcar 10,0	Temperatura, fonte de nitrogênio, tamanho do inóculo, tempo, pré-tratamento, teor de umidade e estirpe de levedura	Maior atividade com pré-tratamento ácido	(QADIR et al., 2018)
<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL Y-2311-1	85,19	126,6	Farelo de trigo 10,0	pH, temperatura, tempo de incubação, substrato agrícola, aeração e velocidade de agitação	-	(YEGIN et al., 2017)
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCT 1261	82,2	72	Farelo de arroz 61,9	pH inicial, concentração de substrato, extrato de levedura, temperatura, NH_4SO_4 e KH_2PO_4	-	(GAUTÉRIO et al., 2020)
<i>Candida tropicalis</i>	20,42	72	Bagaço de cana de açúcar 10,0	Temperatura, pH, fonte de carbono e de nitrogênio sintético, conc. xilana, tamanho do inóculo e Fonte de substrato	Baixa produção endoglucanase; Maior atividade sem pré-tratamento	(SHARIQ; SOHAIL, 2018)

Yegin et al. (2017) analisaram a produção de xilanases por *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1, utilizando como substrato de cultivo vários resíduos agroindustriais, dentre os testados, o farelo de trigo se destacou, resultando em uma produção de aproximadamente 85 U/mL de atividade de xilanase após otimização do processo. A produção de endo- β -1,4-xilanase e com baixa produção de β -xilosidase foi observado por Gautério et al. (2018) para a cepa de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, na qual foi observada atividade de endo- β -1,4-xilanase de 74, 94 U/mL e de 0,19 U/mL de β -xilosidase em meio com xilana de madeira de faia como substrato.

Segundo Anthony et al. (2016), o meio de cultivo para processos fermentativos equivale a 60% do custo total do processo, uma vez que os nutrientes utilizados são caros. Por isso é essencial projetar e otimizar processos para a maior produtividade, a fim de alcançar processos fermentativos econômicos. Segundo Kumar et al. (2012) e Rodrigues e Iemma (2014) a abordagem estatística com superfície de resposta oferece uma triagem rápida e resultados precisos que permitem que cada parâmetro estudado seja otimizado para a obtenção da máxima produção da enzima.

3.4 EFEITOS DO ULTRASSOM NAS ENZIMAS

O uso de ultrassom (US) é uma técnica emergente considerada como uma tecnologia “verde” devido às propriedades ecologicamente corretas e à alta eficiência (DALAGNOL et al., 2017). Essa tecnologia é caracterizada por ondas sonoras que excedem o limite de detecção auditiva do ouvido humano, variando de 10 a 60 kHz. Em meio líquido o principal fenômeno é a cavitação, caracterizado por formação, crescimento e colapso de microbolhas de gás dissolvidas no líquido, liberando grande quantidade de energia altamente localizada, resultando em mudanças químicas, físicas e conformacionais na estrutura das moléculas as quais o ultrassom é aplicado (GALLO et al., 2018; LEITE et al., 2016).

Essa tecnologia tem sido estudada para processos de pré-tratamento na biomassa lignocelulósica para deslignificação e aumento da biodisponibilidade do material para ataque microbiano em processos fermentativos (BHUTTO et al., 2017; CORRÊA JUNIOR; MATTOS; MACHADO, 2018), desacetilação da beta-quitina para obtenção de quitosana (ALTA et al., 2009), aumento da atividade enzimática pela aplicação de pré-tratamento de baixa frequência em enzimas (HOU et al., 2019; MENG; LI; ZHU, 2018) auxílio na conversão de material lignocelulósico em açúcares redutores durante a hidrólise enzimática desse substrato (DALAGNOL, 2010; SUBHEDAR; BABU; GOGATE, 2015). O ultrassom, melhora a

transferência de massa, reduz o tempo de processo biotecnológicos, pode causar ainda, a desnaturação e destruição de proteínas e patógenos e alterar a funcionalidade de enzimas (DALAGNOL et al., 2017; GONÇALVES; SILVA; CAVACO-PAULO, 2015; NADAR; RATHOD, 2017).

A técnica de US apresenta efeitos controversos sobre a atividade das enzimas, podendo aumentar ou reduzir a atividade catalítica dependo da frequência e potência aplicada. Classifica-se principalmente em três campos, dependendo da frequência e da quantidade de energia gerada pelo campo acústico: o ultrassom de baixa frequência (20 kHz – 100 kHz) e alta energia (UBFAE) o qual apresenta efeitos mecânicos de cavitação predominantes e colapso das bolhas com maior força de colisão; o ultrassom de alta frequência (100 kHz – 1 MHz) e média energia (UAFME), no qual o efeito químico é predominante à medida que o número de bolhas é maior e o colapso se dá com menor força de impacto; e, por fim, o ultrassom de alta frequência (1 - 10 MHz) e baixa energia (UAFBE), em que os efeitos químicos e físicos relacionados à cavitação são mínimos, enquanto os efeitos de fluxo acústico são predominantes (GONÇALVES; SILVA; CAVACO-PAULO, 2015; MENG; LI; ZHU, 2018).

Pesquisadores constataram o potencial do ultrassom de baixas frequências na modificação de propriedades físico-químicas de proteínas e enzimas, sem afetar sua integridade estrutural. As flutuações na pressão interna causadas pelas ondas ultrassônicas podem alterar a estrutura tridimensional da enzima afetando sua atividade, assim como observado por Hu et al. (2013), Leaes et al. (2013) e Szabo e Csiszar (2017) que relataram a melhora da atividade enzimática em pectinases, celulasas, lipases e α -amilases com uso de técnica de ultrassom antes da reação enzimática. A transmissão das ondas de ultrassom pode ocorrer por dois sistemas distintos, de modo direto, com sonda ultrassônica, ou ainda por modo indireto com uso de banho de ultrassom (BANSODE; RATHOD, 2017; POVEDANO; CASTRO, 2015).

Dalagnol et al. (2017), quando avaliaram os efeitos de aplicação de ultrassom na hidrólise enzimática, na frequência de 40 kHz e potência ultrassônica de 220 W, sobre a atividade de pectinases, xilanases e celulasas, observaram um aumento médio 5% da atividade de pectinases, 30% de xilanases e 25% das celulasas. Os autores descrevem ainda que o processo de sonicação quando aplicado no substrato, xilana de madeira de faia, altera suas cadeias, facilitando o acesso das enzimas e aumenta a atividade da enzima. Quando aplicado à enzima, ajuda a ativar a estrutura, aumentando a sua atividade absoluta. Leaes et al. (2013) quando aplicaram energia ultrassônica em meios reacionais de α -amilase e amido como substrato, em banho ultrassônico na frequência de 40 KHz e potência de 132 W, com

temperatura de 39 °C e pH 3,8, observaram aumento de 64% de atividade com o uso de banho ultrassônico em comparação a banho-maria.

Hou et al. (2019) avaliaram o efeito de aplicação de ultrassom por sonda ultrassônica, emitindo frequência de 22 kHz e fornecendo potência de 300 W, sobre solução de quitinase, variando o tempo de aplicação de 5 a 30 min. A atividade máxima da quitinase foi obtida quando sonicada a 25 W/mL por 20 min, um aumento de 19,17% em relação a amostra não tratada foi observado. Quando aplicados tempos maiores, foi observada a redução da atividade enzimática. Os autores descrevem que condições mais brandas de aplicação do ultrassom causam cavitações estáveis que aumentam a atividade da enzima, contudo quando a intensidade é mais alta ou a duração do processo é maior o colapso de bolhas instáveis danifica a estrutura conformacional da enzima.

Wang et al. (2012) ao avaliar o efeito de diferentes tempos, potências e frequências ultrassônicas utilizando sonda de ponta plana, observaram que a melhor condição para o tratamento de celulasas livres foi alcançado quando a amostra foi tratada com baixa intensidade e potência, 24 kHz e 15 W por 10 min de processo, na qual a atividade enzimática foi aumentada em 18,17% em relação ao controle. Quando os autores avaliaram o processo ultrassônico com a celulase imobilizada, observaram aumento de 24,67% na atividade quando tratada com 24 kHz e 60 W por 10 min. Com as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), aplicadas a enzima imobilizada foi possível verificar que o tratamento ultrassônico aumentou a área superficial da enzima, melhorando assim sua atividade. Através dos estudos expostos é possível observar a potencialidade da aplicação de sistema de ultrassom de baixa frequência, para aumento da atividade de diversas enzimas.

Apesar dos benefícios do ultrassom já relatados, alguns autores como Islam, Zhang e Adhikari (2014), Huang et al. (2017) e Silva et al. (2014) têm estudado os efeitos do ultrassom de alta frequência e altas potências, na inativação de enzimas. A inativação nessas condições ocorre principalmente pelo colapso de bolhas que produzem um aumento local na pressão e na temperatura do sistema. As condições extremas causadas pelo ultrassom podem desestabilizar a conformação ativa da enzima, rompendo ligações de hidrogênio e as interações de Van der Waals nas cadeias polipeptídicas (HUANG et al., 2017).

3.5 XILANASES E SUAS APLICAÇÕES

A clivagem da cadeia da xilana realizada pelas xilanases têm como principal função, a destruição da integridade da fibra da xilana, expondo outros componentes

lignocelulósicos à outras hidrolases, tornando-os uma fonte de carboidratos metabolizáveis (AHMAD; BUTT; RIAZ, 2013; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

A principal aplicação das xilanases é na indústria de papel, principalmente no processo Kraft. As xilanases atuam no complexo lignina-carboidrato, facilitando o ataque de agentes químicos e a melhora no processo de branqueamento da polpa, porém o complexo deve ser livre de celulasas (CHANG et al., 2017a; WU et al., 2018). Na indústria de ração animal, quando aplicadas junto à outras enzimas, quebram, por exemplo, a cadeias das arabinoxilanas, pois a presença de arabinoses apresenta efeito anti-nutricional para aves, além de elevar a viscosidade, interferindo na absorção de outros componentes (PANWAR; SRIVASTAVA, 2014; POLIZELI et al., 2005). Os produtos obtidos da hidrólise da xilana, como xilose podem ser utilizados para a elaboração de produtos como adoçantes artificiais (CORTIVO et al., 2018; POLIZELI et al., 2005).

Nas indústrias de alimentos as xilanases têm sido utilizadas na clarificação de sucos como os de laranja, maçã e abacaxi. A enzima hidrolisa a cadeia da xilana diminuindo a formação de decantados formados de polissacarídeos, melhorando a qualidade do produto (ROSMINE et al., 2017; SHAHRESTANI et al., 2016). Nas indústrias de panificação, as xilanases são utilizadas para melhorar a qualidade das massas, pois convertem a hemicelulose insolúvel para a forma solúvel, permitindo a obtenção de maior volume a produtos como pães e bolos (BUTT et al., 2008; COLLINS et al., 2006). Ainda no setor alimentício têm-se os xilo-oligossacarídeos que são obtidos da degradação da xilana por xilanases e podem ser utilizados na formulação de alimentos, sua principal utilização é devido ao seu carácter prebiótico (VÁZQUEZ et al., 2000). Assim, devido aos benefícios à saúde humana gerados pelo consumo de XOs, grande destaque tem sido dado a esse tema nos estudos (GAUTÉRIO et al., 2018; MONIZ et al., 2016; REDDY; KRISHNAN, 2016; SAMANTA et al., 2015).

3.5.1 Xilo-oligossacarídeos: conceito e aplicação

XOs são oligômeros de açúcares formados por unidade de xilose, encontrados naturalmente em frutos, vegetais, no leite e no mel. Para sua produção com base em materiais lignocelulósicos, esses devem ser uma base rica em xilana, pois através da hidrólise desses polissacarídeos ocorre a formação de XOs de diferentes graus de polimerização, encontrados comercialmente na forma de pó branco (CARVALHO et al., 2013; VÁZQUEZ et al., 2000). Os XOs são oligossacarídeos não digeríveis contendo entre duas e dez unidades de D-xilose unidas por ligações β -1,4, porém podem ocorrer XOs ramificados pela presença de

grupos laterais como α -D-glicopiranosil, ácido urônico ou seus derivados, grupos acetila e resíduos de arabinofuranosil (MONIZ et al., 2016).

A utilização industrial dos XOs, é principalmente para aplicação em alimentos (SHAHRESTANI et al., 2016) e na indústria farmacêutica (CORTIVO et al., 2018). Esse composto apresenta caráter atóxico e não carcinogênico, porém, são substâncias não digeríveis pelas enzimas do organismo humano e são classificados como ingredientes prebióticos (SAMANTA et al., 2015). Essa classificação é concedida quando apresentam grau de polimerização menor ou igual a cinco, pois são meio seletivo para o crescimento de bactérias probióticas. Bifidobactérias, como *Bifidobacterium bifidum* e bactérias lácticas do colón, como *Lactobacillus* sp., em seu metabolismo utilizam esses oligossacarídeos para a produção de ácidos graxos de cadeia curta responsáveis pela melhoria da saúde humana (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; KALLEL et al., 2015; RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2017). XOs com grau de polimerização maior que cinco não estimulam o desenvolvimento dessas bactérias, assim, para a justificativa do uso da denominação prebiótico os XOs deve ter grau de polimerização entre 2 e 5 (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015).

Na formulação de alimentos funcionais a vantagem de aplicação de XOs em relação a outros oligômeros não digeríveis, como os fruto-oligossacarídeos (FOs) e os galacto-oligossacarídeos (GOs), é a maior estabilidade sob elevadas temperaturas e pH ácido (BARRETO; ZANCAN; MENEZES, 2015; WANG et al., 2009). Além disso, outro benefício da sua utilização, segundo Moniz et al. (2016), é o fato de serem os únicos oligossacarídeos no mercado obtidos de materiais lignocelulósicos. Sua aplicação direta em alimentos só é possível devido a seu caráter atóxico e à certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) concedida pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2013). Contudo, a presença de fortes ligações da lignina com o carboidrato na biomassa bruta, impedem a atuação das enzimas sobre a hemicelulose, assim pré-tratamentos para a remoção desse composto por vezes são necessários para a utilização da biomassa como substrato para produção do biocomposto (AACHARY; PRAPULLA, 2011; GALBE; ZACCHI, 2012).

O processo de hidrólise da xilana por via enzimática, com ação de endo- β -1,4-xilanases, é o método mais utilizado para a produção de XOs. A hidrólise enzimática não produz subprodutos durante o processo, apresenta baixa formação de monômeros de açúcares simples, não necessita de equipamentos especiais e acontece em condições amenas de pH e temperatura, em casos onde a enzima utilizada é imobilizada existe a opção de reuso da mesma (GAUTÉRIO et al., 2018; KALLEL et al., 2015; RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2017).

Extratos xilanolíticos com baixas atividades de β -xilosidases são desejáveis já que a atuação dessa enzima reduz o rendimento de XOs pela conversão em xilose. O açúcar simples formado pela atuação das β -xilosidases além de não promover o crescimento de bactérias benéficas ao cólon, também inibe a atividade das endo- β -1,4-xilanases (REDDY; KRISHNAN, 2016; SHENG et al., 2014).

Para uma hidrólise enzimática eficiente com bom rendimento, produtividade e qualidade de XOs, alguns parâmetros devem ser estudados, tais como: fonte microbiana produtora da enzima, estabilidade, pH e temperatura ótima, purificação do extrato enzimático bruto; características da hidrólise também influenciam a produção de XOs como, tipo e concentração de substrato, pré-tratamentos aplicados a biomassa, temperatura, pH e agitação do meio reacional, concentração do inóculo entre outros parâmetros importantes (AZELEE et al., 2016; CHRISTOV et al., 1997; GAUTÉRIO et al., 2018; MONIZ et al., 2016; REDDY; KRISHNAN, 2016).

3.5.2 Aplicação de xilanase na clarificação de sucos

Sucos de frutas frescas apresentam um elevado teor de carboidratos poliméricos que fazem com que estes apresentem uma maior turbidez e elevada viscosidade (ADIGUZEL et al., 2019). Estes sucos *in natura* apresentam essas características, devido principalmente a polissacarídeos como hemiceluloses, amido, pectinas, celuloses e ligninas, que durante o armazenamento tendem a decantar no fundo da embalagem que armazena o produto, por este motivo, necessitam ser clarificados antes da comercialização (NAGAR; MITTAL; GUPTA, 2012). Assim, enzimas como hemicelulases, celulases e pectinases têm uma imensa aplicação no processamento de sucos, pois apresentam a capacidade de hidrolisar a parede celular de frutas e vegetais, liberando nutrientes, facilitando a produção, reduzindo tempo de processo e melhorando as características sensoriais do produto (SINGH et al., 2019).

Alguns autores têm relatado aumentos de rendimento, clareza, teor de açúcares redutores e redução da turbidez em sucos cítricos (DHIMAN et al., 2011), laranja (ADIGUZEL et al., 2019; DÍAZ et al., 2013; KUMAR et al., 2014), tomate (ULLAH et al., 2019), maçã e pêsego (ADIGUZEL et al., 2019; İLGÜ; SÜRMELE; ŞANLI-MOHAMED, 2018), abacaxi (PAL; KHANUM, 2011a; ROSMINE et al., 2017), manga (BANDIKARI et al., 2015) e kiwi (SURYAWANSHI et al., 2019).

Nagar, Mittal e Gupta (2012) descrevem que algumas frutas apresentam em sua estrutura uma parede primária, composta de celulose, hemicelulose e lignina, essa lamela média

atua como uma substância intracelular de ligação entre as células vegetais. As enzimas degradadoras enfraquecem as ligações nessa parede facilitando a extração do suco. O aumento da concentração de enzima para o tratamento de sucos de frutas pode aumentar a clarificação dos sucos, contudo, concentrações excessivas de enzima podem permanecer em suspensão diminuindo a claridade dos sucos. Assim, o aumento da concentração de enzima é interessante até o momento em que haja carboidratos poliméricos a serem hidrolisados, pois altos níveis de concentração enzimática podem diminuir a claridade do produto.

O tempo de aplicação do tratamento enzimático também é um fator muito importante, pois tempos muito prolongados podem causar o fenômeno de formação de partículas de neblina, que aumentam a turvação e reduzem a claridade dos sucos tratados. Essa neblina consiste na formação de complexos de proteínas-carboidratos ou proteína-taninos à medida que o tempo de processo é prolongado (SIN et al., 2005). Outro parâmetro importante a ser observado nos processos de clarificação de sucos por métodos enzimáticos é a temperatura de reação, pois segundo Nagar, Mittal e Gupta (2012) a temperatura aumenta a taxa de reação enzimática, podendo aumentar a velocidade de clarificação destes sucos, porém esse aumento de temperatura não pode ultrapassar a temperatura de desnaturação proteica.

Passarinho (2014) descreve que a turbidez natural dos sucos cítricos influencia diretamente na aceitabilidade do produto pelo consumidor, e esta turbidez é resultado da dispersão de partículas em suspensão contendo lipídeos, proteínas, pectina, celulose e hemicelulose, resultantes da ruptura da parede celular da fruta durante a extração do suco. Assim como em outros trabalhos os estudos de Díaz et al. (2013) buscaram métodos para otimizar propriedades e melhorar a qualidade de sucos de laranja.

Dentro do panorama de produção de sucos, o Brasil, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (2019), é o maior produtor de laranja *in natura* e suco de laranja do mundo, sendo que 70% da produção do fruto é destinada a processamento de sucos. O Brasil encontra-se também em primeiro lugar como exportador destes produtos respondendo por mais de três quartos das exportações globais de suco de laranja. Segundo o IBGE (2019), o Brasil produziu mais de 16 milhões de toneladas de laranja no ano de 2018, sendo que a região sul é a segunda maior produtora ficando atrás apenas do sudeste. Visto a importância da cultivar para o agronegócio brasileiro, observa-se a necessidade de maiores investimentos em qualidade e processamento destes sucos. Assim, alguns autores têm estudado a clarificação de sucos de laranja por método enzimático utilizando endo- β -1,4-xilanases (ADIGÜZEL; TUNÇER, 2016; DHIMAN et al., 2011; DÍAZ et al., 2013; KUMAR et al., 2014; ROSMINE et al., 2017)

Diversos estudos vêm relatando a eficiência de xilanases na clarificação de sucos de frutas frescas, dentre as mais estudadas os sucos de laranja têm recebido bastante destaque. Adigüzel e Tunçer (2016) quando estudaram a clarificação de suco de laranja e outras frutas observaram aumento da claridade (18,3%) do suco de laranja tratado com 12,5 U/mL por 120 min. na temperatura de 60 °C, foram ainda observados aumentos de teor de açúcares redutores, aproximadamente 20% e aumento do rendimento de suco de aproximadamente 15%. Quando aplicada a xilanase purificada em suco de maçã e uva, os autores também observaram aumentos de claridade, teor de açúcares redutores e rendimento de suco.

Kumar et al. (2014), otimizaram o processo de clarificação de suco de laranja por xilanase purificada, com o tratamento do suco com 20 IU/g de polpa de fruta por 30 min a 50 °C, foram observados aumento máximo de rendimento do suco de laranja de 14%, claridade 12%, açúcares redutores 7%. Os autores relatam que o aumento do rendimento e claridade dos sucos provavelmente é devido a liberação de água resultante da redução da capacidade de retenção de água da xilana, após sua degradação pela xilanase e que o aumento dos açúcares redutores do suco, provavelmente é devido a liberação de xilose e oligossacarídeos de cadeia curta após o tratamento da polpa da fruta com xilanase.

Rosmine et al. (2017) avaliaram a aplicação de xilanase em sucos de frutas frescas e dentre os avaliados o tratamento proporcionou aumento da claridade de suco de laranja (20,8%) quando tratado a 55 °C por 150 min. Outros autores também observaram melhora na qualidade de sucos de laranja quando aplicado tratamento com xilanase, Díaz et al. (2013) utilizando 2,0 g/L de extrato enzimático purificado incubado a 45 °C por 3 h, obtiveram aumentos na claridade, acidez total e açúcares redutores, redução da turbidez e viscosidade do suco tratado com extrato enzimático. Ahmed et al. (2016) trataram suco de laranja com concentração de enzima bruta de 3,73 U/mL incubado a 30 °C por 72 h, obtendo uma claridade máxima de 44% (descontada a clarificação do controle, resultado da sedimentação natural).

Com os dados apresentados, observa-se a necessidade de clarificação em sucos como o de laranja e a eficácia de extratos enzimáticos de xilanases brutas ou purificadas no aumento da claridade, redução da turbidez e aumento do teor de açúcares redutores nos sucos tratados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A levedura *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 utilizada foi adquirida da coleção de culturas tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil). A casca de aveia cedida gentilmente pela empresa Cerélus Alimentos Integrais (Ijuí, Brasil). A xilana comercial utilizada foi xilana de madeira de faia, adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) e os meios de cultivo como Agar batata dextrose da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) e extrato de levedura da Kasvi (Itália).

Os padrões de XOs utilizados para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram xilobioses, xilotriose, xilotetralose e xilopentose, obtidos da Megazyme (Bray, Irlanda) e o padrão de xilose da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). A coluna cromatográfica para análise de XOs foi Aminex HPX-42A, de dimensões 300 mm x 7,8 mm, obtida da Bio-Rad Laboratories (Hercoles, Estados Unidos). A acetonitrila grau CLAE foi adquirida da J. T. Baker (pHillipsburg, Estados Unidos). Os demais reagentes utilizados nas análises foram todos de grau analítico (AOAC, 2000).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo da casca de aveia

Após o recebimento da casca de aveia esta foi homogeneizada em um lote único, seca a 50 °C por 24 h em estufa com circulação de ar e posteriormente, submetida à moagem em moinho de facas, para redução do tamanho de partícula e peneirada até a obtenção de partículas passantes em peneira de Tyler 32, menores que 0,5 mm (GAUTÉRIO et al., 2018).

4.2.2 Pré-tratamentos da casca de aveia

O pré-tratamento da casca de aveia foi realizado por união de duas técnicas, o tratamento térmico alcalino e posterior aplicação de tratamento ultrassônico.

4.2.2.1 Tratamento térmico alcalino

A casca de aveia moída e peneirada foi submetida a tratamento térmico alcalino por imersão em solução de hidróxido de sódio 1% (NaOH). A proporção de casca e solução de NaOH 1% foi de 1:10 (m/v), respectivamente (SINDHU et al., 2017), com volume total de 150 mL. A solução alcalina contendo a casca foi autoclavada por 30 min a 121 °C (GOYAL et al., 2008). A solução foi filtrada, com auxílio de bomba a vácuo, e lavada com água destilada até a neutralização (pH 7,0), a casca retida no filtro foi distribuída em placas de Petri de modo a formar uma fina e homogênea camada para facilitar a secagem deste material, processo realizado em estufa com circulação de ar a 50 °C por 24 h.

4.2.2.2 Tratamento ultrassônico

O tratamento ultrassônico foi aplicado à casca de aveia, após o tratamento alcalino com a casca seca, segundo metodologia proposta por Leite et al. (2016), com modificações na potência ultrassônica e no tempo de processo. O tratamento foi realizado em homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250, Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 KHz e potência de 90 W, com tempo total 20 min de processo, com 2 min de aplicação de ultrassom e 2 min em repouso. A proporção de casca de aveia e água utilizada foi de 1:7 (m/v), com posterior recuperação da fração sólida por filtração e secagem em estufa a 50 °C por 24 h.

4.2.3 Preparo de pré-inóculo e inóculo de levedura *Aureobasidium pullulans*

A manutenção e o armazenamento da levedura utilizada (*Aureobasidium pullulans* CCT 1261) foi feita por repiques periódicos em ágar batata dextrose (PDA) inclinado, incubado a 24 °C por 72 h em estufa, com posterior armazenamento em refrigeração (4 °C) (WEI et al., 2017; YEGIN et al., 2017).

Para a produção do pré-inóculo foi transferido uma alçada de massa celular da superfície do ágar PDA para tubos com 5 mL de meio de cultivo estéril, composto por 10,0 g/L de xilose, 6,7 g/L de base nitrogenada de levedura, 2,0 g/L de asparagina, 5,0 g/L KH_2PO_4 , ajustado para pH 5,0. Os tubos contendo o micro-organismo inoculado foram incubados a 28 °C em estufa por 24 h (CHRISTOV et al., 1997).

Após o tempo de incubação, o pré-inóculo (5 mL) foi transferido para o meio do inóculo (mesma composição do meio utilizado no pré-inóculo), contido em erlenmeyer de

250 mL com 45 mL de volume de meio. A incubadora utilizada foi um agitador orbital com 150 rpm de agitação e temperatura de 28 °C, durante 24 h (CHRISTOV et al., 1997).

A esterilização dos meios foi feita antes da inoculação, em autoclave a 121 °C por 15 min. Contudo, a solução de xilose foi esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm (Milipore, Burlington, Estados Unidos), por ser um açúcar passível de caramelização em altas temperaturas.

4.2.4 Parâmetros do ensaio controle

O cultivo preliminar realizado para teste de produção de endo-β-1,4-xilanase, utilizando a casca de aveia pré-tratada foi denominado “ensaio controle”. O cultivo foi realizado com 150 mL de volume de meio estéril, contido em frascos erlenmeyer aletados de capacidade de 500 mL, composto por 10,0 g/L de casca de aveia pré-tratada, 1,0 g/L de extrato de levedura, 2,5 g/L de (NH₄)₂SO₄ e 5,0 g/L de KH₂PO₄, ajustado para pH 5,0 (YEĞİN, 2017).

Após a esterilização dos meios contendo a casca de aveia pré-tratada, foi inoculado 2% (v/v) de inóculo da levedura *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, preparado como descrito no item 4.2.3. O inóculo foi padronizado a uma densidade ótica (DO) de 0,8 em espectrofotômetro na faixa de leitura de 620 nm (SUGUMARAN et al., 2013). Os meios inoculados foram incubados a 28 °C com 150 rpm de agitação orbital por 96 h (YEGIN et al., 2017). Foram realizadas coletas de 6 mL a cada 24 h para controle da produção da enzima, até completar 96 h de cultivo. A amostra coletada foi centrifugada a 21.380 x g por 25 min a 4 °C, para separação do material insolúvel e a biomassa da levedura.

O sobrenadante nomeado como “extrato enzimático bruto” foi utilizado para as análises de atividade de endo-β-1,4-xilanase (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992; MILLER, 1959), determinação do conteúdo de proteínas solúveis (LOWRY et al., 1951) e determinação do pH (AOAC, 2000).

4.2.5 Maximização da produção de endo-β-1,4-xilanase

A maximização das condições de cultivo para produção de endo-β-1,4-xilanase foi realizada através de um Delineamento Composto Central (DCC) 2⁴ com 3 repetições do ponto central, totalizando 19 ensaios. Os 4 parâmetros analisados foram pH inicial do cultivo, concentração de casca de aveia, concentração do extrato de levedura e concentração de fosfato

de potássio (KH₂PO₄), os quais foram variados entre os níveis -1 até +1, conforme a Tabela 2. As faixas de variação foram conforme estudos de Bankeeree et al. (2016) e Yegin et al. (2017).

Os parâmetros temperatura (28 °C), concentração de sulfato de amônia (2,5 g/L) e agitação (150 rpm) foram fixados durante o planejamento (GAUTÉRIO et al., 2018; NASR et al., 2013; YEGIN, 2017) e os cultivos conduzidos conforme descrito anteriormente.

Tabela 2 - Valores reais e codificados das variáveis independentes avaliados no planejamento experimental DCC 2⁴

Níveis codificados	pH inicial	Casca de aveia (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)
-1	3,0	10,0	0,5	0,0
0	5,0	30,0	1,0	2,5
+1	7,0	50,0	1,5	5,0

Para cada ensaio foram determinadas a atividade da enzima endo-β-1,4-xilanase (U/mL), o teor de proteínas (mg/mL) e o pH. A equação (1) apresenta o cálculo dos desvios relativos (RD), aplicado aos dados do planejamento experimental, entre os valores previstos (PR) e reais (OR) para o DCC proposto.

$$RD (\%) = \frac{OR - PR}{OR} \times 100 \quad (1)$$

O modelo matemático foi validado através de triplicata de ensaios da melhor condição observada com o planejamento.

Foram realizados testes adicionais para a verificação do impacto de duas concentrações de extrato de levedura (0,5 e 1,5 g/L) sobre a produtividade da enzima. As amostras foram coletadas às 72 e 96 h de cultivo e o experimento foi realizado em triplicata e aplicado teste estatísticos nos resultados.

4.2.6 Estudo da aplicação de ultrassom no extrato enzimático bruto e na xilana

Para avaliação do comportamento da enzima após a aplicação de ondas ultrassônicas no extrato enzimático bruto, foi utilizado sonda ultrassônica (Sonic Ruptor 250, Omni International Inc., EUA), na frequência 20 kHz e intensidade ultrassônica variando de 0,5, 1, 1,6, 3, 5 e 7 W/mL conforme Golunski et al. (2017) e Ma et al. (2017), com modificações conforme especificações do equipamento a ser utilizado. O volume sonicado foi variado para

atender a intensidade desejada conforme potência do equipamento disponível, os tempos de processo ultrassônico estudados foram 0, 1, 3 e 5 min, com posterior análise de atividade enzimática conforme o item 4.2.11.1. A temperatura de processo foi controlada em 40 °C, para avaliar o efeito dessa temperatura sobre a ação da enzima, foi feito um comparativo na temperatura de 4 °C, controlada em banho de gelo. Os extratos sonicados foram denominados “extrato tratado por ultrassom”, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para o efeito das ondas ultrassônicas quando aplicadas diretamente ao substrato da reação (xilana de madeira de faia), foi testada a concentração de xilana em 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 50 mmol e pH de reação 5,3. Os parâmetros de intensidade foram testados em 1, 3, 5 e 7 W/mL, nos mesmos tempos propostos para o extrato enzimático bruto, na temperatura de 40 °C (DALAGNOL et al., 2017), todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.7 Purificação parcial do extrato enzimático bruto

A purificação parcial aplicada ao extrato enzimático bruto, foi por precipitação com sulfato de amônio nas concentrações de 0-30% para remoção das impurezas iniciais e 30-60% para precipitação da enzima de interesse, conforme Jiang et al. (2005). O método foi aplicado em triplicata de ensaios no extrato enzimático bruto no pH final do cultivo.

4.2.8 Caracterização do extrato enzimático bruto

O extrato bruto foi caracterizado quanto às condições ótimas de temperatura para a atividade enzimática, na faixa de 35 a 80 °C, com intervalo de 5 °C, com pH fixo em 5,3 em tampão citrato de sódio 50 mM. As condições ótimas de pH para a atividade da enzima foram determinadas na faixa de pH de 2,5 a 8,0 com tampão citrato de sódio 50 mM, com temperatura de 50 °C (BANKEEREE et al., 2014; PENG et al., 2012; YEGIN, 2016). Esses ensaios foram realizados em triplicata de amostras.

A cinética de desnaturação do extrato enzimático bruto foi determinada com o extrato incubado a 40, 45, 50 e 55 °C em pH 5,0 (pH de trabalho). Alíquotas foram retiradas e testada a sua atividade enzimática, o extrato foi mantido na temperatura testada até a enzima perder pelo menos 50% de sua atividade inicial. O cálculo da constante de desnaturação térmica (Kd) para cada temperatura foi determinado a partir da inclinação do gráfico logarítmico da atividade residual *versus* o tempo (PAL; KHANUM, 2011b). Os valores de meia vida da endo-

β -1,4-xilanase ($t_{1/2}$) foram estimados utilizando a Equação 2, valor D utilizando as Equações 3, e o valor z através do coeficiente angular da reta de log D *versus* temperatura.

$$t_{1/2} = \frac{(\ln 2)}{kd} \quad (2)$$

$$D = \frac{2,3026}{kd} \quad (3)$$

Onde: $t_{1/2}$ entende-se pela meia vida da enzima; kd o valor da constante de desnaturação térmica; D valor para cada temperatura.

Os parâmetros cinéticos Km e $V_{m\acute{a}x}$ do extrato enzimático bruto foram determinados para substrato xilana de madeira de faia, os ensaios de atividade foram realizados conforme o item 4.2.11.1, no intervalo de concentração de 6 a 30 mg/mL. A constante de Michaelis-Menten (Km, mg/mL) e a taxa máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$ U/mL) foram estimadas pelo gráfico duplo recíproco Lineweaver-Burk ($1/v$ *versus* $1/S$) (LINEWEAVER; BURK, 1934).

A atividade relativa (%) foi expressa como a atividade da xilanase que permaneceu após a incubação em cada temperatura ou pH em comparação com a atividade máxima observada.

4.2.9 Produção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática

Para comparativo da produção de XOs por hidrólise enzimática utilizando o extrato enzimático bruto, foram realizadas três hidrólises em condições previamente estabelecidas, apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições testadas para hidrólise enzimática de xilana de madeira de faia para síntese de XOs, com pH reacional ajustado para 5,0.

Ensaio	[Xilana] (%)	E/S (U/g)	T (°C)	Ultrassom
1	6,0	200	40	Não*
2	1,0	300	45	Não**
3	1,0	300	45	Sim**

Nota: [Xilana]: Concentração de xilana de madeira de faia; E/S: relação enzima/substrato; T: temperatura de reação; Ultrassom: Aplicação de 5 W/mL por 5 min na solução de xilana de madeira de faia 1%. **Fonte:** *Trabalhos anteriores do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações; **(AACHARY; PRAPULLA, 2009)

Inicialmente foi testada a condição maximizada para produção de XOs por uma xilanase produzida por *A. pullulans* CCT 1261, em meio contendo farelo de arroz como substrato (Ensaio 1), em estudos anteriores do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações (LMB). Para este ensaio foi utilizado solução de xilana na concentração de 6% (m/v), solubilizada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0, concentração de enzima 200 U/g de xilana (E/S), pH ajustado para 5,0, temperatura em 40 °C e agitação orbital fixa em 180 rpm, onde foram retiradas amostras em 0, 12 e 24 h de hidrólise.

Outras duas condições de hidrólise foram testadas (Ensaio 2 e 3) para comparativo da produção de XOs, no ensaio 2 foi testada a xilana de madeira de faia sem nenhum tratamento (xilana bruta), o ensaio 3 foi conduzido com a xilana pré-tratada com ultrassom na concentração de 1% (m/v), concentração a qual foi estudada a aplicação de ultrassom com 5 W/mL por 5 min no item 4.2.6. Os demais parâmetros da hidrólise foram mantidos fixos para os dois ensaios, conforme Tabela 3. Foram retiradas amostras em 0, 12 h e 24 h de hidrólise. Os parâmetros foram determinados através de maximização da produção de XOs realizada em outro trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Biosseparações.

Todas as hidrólises foram realizadas em incubadora refrigerada com agitação orbital (TE-424, TECNAL, Brasil) em frascos de 125 mL com volume reacional de 40 e 50 mL para as concentrações de 6% e 1%, respectivamente. Após a retirada de cada amostra, esta foi submetida a banho fervente por 5 min para desativação enzimática, com posterior 5 min em banho de gelo. Todas as amostras coletadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-RID) para quantificação do teor de XOs produzidos e o grau de polimerização (GP), conforme item 4.2.11.3 (AACHARY; PRAPULLA, 2008; KALLEL et al., 2015).

4.2.10 Clarificação de suco de laranja

O suco de laranja foi preparado extraindo o suco da fruta com extrator manual, após o preparo, esse foi peneirado (KALLEL et al., 2016). Amostras de 20 mL foram acondicionadas em tubos de ensaios com capacidade para 50 mL. Os ensaios foram realizados adicionando 12,5 U/mL, de extrato enzimático por mL de suco de laranja e acondicionados em banho Maria sem agitação, nas temperaturas de 45 e 50 °C incubando as amostras por 0, 30, 60 e 120 min (ADIGÜZEL; TUNÇER, 2016; BANDIKARI et al., 2015; DHIMAN et al., 2011; NAGAR; MITTAL; GUPTA, 2012). Análises em triplicata para cada tempo e uma triplicata de suco controle.

As amostras coletadas foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 10 min a 4°C e filtradas a vácuo em filtro Whatman nº 1 (DHIMAN et al., 2011; İLGÜ; SÜRMELE; ŞANLI-MOHAMED, 2018). A amostra filtrada retirada no tempo de 0 min foi determinada como controle. Foi testada a influência da temperatura no processo de clarificação do suco, as condições que apresentaram a melhor resposta de clarificação foram testadas sem o extrato enzimático bruto, para verificar a influência da temperatura.

Nas amostras centrifugadas e filtradas foi determinado o rendimento, calculado pela diferença do volume inicial e final, considerando a amostra controle, como 100% (NAGAR; MITTAL; GUPTA, 2012). A claridade do sucos foi medida através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm, com resultados expressos em % de claridade em relação à amostra controle, calculada conforme Rosmine et al. (2017). A turbidez foi determinada em turbidímetro portátil (Orbeco, modelo 966, EUA) (AOAC, 2006) e os resultados expressos em unidade de turbidez nefelométrica (NTU) na forma de redução da turbidez, comparada à amostra controle (DHIMAN et al., 2011). O teor de açúcares redutores liberados foi medido através de teste de DNS conforme Miller (1959) e expresso como aumento da concentração de açúcar em relação ao controle não tratado.

4.2.11 Determinações analíticas

4.2.11.1 Atividade enzimática de endo- β -1,4-xilanase

A determinação da atividade enzimática da endo- β -1,4-xilanase foi realizada pelo método de determinação de açúcares redutores pela reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme metodologia de Miller (1959) e Bailey, Biely e Poutanen (1992), com xilana de madeira de faia.

A unidade de quantificação de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de xilose por min, a atividade enzimática da endo- β -1,4-xilanase (U/mL) foi calculada conforme equação 4, e a atividade específica (U/mg) conforme Equação 5.

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{(A_A - A_R - A_S - A_B) \times V_R \times L_{\text{cubeta}} \times \text{FD} \times 10^3}{\alpha \times V_A \times t_R \times M_M} \quad (4)$$

Onde: A_A – Absorvância da Amostra a 540 nm; A_R – Absorvância do Reagente (DNS) a 540 nm; A_S – Absorvância do Substrato (xilana) a 540 nm; A_B – Absorvância do Branco da amostra a 540 nm; V_R – Volume de reação; L_{cubeta} – Fator da cubeta; FD – Fator de Diluição; α – Coeficiente angular da curva padrão de xilose; V_A – Volume de amostra; t_R – tempo de reação; M_M – Massa molar de xilose.

A atividade específica (U/mg) foi calculada pela razão entre a atividade enzimática (U/mL) e o teor de proteínas solúveis (mg/mL), conforme Equação 5.

$$\text{Atividade específica} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Atividade enzimática} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right)}{\text{Concentração de proteínas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)} \quad (5)$$

Para cálculo da produtividade enzimática (U/mLh) ao longo dos cultivos, foi considerado o quociente entre o valor da atividade enzimática (U/mL) e o tempo (h) em que a mesma foi obtida.

4.2.11.2 Atividade enzimática da β -xilosidase

A atividade enzimática da β -xilosidase foi determinada utilizando o substrato sintéticos pNPX (0,2%, m/v). Preparado em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987). A mistura reacional, composta por 0,8 mL da solução de substrato e 0,2 mL do extrato enzimático (convenientemente diluído) foi incubada a 50 °C por 30 min. Após, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de carbonato de sódio 10% (m/v) e o p-nitrofenol (pNP) liberado foi quantificado a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de pNP por minuto, sob as condições do ensaio.

4.2.11.3 Concentração de proteínas solúveis e pH

O teor de proteínas solúveis foi determinado conforme metodologia de Lowry et al. (1951) relacionando os resultados com a curva padrão de albumina de soro bovino construída previamente. Para determinação de pH, foram feitas medições em potenciômetro digital.

4.2.11.4 Análise de XOs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a determinação do teor de XOs e seu GP após o processo de hidrólise da xilana de madeira de faia foi aplicado CLAE. Inicialmente foi feita uma corrida com os padrões de xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetralose e xilopentose. Após, a solução hidrolisada e os sucos foram filtrados em membrana de fluoreto de polivinilideno (0,22 μm) para aplicação das amostras no cromatógrafo. O equipamento utilizado para as análises foi um cromatógrafo líquido (Prominence[®], Shimadzu, Japão) equipado com detector de índice de refração (RID-10A), forno de colunas (CTO-20A) e auto injetor (SIL-20AHT). Onde foram injetadas automaticamente alíquotas de 20 μL e eluidas com água ultrapura (Milli-Q[®], Milipore), o controle das condições cromatográficas e a aquisição de dados foi feito em Software LC Solution[®].

A coluna utilizada foi uma Aminex HPX-42A (Bio-Rad, Estados Unidos) a taxa de fluxo de 0,4 mL/min com temperatura de coluna de 50 °C e tempo de corrida de 40 min. As concentrações de xilose, xilobioses, xilotriose, xilotetraose e xilopentose foram determinadas através de curva padrão construída previamente (GAUTÉRIO et al., 2018).

4.2.12 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos com o planejamento DCC 2⁴ foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com 95% de confiança ($p < 0,05$), utilizada para estimar a diferença entre os parâmetros estatísticos, aplicada após a identificação da normalidade independência e homocedasticidade dos dados, o coeficiente de variação nos pontos centrais foi calculado com a média e desvio padrão da triplicata. As curvas de contornos das respostas foram construídas de acordo com Rodrigues e Iemma (2014). Quando necessário, foi utilizado teste de diferença de médias, comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância, e para comparação entre dois tratamentos foi utilizado o teste t ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRÉ-TRATAMENTO NA CASCA DE AVEIA

A fim de aumentar a biodisponibilidade dos constituintes do substrato para ação da levedura a casca de aveia, para uso na produção de enzimas, foi submetida a pré-tratamento, composto por dois métodos sequenciais. Após cada método do pré-tratamento foi calculada a recuperação e determinada a redução de biomassa, conforme apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Recuperação e Redução da biomassa durante o pré-tratamento na casca de aveia

Métodos	Recuperação (%)	Redução da biomassa (%)
Térmico alcalino	64,5±0,8	35,4±0,8
Ultrassom	99,5±0,3	0,4±0,3
Total do pré-tratamento	62,0±0,5	37,9±0,5

Através dos dados expostos na Tabela 4, observa-se que o método térmico alcalino apresenta a menor recuperação de biomassa, causada principalmente pela dissolução da lignina, que é carregada juntamente com a solução de NaOH filtrada. A lignina, por ser o composto mais acessível, é degradada preferencialmente, reduzindo o rendimento total de biomassa, porém essa deslignificação aumenta a disponibilidade da hemicelulose para ataque microbiano (BHUTTO et al., 2017). Kim, Lee e Kim (2016) descrevem que o hidróxido de sódio ataca efetivamente as ligações entre a lignina e a hemicelulose nos complexos lignina-carboidrato, provocando mudanças nas propriedades físicas dos sólidos tratados. O solvente cliva as ligações éter e éster da estrutura, liberando uma grande parte da lignina solúvel em álcali. Segundo Rodrigues et al. (2016), o uso de agentes alcalinos promove um inchaço das fibras, repercutindo nas ligações da hemicelulose e celulose, aumentando assim a porosidade da biomassa.

Rajagopalan, Shanmugavelu e Yang (2017) estudaram vários tipos de pré-tratamentos, alcalinos, ácidos e térmicos e dentre os estudados o tratamento térmico alcalino com 0,05 N de NaOH foi o mais eficiente para a deslignificação e retenção dos carboidratos liberados. O pré-tratamento reduziu aproximadamente 70% do conteúdo de lignina da serragem de mogno e da madeira de manga utilizadas pelos autores como substrato. Esse pré-tratamento ocasionou a menor perda de carboidratos (< 35 mg/g), por consequência maior rendimento de XOs produzidos durante a reação química.

Quando aplicado o método assistido por ultrassom, na sequência do método alcalino, no presente estudo, foi observada uma maior recuperação com aproximadamente $99,5 \pm 0,3\%$ da massa sólida da casca tratada. Como mostrados em estudos anteriores de Corrêa Junior, Mattos e Machado (2018), o conteúdo de lignina é em grande parte solubilizado no tratamento alcalino, assim quando aplicado o tratamento com ultrassom, este não modifica significativamente o teor de lignina da amostra, porém modifica as estruturas da hemicelulose. Pois a combinação destes métodos no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, aumenta a disponibilidade da hemicelulose para o micro-organismo, já que a atividade enzimática da endo- β -1,4-xilanase observada pelos autores, aumentou de 21,3 U/mL quando tratada apenas com solução de NaOH 1%, para 30,2 U/mL quando a biomassa foi tratada com os dois métodos em conjunto.

Portanto, neste trabalho a aplicação de pré-tratamento na biomassa lignocelulósica por métodos térmico alcalino seguido pelo método assistido por ultrassom apresentaram uma recuperação média total de biomassa de 62,0%. O lote de casca de aveia utilizada no presente estudo foi caracterizado por Corrêa Junior, Mattos e Machado (2018), quanto aos teores de hemicelulose, celulose e lignina, na amostra bruta (27,2%, 22,7% e 22,1%, respectivamente) e após o pré-tratamento combinado que foram aplicados no substrato lignocelulósico (26,2%, 29,5% e 7,3%, respectivamente). O conteúdo de proteínas ($3,3\% \pm <0,1$), lipídeos ($0,6\% \pm <0,1$), carboidratos totais (83,9%) e cinzas ($4,2\% \pm <0,1$), calculados em base seca na casca de aveia, também foi determinado em estudos anteriores no Laboratório de Microbiologia e Biosseparações.

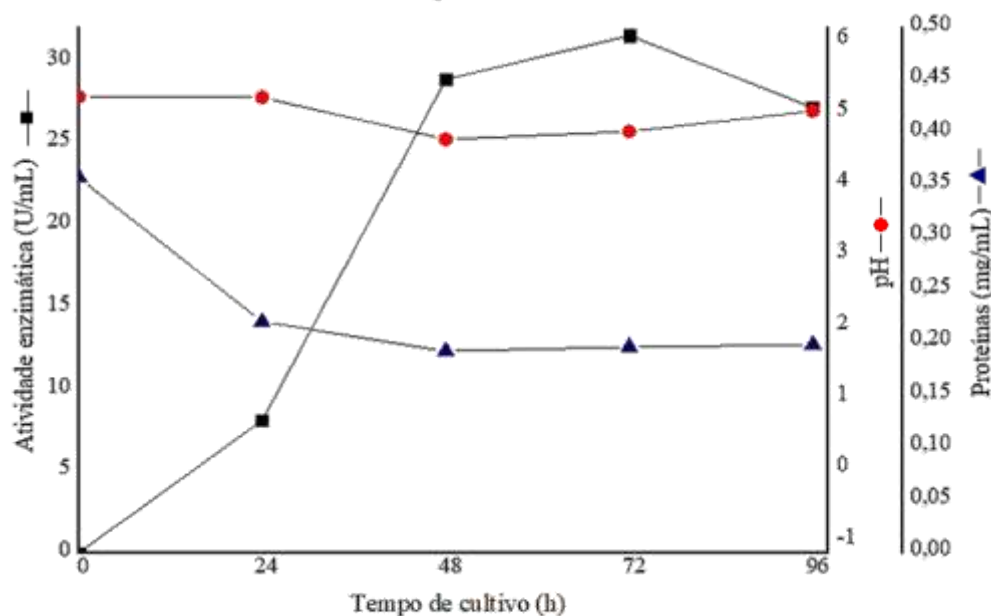
5.2 ENSAIO CONTROLE UTILIZANDO BIOMASSA PRÉ-TRATADA

Com a casca de aveia já tratada, foi realizado um cultivo onde a casca foi utilizada como substrato para produção da enzima endo- β -1,4-xilanase pelo micro-organismo *Aureobasidium pullulans* CCT 1261. O cultivo foi realizado por 96 h e a máxima atividade da enzima foi obtida nas 72 h de cultivo, com produção de $30,8 \pm 0,3$ U/mL e uma produtividade de $0,42 \pm 0,004$ U/mLh, como mostrado na Figura 3.

Os resultados de Corrêa Junior, Mattos e Machado (2018) corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, pois quando aplicado pré-tratamentos a casca de aveia, com NaOH 1% combinado ao tratamento com ultrassom, os autores obtiveram atividade de $30,2 \pm 1,8$ U/mL. Neste mesmo trabalho foi avaliada a produção da enzima endo- β -1,4-xilanase com a casca sem nenhum pré-tratamento, obtendo uma atividade enzimática de

2,6±0,0 U/mL em 48 h de cultivo, assim observa-se a eficácia dos pré-tratamentos aplicados à biomassa.

Figura 3 - Cinética de produção (atividade enzimática, pH e proteínas solúveis) de endo-β-1,4-xilanase por *A. pullulans* com casca de aveia pré-tratada.



Pode-se observar pela Figura 3, o comportamento do pH do meio de cultivo, onde ocorre uma queda mais acentuada nas primeiras 48 h de cultivo de 5,14 para 4,54, condizente com o aumento da biomassa e produção enzimática, passando de 0 U/mL para 29,67 U/mL. Porém, após as 48 h de cultivo, ocorreu um leve aumento do pH até o final do cultivo de pH 4,54 para 4,94. Esse fato também foi observado por Corrêa Junior, Mattos e Machado (2018) e Yegin et al. (2017), segundo os autores essa queda nas primeiras horas de cultivo se deve ao consumo rápido de carboidratos solúveis facilmente metabolizáveis, que resultam na geração de metabólitos ácidos levando à queda no pH. O aumento posterior do pH do meio, os autores colocam que pode ser devido ao consumo dos metabólitos ácidos e a lise celular.

Quanto ao conteúdo de proteínas ao longo do tempo de cultivo, observa-se na Figura 3, uma queda expressiva nas primeiras 24 h de cultivo, o que pode ser explicado pelo consumo de nutrientes pelo micro-organismo durante a fase de crescimento celular e produção da enzima. Após este período, o conteúdo permanece constante provavelmente pelo equilíbrio entre consumo de nutrientes e produção enzimática (YEGIN et al., 2017). A atividade enzimática de 30,8±0,33 U/mL foi utilizada como controle para os ensaios de maximização da produção enzimática, este então foi denominado de “ensaio controle”.

5.3 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDO-B-1,4-XILANASE

O processo de maximização da produção da enzima através de Delineamento Composto Central (DCC) 2^4 foi feito conforme a Tabela 5, aplicado com a finalidade de avaliar a influência das variáveis independentes, pH inicial dos meios de cultivo, concentração de casca de aveia pré-tratada, concentração de extrato de levedura e concentração de KH_2PO_4 , na produção da endo- β -1,4-xilanase. A temperatura do cultivo (28 °C), a agitação (150 rpm) e a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,5 g/L) foram fixadas no presente estudo, conforme estudos de Yegin et al. (2017).

A Tabela 5 apresenta os valores codificados e reais das variáveis independentes consideradas no planejamento DCC, assim como a atividade da enzima endo- β -1,4-xilanase obtida com os ensaios de maximização. São apresentados os valores da atividade encontrada nas 72 e 96 h de cultivo.

Tabela 5 - Matriz do delineamento DCC 2^4 , valores codificados e reais das variáveis independentes e a atividade enzimática (Ativ Enz) e a produtividade (Prod.) nas 72 e 96 h de cultivo

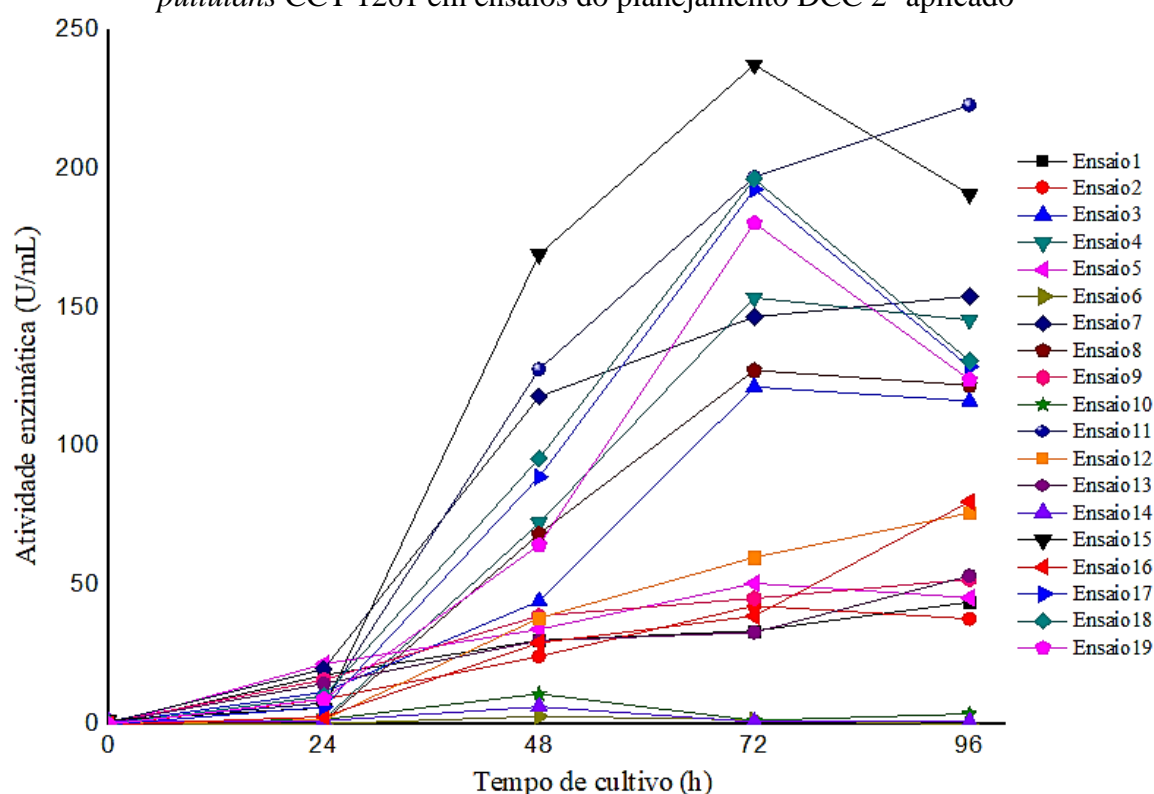
Ensaio	pH		Casca (g/L)		Extrato (g/L)		KH_2PO_4 (g/L)		Ativ Enz 72 h (U/mL)	Prod. 72 h (U/mLh)	Ativ Enz 96 h (Um/L)	Prod. 96 h (U/mLh)
1	-1	(3)	-1	(10)	-1	(0,5)	-1	(0)	33,81	0,47	44,07	0,46
2	1	(7)	-1	(10)	-1	(0,5)	-1	(0)	42,82	0,59	38,08	0,40
3	-1	(3)	1	(50)	-1	(0,5)	-1	(0)	121,51	1,69	116,44	1,21
4	1	(7)	1	(50)	-1	(0,5)	-1	(0)	153,60	2,13	145,58	1,52
5	-1	(3)	-1	(10)	1	(1,5)	-1	(0)	50,83	0,71	45,64	0,48
6	1	(7)	-1	(10)	1	(1,5)	-1	(0)	1,81	0,03	0,08	0,00
7	-1	(3)	1	(50)	1	(1,5)	-1	(0)	146,75	2,04	154,15	1,61
8	1	(7)	1	(50)	1	(1,5)	-1	(0)	127,49	1,77	122,13	1,27
9	-1	(3)	-1	(10)	-1	(0,5)	1	(5)	45,46	0,63	52,31	0,54
10	1	(7)	-1	(10)	-1	(0,5)	1	(5)	1,50	0,02	3,89	0,04
11	-1	(3)	1	(50)	-1	(0,5)	1	(5)	197,01	2,74	223,05	2,32
12	1	(7)	1	(50)	-1	(0,5)	1	(5)	60,21	0,84	76,16	0,79
13	-1	(3)	-1	(10)	1	(1,5)	1	(5)	33,19	0,46	53,53	0,56
14	1	(7)	-1	(10)	1	(1,5)	1	(5)	1,01	0,01	1,12	0,01
15	-1	(3)	1	(50)	1	(1,5)	1	(5)	237,42	3,30	190,80	1,99
16	1	(7)	1	(50)	1	(1,5)	1	(5)	39,03	0,54	80,22	0,84
17	0	(5)	0	(30)	0	(1)	0	(2,5)	192,63	2,68	128,73	1,34
18	0	(5)	0	(30)	0	(1)	0	(2,5)	196,36	2,73	130,90	1,36
19	0	(5)	0	(30)	0	(1)	0	(2,5)	198,45	2,51	124,00	1,29

A Tabela 5, apresenta os valores de atividade enzimática nas 72 e 96 h de cultivo. A atividade da enzima endo- β -1,4-xilanase variou de 1,01 U/mL no ensaio 14, para 237,4 U/mL

no ensaio 15 para 72 h de cultivo, e de 0,08 U/mL no ensaio 6 para 223,5 U/mL no ensaio 11 nas 96 h de cultivo.

Com a média e desvio padrão da triplicata do ponto central foi calculado um coeficiente de variação de 1,46% nas 72 h e 2,7% nas 96 h. Ilustrando a reprodutibilidade dos ensaios nos pontos centrais. Na Figura 4 é apresentada a cinética de acompanhamento da produção da enzima endo- β -1,4-xilanase ao longo do cultivo da levedura *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 com os ensaios do DCC utilizado.

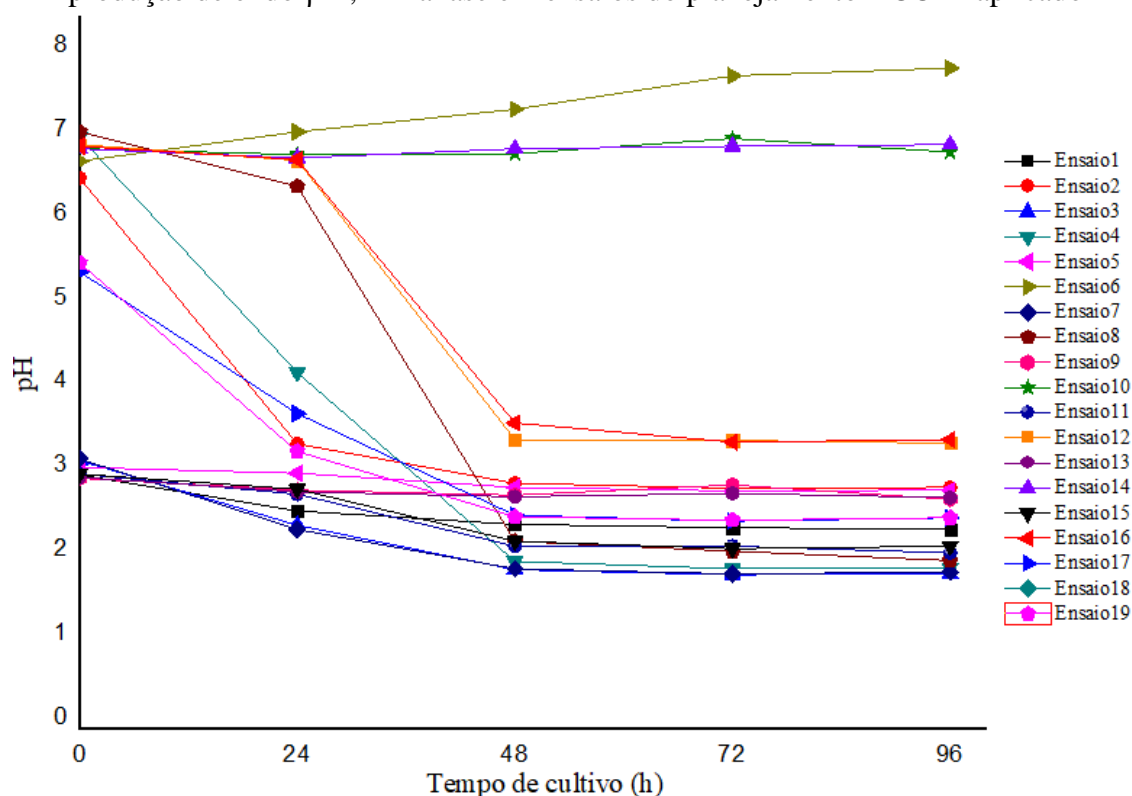
Figura 4 - Cinética da produção de endo- β -1,4-xilanase durante cultivo da levedura *A. pullulans* CCT 1261 em ensaios do planejamento DCC 2⁴ aplicado



Na Figura 4 é possível observar que 9 ensaios realizados apresentaram o pico de atividade da endo- β -1,4-xilanase nas 72 h de cultivo (ensaio 2, 3, 4, 5, 8, 15, 17, 18, 19) enquanto em 7 dos 19 ensaios o pico de produção da enzima foi nas 96 h de cultivo (ensaio 1, 7, 9, 11, 12, 13 e 16). Os 3 demais ensaios (6, 10 e 14) apresentaram picos nas 48 h de cultivo. É possível observar que esses 3 ensaios foram os que apresentaram a menor produção da enzima e exibem como característica comum o pH inicial de cultivo 7,0 e o baixo conteúdo de casca de aveia (10 g/L). Dentre os três, o ensaio 6 que não tinha KH_2PO_4 e maior concentração de extrato de levedura apresentou a menor atividade, 2,96 U/mL.

Dos 7 ensaios que obtiveram picos de produção da enzima nas 96 h de cultivo, 5 deles (1, 7, 9, 11 e o 12) apesar de maior atividade enzimática exibem uma queda da produtividade com o aumento do tempo de cultivo. Como por exemplo, o ensaio 7, com atividade de 146,74 U/mL e produtividade de 2,03 U/mLh nas 72 h, apesar da atividade aumentar até as 96 h para 154,15 U/mL, sua produtividade foi reduzida para 1,60 U/mLh com o aumento do tempo de cultivo. A produtividade da enzima aumentou apenas nos ensaios 13 e 16, com o aumento do tempo de cultivo de 72 para 96 h, passando de 0,46 para 0,55 U/mLh no ensaio 13 e 0,54 para 0,83 U/mLh no ensaio 16. Quanto ao pH do meio de cultivo a Figura 5, apresenta a cinética do pH ao longo do cultivo da levedura *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 com os ensaios do DCC utilizado.

Figura 5 - Comportamento do pH de cultivo da levedura *A. pullulans* CCT 1261 durante produção de endo- β -1,4-xilanase em ensaios do planejamento DCC 2⁴ aplicado



Quanto ao comportamento do pH ao longo dos dias de cultivo, apenas os 3 ensaios (6, 10 e o 14) que apresentaram a menor atividade enzimática, com pico nas 48 h de cultivo, não exibiram queda no pH até as primeiras 48 h. Os demais ensaios apresentaram queda acentuada até o segundo dia de ensaio, após foi observada linearidade e constância dos valores de pH. Os ensaios onde o pH inicial foi ajustado para 3,0 foram os que tiveram a queda mais suave em relação aos ensaios com pH inicial em 5,0 e 7,0.

Yegin et al. (2017) observaram o mesmo comportamento de queda principalmente nas primeiras 24 h de cultivo quando utilizada uma cepa de *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1, os autores descrevem que o pH caiu de 4,58 no início do cultivo, para 3,79 nas primeiras 24 h e com posterior aumento do pH ao longo do cultivo. Os autores associam esse fato ao alto consumo de carboidratos solúveis facilmente metabolizados que resultam na geração de metabólitos ácidos, que levam à queda do pH nas primeiras horas de cultivo. Todavia, diferentemente dos autores, no presente trabalho o pH dos meios de cultivos na grande maioria dos ensaios permaneceu constante após a queda nas 48 h. Resultados condizentes com estudos de Gautério et al. (2018), que também observaram esse comportamento de queda nas primeiras 24 h, do pH inicial de 5,0 até um pH de 3,70 mas, após esse período os valores de pH até 84 h de cultivo, apresentaram pequenas oscilações chegando a 3,88. Gautério et al. (2018) descrevem que a medida que esses carboidratos solúveis são consumidos, mais metabólitos ácidos são gerados e consequentemente o pH permanece baixo.

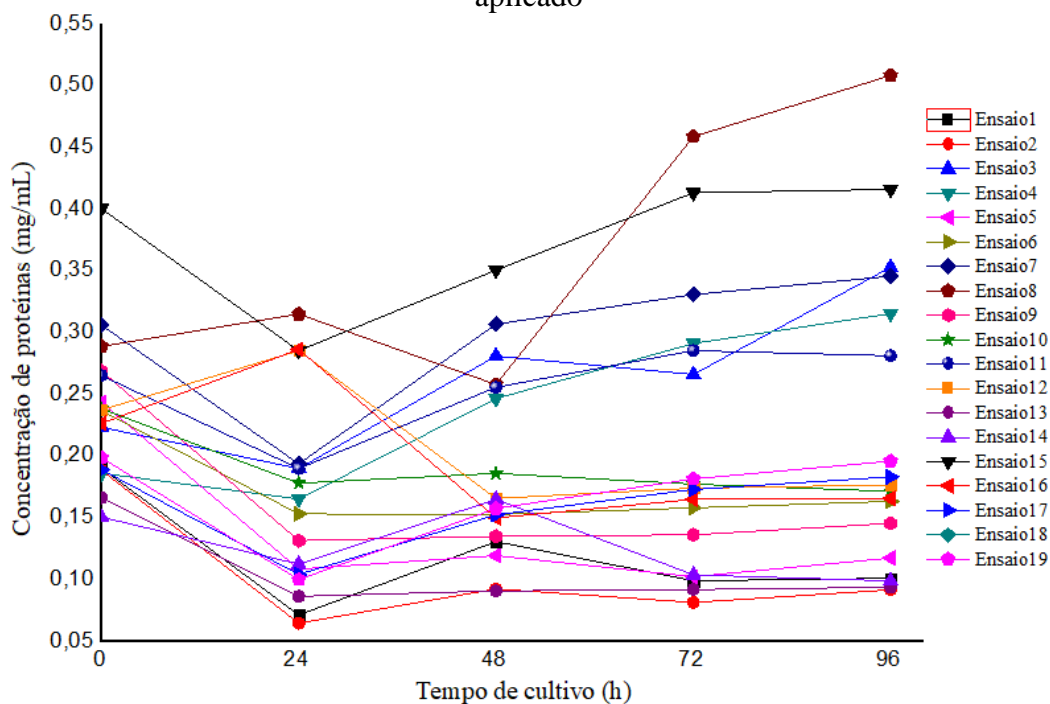
É possível verificar que valores de atividade enzimática acima de 120 U/mL, nos ensaios 3, 4, 7, 8, e nos pontos centrais em 72 h de cultivo e nos ensaios 11 e 15 em 48 h, foram obtidos quando o pH encontrava-se abaixo de 2,5. Esses resultados indicam que a produção de endo- β -1,4-xilanase por *A. pullulans* CCT 1261 utilizando casca de aveia pré-tratada como substrato, é favorecida em pH inicial ácido e beneficiada com a redução do pH ao longo do cultivo.

Por meio dos resultados expostos é possível observar o quão importante é a aplicação de metodologias de maximização para a produção de enzimas, pois observando os pontos centrais, com composição do meio de cultivo em (g/L): casca de aveia (30), extrato de levedura (1,0), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,5), KH_2PO_4 (2,5) e pH 5,0 a atividade encontrada foi de aproximadamente $195,7 \pm 2,74$ U/mL nas 72 h de cultivo. Assim, observa-se a potencialidade do aumento de casca de aveia para aumento da produção da enzima. Nessa perspectiva, entre essa composição e o meio de cultivo utilizado nos ensaios preliminares, com atividade de 30,8 U/mL, apenas a concentração de casca de aveia foi aumentada de 10 g/L para 30 g/L e o conteúdo de KH_2PO_4 que foi reduzido de 5,0 g/L para 2,5 g/L e a atividade enzimática aumentou 6,35 vezes.

Quanto ao conteúdo de proteínas, na Figura 6 é possível observar que a concentração de proteínas no meio de cultivo cai rapidamente até as 24 h, em 16 dos 19 dos ensaios realizados, fato relacionado ao consumo de nutrientes nas primeiras horas de cultivo provavelmente para o aumento de biomassa, pois como observado por Gautério et al. (2018) até as 36 h de cultivo há um aumento da biomassa celular. Entretanto, a concentração de

proteínas volta a subir após as 24 h, provavelmente devido à produção de enzimas no meio de cultivo que se eleva com aumento do tempo de processo.

Figura 6 - Comportamento do teor de proteínas solúveis do cultivo da levedura *A. pullulans* CCT 1261 durante produção de endo- β -1,4-xilanase em ensaios do planejamento DCC 2⁴ aplicado



Com base no conteúdo de proteínas, apresentado na Figura 6, foi possível determinar a atividade específica, que diferentemente da atividade enzimática, foi maior nos pontos centrais com, aproximadamente 788,35 U/mg, seguida pela atividade do ensaio 15 de 574,45 U/mg e do ensaio 11 com 528,68 U/mg, nos seus picos de produção 72, 72 e 96 h, respectivamente. O comportamento observado nos pontos centrais, é devido a elevada atividade observada nestes ensaios, em média $195,7 \pm 2,74$ U/mL, e ao reduzido conteúdo de proteínas, em média $0,26 \pm 0,010$ mg/mL, que provavelmente é devido a menor concentração de casca presente no meio de cultivo em relação aos ensaios 11 e 15. Observa-se que os ensaios onde foi aplicada a menor concentração de casca de aveia (1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 e 14) foram os que obtiveram a menor concentração de proteínas, resultados que corroboram com o observado nos pontos centrais. O ensaio 6 apresentou a menor atividade específica 12,95 U/mg nas 48 h de cultivo, como já era esperado devidos à baixa atividade enzimática observada.

Os resultados experimentais do planejamento DCC 2⁴, nas 72 h de cultivo foram avaliados através de ANOVA com 90% de confiança. A concentração de casca de aveia, pH e

interação pH e KH_2PO_4 foram significativos no processo, porém o modelo apresentou coeficiente de correlação de R^2 de 0,75, relação $F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}}$ de 1,34. Visto, a baixa correlação do modelo e da relação F, foi feita a análise com a resposta das 96 h de cultivo com 95% de confiança. Verificou-se que com esta resposta obtêm-se um modelo de melhor correlação, e a análise do modelo está descrita a seguir. Na Tabela 6 estão apresentados os efeitos das variáveis estudadas e as interações entre elas.

Tabela 6 - Efeitos das variáveis (Ef), Coeficiente de Regressão (CR), Erro Padrão (EP), valor-t e nível de significância (p-valor) para a resposta atividade da endo- β -1,4-xilanase nas 96 h de cultivo da levedura

Variável independente	Ef	CR	EP	t(8)	p-valor
Média*	91,11	91,11	7,79	11,69	<0,05*
pH*	-51,59	-25,80	8,49	-3,04	0,01*
Casca de Aveia *	108,72	54,36	8,49	6,40	<0,05*
Extrato de Levedura	-6,49	-3,25	8,49	-0,38	0,71
KH_2PO_4	1,87	0,93	8,49	0,11	0,91
pH x Casca	-13,50	-6,75	8,49	-0,79	0,44
pH x Extrato	-8,55	-4,28	8,49	-0,50	0,62
pH \times KH_2PO_4 *	-37,98	-18,99	8,49	-2,24	0,05*
Casca x Extrato	3,01	1,50	8,49	0,18	0,86
Casca x KH_2PO_4	6,12	3,06	8,49	0,36	0,72
Extrato x KH_2PO_4	-0,95	-0,47	8,49	-0,06	0,95

Nota: Valores com * correspondem a variáveis significativas ($p < 0,05$)

Com base nos resultados expostos na Tabela 6 a equação foi construída utilizando as variáveis significativas ($p < 0,05$), pH inicial do cultivo, concentração de casca de aveia e a interação pH e KH_2PO_4 . Com os coeficientes regressão, foi possível a construção da Equação 7 codificada que descreve o comportamento da produção da enzima ao longo do cultivo.

$$\text{Ativ. enzimática} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = 91,11 - 25,80 \text{ pH} + 54,36 \text{ Casca de Aveia} - 18,99 \text{ pH} \times \text{KH}_2 \quad (7)$$

Com a Equação 7 foram calculados os valores preditos pelo modelo e os desvios relativos aos valores experimentais, todos apresentados na Tabela 7. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) a fim de verificar se o modelo obtido na Equação 7 é preditivo e significativo para a variável resposta.

Na Tabela 7 são observados valores de desvios altos para alguns pontos, mas esses desvios não são dos pontos de maior atividade enzimática. Na zona de interesse (ensaios 11 e 15) foram observados desvios menores que 15%, assim observa-se que nestes pontos o modelo descreve a produção da enzima.

Tabela 7 - Valores reais e preditos pelo modelo para a variável resposta, atividade enzimática e o desvio relativo entre os valores obtidos.

Ensaio	Reais (U/mL)	Preditos (U/mL)	Desvio relativo (%)
1	44,08	43,55	1,19
2	38,09	29,93	21,41
3	116,45	152,27	-30,76
4	145,58	138,65	4,76
5	45,64	43,55	4,58
6	0,08	29,93	-35847,13
7	154,15	152,27	1,22
8	122,13	138,65	-13,53
9	52,32	81,53	-55,84
10	3,90	-8,05	306,49
11	223,05	190,25	14,71
12	76,16	100,67	-32,17
13	53,54	81,53	-52,29
14	1,13	-8,05	815,06
15	190,80	190,25	0,29
16	80,22	100,67	-25,49
17	128,74	91,10	29,23
18	130,90	91,10	30,41
19	124,13	91,10	26,61

A Tabela 8 apresenta a ANOVA para o planejamento experimental proposto, avaliada com nível de significância de 5%, onde são apresentados os valores de F e coeficiente de determinação (R^2) e correlação (R). As variáveis que não apresentaram efeitos significativos foram adicionadas a falta de ajuste do modelo.

Tabela 8 - ANOVA para a atividade de endo- β -1,4-xilanase do DCC 2⁴

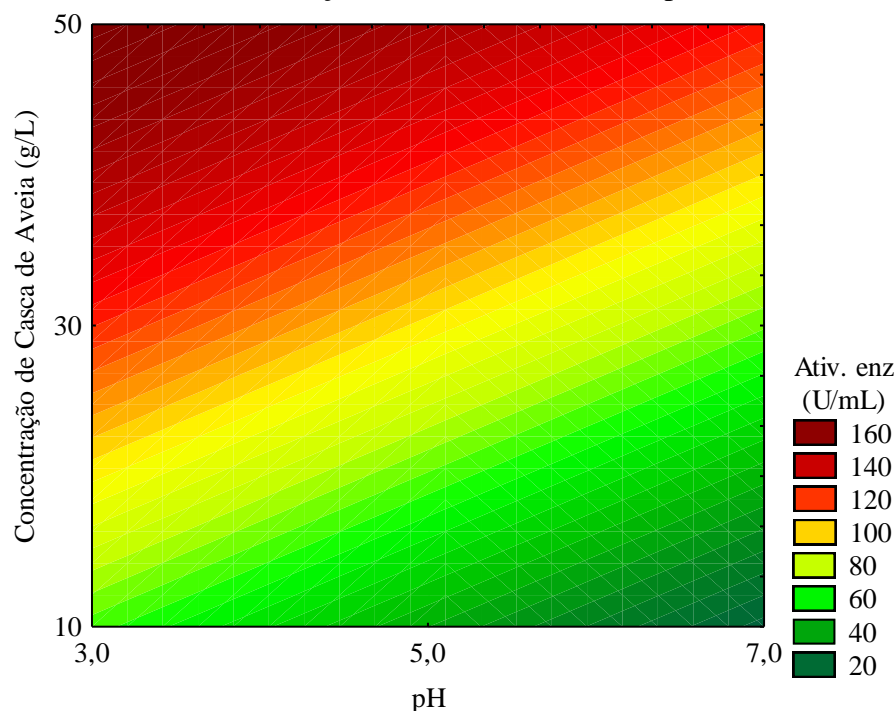
Fonte de Variação	GL	SQ	MQ	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab	R	R²
Regressão	3	63700,10	21233					
Resíduo	15	10620,12	708,01	29,99	3,29	9,11	0,85	0,93
Total	18	74320,26	-					

Nota: GL: Graus de Liberdade; SQ: Soma dos quadrados; MQ: Média dos quadrados; Fcal: Valor F calculado; Ftab: Valor F tabelado; Fcal/Ftab: Relação F; R: coeficiente de determinação; R^2 : Coeficiente correlação

De acordo com a Tabela 8, observa-se um coeficiente de correlação de 0,93 e valor da relação de F calculado pelo F tabelado de 9,11 vezes. Com um coeficiente de variação de 2,70% nos pontos centrais, correlação do modelo de 93% e a relação entre os fatores F maior que 5, observa-se que o modelo é preditivo e significativo para os dados experimentais e assim, pode ser utilizado para construção das curvas de contorno da produção de endo- β -1,4-xilanase

(RODRIGUES; IEMMA, 2014). A curva de contorno apresentada na Figura 7 representa a atividade enzimática em função da concentração de casca de aveia e pH.

Figura 7 - Curva de contorno para a atividade de endo- β -1,4-xilanase em função da concentração de casca de aveia e do pH.



Com a curva mostrada na Figura 7, observa-se que o ponto de maior produção da endo- β -1,4-xilanase é com a maior concentração de casca de aveia tratada e menores níveis de pH inicial do cultivo. No entanto, observa-se que mesmo em condições de pH mais elevado, ocorre aumento na produção da enzima com o aumento da concentração de casca no meio de cultivo. Esse fato provavelmente ocorre porque o aumento do teor de casca gera maior disponibilidade de nutrientes, especialmente xilana, para o desenvolvimento microbiano e produção de biocompostos.

Estudos relatam que a biossíntese de xilanases é regulada pela presença de xilana, pois esse polissacarídeo de alta massa molecular não pode penetrar a parede celular dos microorganismos, assim baixas concentrações da enzima são produzidas e excretadas continuamente para a quebra desse composto em fragmentos de baixa massa molar. Após a hidrólise das substâncias poliméricas, essas pequenas partículas formadas penetram a membrana da célula induzindo-a a produzir mais enzimas do complexo (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

O aumento da produção de xilanases com o aumento da concentração de hemicelulose também foi observado por outros autores como, estudos de Gautério et al. (2018), com o cultivo de *A. pullulans* CCT 1261, utilizando cinco substratos agroindustriais distintos mostraram que a maior atividade enzimática de endo- β -1,4-xilanase foi alcançada com o substrato que apresentou maior conteúdo de hemicelulose, farelo de arroz com 29,6%, que apresentou uma produção de endo- β -1,4-xilanases de $11,7 \pm 0,1$ U/mL. O mesmo comportamento foi observado por Oliveira, Porto e Tambourgi (2006) quando avaliaram a produção de xilanases por *Penicillium janthinellum* por diferentes substratos agroindustriais observaram maior produção com espiga de milho (54,8 U/mL) e casca de aveia 55,3 U/mL, substratos com elevado conteúdo de hemicelulose entre os avaliados, 42,5% e 31-38,4%, respectivamente.

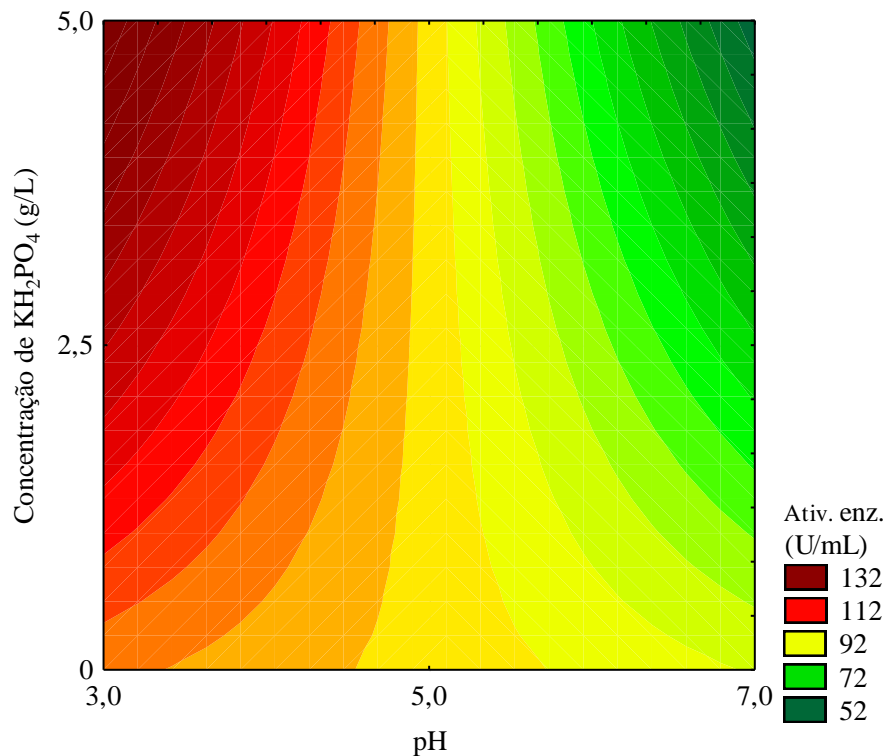
Outros autores como Cao et al. (2008) e Terrasan et al. (2010) também observaram aumento da produção enzimática com aumento da concentração de substratos agroindustriais no meio de cultivo até uma certa concentração, para valores mais elevados os autores observaram decréscimo da produção enzimática. Yegin (2016) também observou esse comportamento quando aumentou o conteúdo de caule de alcachofra no meio de cultivo de 1 para 5%, obtendo atividade de 66,48 (U/mL). Entretanto, o autor descreve que o aumento superior da concentração de substrato não foi possível devido à característica insolúvel do caule que impediu o ajuste adequado do pH inicial do meio. Javed, Aman e Qader (2017) também verificaram interferência de elevado conteúdo de substrato na produção enzimática, quando os autores testaram concentrações de 5 a 20 g/L observaram aumento da produção, contudo quando testaram concentração de 25 g/L de substrato verificaram um efeito inibitório, que atribuíram ao aumento da viscosidade do meio, causando a inibição da produção da enzima.

Quanto ao comportamento da produção da enzima com a mudança do pH, observa-se que a levedura quando submetida a condições mais ácidas aumenta a indução da produção da enzima, o que também é observado ao longo do cultivo com a queda do pH do meio. Li et al. (2007) avaliaram a influência do pH (6,3 a 9,7) e da concentração de farelo de trigo (13,2 a 46,8 g/L) na produção da enzima endo- β -1,4-xilanase por *Penicillium oxalicum* ZH-30. Os autores relataram que a produção diminuiu gradualmente com o aumento do pH, quando a concentração de farelo estava na menor concentração, assim, quando elevaram a concentração do substrato e mantiveram o pH no nível mais baixo, observaram um aumento na produção da enzima no meio reacional.

Yegin et al. (2017), relatam que geralmente fungos produzem xilanases em valores de pH mais ácidos, enquanto as bactérias produzem xilanases em pH mais básico. Os autores

observaram um aumento na atividade da enzima quando aplicado processo de otimização, utilizando farelo de trigo como substrato. Os autores encontraram uma atividade de endo- β -1,4-xilanase de 85,2 U/mL no meio de cultivo composto por: 10 g/L de farelo de trigo, 5 g/L de concentração de KH_2PO_4 , 1 g/L de extrato de levedura e pH do meio ajustado para 4,0. Observaram ainda, que o pH tem profundo efeito na acessibilidade das enzimas xilanolíticas às ligações xilosídicas, dependendo da natureza da biomassa lignocelulósica utilizada. Na Figura 8 a curva de contorno remete a atividade enzimática em função da concentração de KH_2PO_4 e do pH inicial do meio de cultivo.

Figura 8 - Curva de contorno para a atividade de endo- β -1,4-xilanase em função da concentração de KH_2PO_4 e do pH



Yegin (2016) observou em seus estudos com cepa de *Aureobasidium pullulans* que a maior atividade de endo- β -1,4-xilanase foi obtida em pH 4,0, dentro da faixa testada pelo autor. Com redução da atividade com valores de pH mais elevados e atividade praticamente insignificante com pH 7,0 e superiores. O autor descreve ainda que a descoberta de novas enzimas microbianas com propriedades únicas é de grande importância para vários setores. Assim, enzimas ácidas principalmente obtidas de micro-organismos extremofílicos ganham muita atenção, uma vez que podem adaptar-se facilmente às condições extremas de

bioprocessos. Por exemplo, durante a produção de bioetanol, onde o uso de enzimas acidófilas favorece os processos onde o ajuste de pH não é economicamente favorável.

Na Figura 8 é possível observar o comportamento da produção de endo- β -1,4-xilanases com as variações na faixa de KH_2PO_4 , em que o aumento desses compostos juntamente com a redução do pH resultam em aumento da produção enzimática pela levedura. Porém, quando utilizadas concentrações maiores em pH ocorre a redução da atividade enzimática. Efeitos negativos na produção de endo- β -1,4-xilanases, quando utilizados pH acima de 5,0 e elevadas concentrações de KH_2PO_4 também foram observados por Otero (2015) e Lopes (2010), quando avaliaram a produção de endo- β -1,4-xilanases por leveduras observaram que a remoção do fosfato de potássio do meio de cultivo, com pH maior que 5,0, aumentou a produção da enzima. O mesmo comportamento foi observado no presente estudo, porém quando utilizados valores de pH abaixo de 5,0 esse fato não foi observado e o aumento da concentração foi favorável para a resposta de produção da enzima.

Resultados semelhantes foram observados por Bankeeree et al. (2016) quando maximizaram a produção de xilanases por *A. pullulans* CBS 135684, observaram efeitos significativos da concentração de KH_2PO_4 no meio de cultivo para a produção enzimática e verificaram maior produção com aumento da concentração até 1,4 g/L do composto no meio.

No presente estudo devido a restrições operacionais para um novo planejamento, objetivando a otimização do processo, tais como dificuldades de ajuste de pH com o aumento da concentração de casca de aveia e redução do pH inicial, foi realizado na sequência do estudo a validação do planejamento DCC aplicado.

O modelo matemático foi validado, por triplicata de ensaios na condição de maior atividade enzimática (ensaio 11) obtida com os ensaios do DCC nas 96 h de cultivo. Com os ensaios foi observado um desvio relativo de 3,02% entre o valor real ($185,2 \pm 0,5$ U/mL) e o predito pelo modelo (190,25 U/mL), observando que o modelo se adapta bem ao comportamento da produção da enzima.

Embora a concentração do extrato de levedura não tenha apresentado efeitos significativos no modelo matemático validado, nas cinéticas de produção enzimática (Figura 4) observa-se que o aumento da concentração desse composto antecipa a produção da enzima. Assim, dois ensaios adicionais foram realizados com diferentes concentrações do composto e seu efeito na atividade enzimática e na produtividade foram observados. Com as condições validadas dos demais compostos, foram comparadas as concentrações de 0,5 e 1,5 g/L do extrato de levedura, ensaios A e B, respectivamente, com amostras coletadas nas 72 e 96 h de cultivo (Tabela 9).

Tabela 9 – Ensaios adicionais, avaliação da atividade enzimática e produtividade com variações na concentração de extrato de levedura

Ensaios	72 h de cultivo		96 h cultivo	
	Atividade (U/mL)	Produtividade (U/mLh)	Atividade (U/mL)	Produtividade (U/mLh)
A	154,1 ± 2,6 ^c	2,1 ± 0,1 ^B	185,2 ± 0,5 ^b	1,9 ± 0,1 ^C
B	196,5 ± 2,0 ^a	2,7 ± 0,0 ^A	184,3 ± 3,3 ^b	1,9 ± 0,0 ^C

Nota: letras minúsculas iguais representam valores sem diferença estatística em teste Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na coluna representam valores estatisticamente diferentes, em teste Tukey ($p < 0,05$).

Observou-se aumento do rendimento e redução do tempo de cultivo com aumento da concentração de extrato de levedura. O teste de diferença de médias teste de Tukey com 95% de confiança foi aplicado na triplicata de ensaios. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) tanto na atividade como na produtividade do ensaio B nas 72 h de cultivo, $196,49 \pm 2,00$ U/mL e $2,73 \pm 0,02$ U/mLh, respectivamente. Assim, verifica-se a maximização da produção enzimática com aumento de 6,37 vezes a produção da enzima em relação ao ensaio controle (30,8 U/mL), com meio de cultivo não maximizado.

Outros autores também obtiveram aumento significativo na produção de xilanases, com aplicação de planejamento experimental para maximização da produção, com utilização de substrato agroindustrial, como por exemplo, Bankeeree et al. (2016) obtiveram aumento de 2,1 vezes a produção enzimática, com atividade final de 8,74 U/mL. Anthony et al. (2016) obtiveram uma atividade maximizada de 25,32 U/mL, após aplicação de método estatístico DCC, com aumento de 5 vezes da atividade não otimizada. Raza, Bashir e Tabassum (2019) obtiveram aumento de 1,94 vezes a produção de xilanase com meio otimizado, com atividade final de 5,69 U/mL. Yegin, (2016), obteve aumentos de quase 6 vezes a produção otimizada com atividade final de 66,48 U/mL.

Assim, foram selecionadas as condições do ensaio B, com concentração de 50 g/L de casca de aveia pré-tratada, 5,0 g/L de KH_2PO_4 , pH inicial ajustado pra 3,0 e 1,5 g/L de extrato de levedura, como meio de cultivo para produção maximizada da endo- β -1,4-xilanase por *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, utilizando como fonte de xilana casca de aveia pré-tratada.

5.4 APLICAÇÃO DE ULTRASSOM NO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

A aplicação de ondas ultrassônicas foi testada no extrato enzimático bruto, a fim de verificar o efeito dessas na atividade enzimática da endo- β -1,4-xilanase. Como pode ser observado na Tabela 10, das diferentes intensidades ultrassônicas aplicadas, 1,0 W/mL na

temperatura de 40 °C por tempo de 3 min mostrou-se estatisticamente melhor que as demais condições testadas.

Tabela 10 – Extratos tratados com ultrassom nas frequências de 0,5, 1, 1,6, 3,0, 5,0 e 7,0 W/mL na temperatura de 40 °C nos tempos de 1, 3 e 5 min

Intensidade (W/mL)	Tempo (min)	Atividade extrato bruto (U/mL)	Atividade extrato sonicado (U/mL)	Atividade relativa (%)
0,5	1	316,0±1,5	278,5±10,3	-11,9 ±1,1 ^{cd}
	3	316,0±1,5	282,8±6,0	-10,5±1,9 ^{de}
	5	316,0±1,5	281,9±2,3	-10,8±0,7 ^{de}
1,0	1	309,5±2,1	299,6±4,5	-3,2±1,4 ^{bc}
	3	264,7±0,7	272,1±1,3	2,6±0,8 ^a
	5	264,7±0,7	256,5±7,0	-3,1±2,6 ^{bc}
1,6	1	316,0±1,5	277,0±4,9	-12,3±1,6 ^{de}
	3	316,0±1,5	277,3±4,8	-12,2±1,5 ^{de}
	5	316,0±1,5	275,0±2,6	-12,9±0,8 ^{de}
3,0	1	316,0±1,5	278,5±8,4	-11,9±2,6 ^{de}
	3	316,0±1,5	278,3±8,2	-11,9±2,6 ^{de}
	5	316,0±1,5	272,6±4,1	-13,7±1,3 ^e
5,0	1	316,0±1,5	284,2±7,4	-10,0±2,3 ^{de}
	3	316,0±1,5	279,3±3,7	-11,6±1,2 ^{de}
	5	316,0±1,5	283,2±4,8	-10,4±1,5 ^{de}
7,0	1	295,1±0,5	291,1±2,9	-10,8±0,9 ^{de}
	3	295,1±0,5	251,9±1,5	-14,6±0,5 ^e
	5	295,1±0,5	254,6±2,1	-13,7±0,7 ^{de}

Nota: Letras iguais indicam que não há diferença estatística ao nível de 5% de significância

Os resultados encontrados ilustram que a aplicação de ondas ultrassônicas no extrato enzimático bruto de endo-β-1,4-xilanase de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, podem acarretar em leve aumento da atividade quando comparado ao extrato sem tratamento. Assim, observa-se que as intensidades, tempos e temperaturas testadas não foram muito favoráveis para a enzima e em alguns casos causaram a redução da atividade inicial em relação ao extrato bruto sem tratamento. Das condições testadas, 1 W/mL por 3 min apresentou um aumento de 2,6±0,8% da atividade da enzima e não mostrou desnaturação durante o processo, apresentando diferença significativa, em teste Tukey (p<0,05) em relação as demais condições testadas.

Segundo Islam, Zhang e Adhikari (2014) a ação do ultrassom nas enzimas pode perturbar as ligações fracas, induzir a mudanças conformacionais na sua estrutura, podendo levar a inativação de muitas enzimas. Os efeitos cavitacionais em combinação com a frequência de irradiação podem promover a formação de radicais livres, que atuam alterando as enzimas.

Frequências de 0-100 kHz são fortemente absorvidas e podem levar ao rompimento da estrutura e afetar sua estabilidade e por vezes causar desnaturação enzimática.

Resultados semelhantes foram observados por Dalagnol et al. (2017), quando avaliaram a aplicação de ondas ultrassônicas no extrato enzimático de pectinases, xilanases e celulases, observaram que para as enzimas pectinases e xilanases não foram observados aumentos significativos da atividade enzimática pela pré-sonicação do extrato. Porém, quando o mesmo pré-tratamento foi aplicado a celulase os autores observaram um aumento de 40% da atividade enzimática com a solução pré-sonicada por 30 min em banho ultrassônico.

Silva et al. (2014), também avaliaram o pré-tratamento de xilanase com ultrassom e gás liquefeito de petróleo (GLP), observaram que quando aplicado apenas o GLP a atividade enzimática teve um acréscimo de até 250%, porém quando aplicado GLP combinado ao sistema de ultrassom não foi observada nenhuma melhora na atividade enzimática sob nenhuma das condições testadas pelos autores.

Estes dados mostram a instabilidade de xilanases quando submetidas a processos de pré-tratamento com ultrassom. Contudo, como foi observado um leve aumento da atividade com a intensidade de 1 W/mL, foram realizados ensaios adicionais com a temperatura de 40 °C e com o processo em banho de gelo e os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Aplicação de ultrassom no extrato enzimático bruto, na intensidade de 1 W/mL por 1, 3 e 5 min, comparativo da temperatura de 40 °C e 4 °C (banho de gelo).

Tempo (min)	Temp. (°C)	Ativ. Bruto (U/mL)	Ativ. Sonicado (U/mL)	Ativ. Relativa (%)
1		302,0±0,5	290,2±2,6	-3,9±0,8 ^b
3	4,0	274,5±0,8	283,1±1,4	3,1±0,5 ^a
5		274,5±0,8	268,2±1,9	-2,3±0,7 ^b
1		302,0±0,5	291,9±1,4	-3,6±0,4 ^b
3	40,0	255,0±0,2 ^B	265,4±1,5 ^A	4,1±0,7 ^a
5		255,0±0,2	251,8±2,5	-2,4±0,4 ^b

*Nota: Letras iguais indicam que não há diferença estatística ao nível de 5% de significância em teste Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística em teste t (p<0,05).

Como pode ser observado a temperatura elevada do processo (40 °C), não apresenta diferença estatística (p<0,05) em relação a temperatura em banho de gelo (4 °C). Foi observado um aumento da atividade enzimática de no máximo 4,1% em banho a 40 °C por 3 min com intensidade de 1 W/mL. Observa-se ainda que a amostra sonicada nessa intensidade, tempo e temperatura apresenta diferença estatística em teste t (p<0,05) em relação a atividade do extrato bruto, mostrando o efeito significativo do tratamento sobre a atividade da endo-β-1,4-xilanase. Ladole, Mevada e Pandit (2017) descrevem que um aumento da atividade enzimática pode ser

observado pois as ondas ultrassônicas causam modificações estruturais que facilitam a interação com os sítios ativos do substrato.

Apesar do baixo percentual de aumento da atividade, observa-se resultados semelhantes na literatura, com processo aplicado em alcalase. Estudos de Huang et al. (2010) quando avaliaram a aplicação de ondas ultrassônicas no extrato de alcalase na concentração de 0,33 g/L, através de sonda na frequência de 20 kHz verificaram máximo aumento da atividade de 5,8% em relação ao controle, com a aplicação de potência de 80 W sobre 200 mL de solução de alcalase (intensidade de 0,5 W/mL) por 4 min de processo. Assim como no presente estudos, os autores observaram que em tratamentos com tempo mais prolongados a atividade da alcalase apresentava queda em relação ao controle, e descrevem que esta queda é provavelmente ocasionada pela pressão excessiva, temperatura e força de cisalhamento gerada pelo tratamento ultrassônico.

Além dos testes de aplicação de ultrassom no extrato enzimático bruto, foi testado a aplicação de ultrassom no substrato reacional (xilana de madeira de faia, solução 1%), para observarmos se alguma modificação na estrutura da xilana aumentaria a produção de açúcares redutores por ação do extrato enzimático. Na Tabela 12, observa-se as diferentes condições testadas na xilana e a atividade relativas observadas com os tratamentos aplicados.

Tabela 12– Solução de xilana de madeira de faia tratada com ultrassom nas intensidades de 1, 3, 5 e 7 W/mL na temperatura de 40 °C por 1, 3 e 5 minutos, previamente ao uso na atividade enzimática

Intensidade (W/mL)	Tempo (min)	Atividade Relativa (%)
1,0	1	-5,5±0,6 ^{de}
	3	-0,9±0,5 ^{bcd}
	5	3,6±0,8 ^b
3,0	1	-2,5±1,5 ^{cde}
	3	-6,6±0,6 ^e
	5	-5,5±0,5 ^{de}
5,0	1	12,8±1,8 ^a
	3	14,5±0,9 ^a
	5	16,6±1,3 ^a
7,0	1	-2,8±0,4 ^{cde}
	3	1,6±0,1 ^{bc}
	5	1,8±1,3 ^{bc}

Nota: Letras iguais indicam que não há diferença estatística ao nível de 5% de significância em teste Tukey

Quando testado o uso de ondas ultrassônicas para pré-tratamento do substrato, constatou-se que a aplicação de 5,0 W/mL, antes da reação de atividade enzimática, proporcionou um aumento máximo de 16,6% na atividade da endo-β-1,4-xilanase, quando

aplicado na temperatura de 40 °C, com tempo de 5 min de processo. Os tempos 1, 3 e 5 min nesta intensidade, não apresentaram diferença significativa entre si. Mostrando que provavelmente essa intensidade ultrassônica modifica a estrutura da xilana, proporcionando uma ação mais eficiente da enzima sobre o substrato durante a reação.

Resultados de Dalagnol et al. (2017) corroboram com os resultados desta pesquisa, quando pré-sonicaram os substratos para as reações de atividade enzimática de xilanases, pectinases e celulases, observaram que a atividade aumentou pela pré-sonicação do substrato da reação. Quando aplicaram o tratamento em banho ultrassônico por 5 min na solução de xilana de madeira de faia, observaram um aumento de 25% na atividade da endo- β -1,4-xilanase, comparado ao controle, os autores descrevem que o ultrassom pode ter agido na cadeia da xilana, reduzindo seu tamanho e facilitando a ligação entre enzima e substrato.

Assim, observa-se a eficiência do uso de ondas ultrassônicas no extrato enzimático bruto e na xilana de madeira de faia, pois quando o método foi aplicado em ambos os casos, foi possível um aumento significativo da atividade enzimática. Observa-se que a pré-sonicação do substrato reacional proporciona um aumento maior da atividade em comparação com o método aplicada diretamente a enzima, provavelmente pelas mudanças conformacionais causadas na cadeia da xilana pela forma ultrassônica. Assim, para a produção de XOs foi testado o uso da xilana tratada com ultrassom na intensidade de 5,0 W/mL por 5 min, pois como o tempo não apresenta diferença estatística na atividade relativa, escolheu-se o menor tempo de aplicação, para o tratamento do substrato da hidrólise.

5.5 PURIFICAÇÃO PARCIAL COM SULFATO DE AMÔNIO.

A purificação parcial do extrato enzimático bruto foi realizada conforme método de precipitação fracionada de 0-30% e 30-60% de concentração de sulfato de amônio. O processo foi testado com o pH final do cultivo. Os resultados de purificação e recuperação são encontrados na Tabela 13.

Na Tabela 13 observa-se um fator de purificação de 0,7 vezes na fração precipitada com 60% do sal, mostrando que não houve purificação da enzima de interesse. Através da recuperação da enzima, $9,1 \pm 0,2\%$, observa-se que a mesma foi perdida no processo, provavelmente por desnaturação devido ao teor de sal. Com a baixa recuperação e o baixo fator de purificação encontrados, observa-se que a utilização do processo de purificação não se justifica, visto que perde-se mais de 90% da atividade inicial do extrato enzimático de endo- β -1,4-xilanase.

Tabela 13 - Precipitação fracionada do extrato enzimático bruto com sulfato de amônia nas concentrações de 0-30% e 30-60%

Amostras	Atividade (U/mL)	Atividade Total (U)	Recuperação (%)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
Bruto	250,6±0,2	12531,4±1,2	100%	0,6±0,0	399,9±1,2	1,0
Prec. 30%	9,0±0,5	226,1±11,4	1,8±0,1	0,2±0,0	55,4±5,1	0,1±0,0
Sob. 30%	222,5±0,0	11635,1±88,9	92,8±0,7	-	-	-
Sob. 60%	0,0±0,0	0,0±3,6	0,0±0,0	-	-	-
Prec. 60%	45,7±1,0	1142,1±26,2	9,1±0,2	0,16±0,0	286,4±12,4	0,7±0,0

Nota: Prec.: Fração precipitada com concentrações de 30 e 60% de sulfato de amônio; Sob: Fração sobrenadante resultante da remoção da fração precipitada a 30 e 60% de sulfato de amônio.

Alguns estudos utilizando purificação por precipitação com sulfato de amônia para extrato de xilanases, também observaram elevadas perdas de enzima ao final do processo, como estudos de Archana, Amit e Dharm, (2017) que purificaram parcialmente xilanase de *A. flavus* ARC-12, observaram uma purificação de 2,8 vezes porém verificaram uma perda de 55% da enzima inicial do extrato. Chen et al. (2019) quando purificaram uma xilanase (AfXynA) de *Aspergillus flavus* também observaram perdas de atividade com apenas 46,7% da enzima recuperada ao final do processo. Bakir et al., (2001), quando purificaram extrato bruto de xilanase de *R. oryzae*, constataram uma purificação de 2,5 vezes, porém houve uma perda grande de enzimas, assim como no presente estudo, os autores observaram uma recuperação de 12,3%.

Estes resultados mostram que algumas xilanases produzidas por fungos filamentosos e leveduras não são estáveis a elevadas concentrações de sal aplicadas no processo de purificação por precipitação com sulfato de amônia, causando grandes perdas de enzima ao longo do processo, por este motivo, no presente estudo optou-se por utiliza-la na forma bruta.

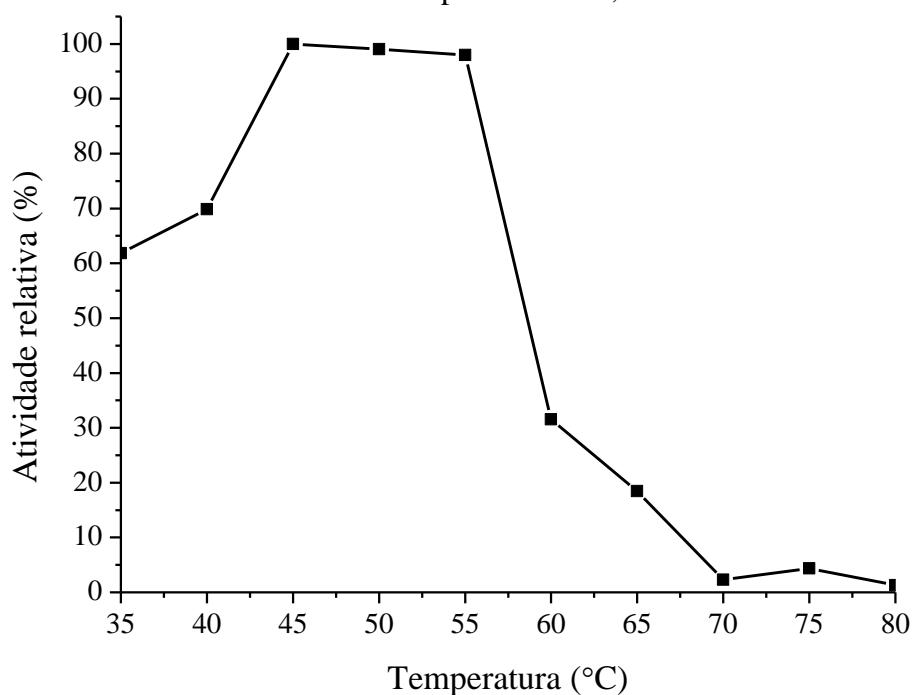
5.6 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA BRUTA

A caracterização do extrato enzimático bruto foi realizada, quanto à temperatura e pH ótimo de atuação da enzima, determinação de K_m e $V_{máx}$ para xilana de madeira de faia e parâmetros de estabilidade térmica da endo- β -1,4-xilanase, determinação de meia vida ($t_{1/2}$), da constante de desnaturação térmica (K_d), valores D e z para cada temperatura utilizada.

5.6.1 Temperatura ótima de atuação da endo- β -1,4-xilanase

Um dos principais fatores que influencia na ação das enzimas é a temperatura, assim, cada enzima apresenta uma temperatura ótima de atuação. Quanto maior a temperatura utilizada nas reações enzimáticas, maior é a energia fornecida para as moléculas, o que aumenta sua movimentação e frequência de colisão com o substrato. Contudo o aumento da temperatura acima do valor ótimo pode levar a desnaturação da enzima resultando na queda da atividade catalítica (RIBEIRO; SALGADO; DIAS, 2008). Devido à importância deste parâmetro para uma maior eficiência catalítica, foi investigado o comportamento da enzima quando submetida a temperaturas na faixa de 35 a 80 °C (Figura 9).

Figura 9 - Efeito da temperatura de 35 a 80 °C sobre a atividade relativa da endo- β -1,4-xilanase em pH fixo em 5,3



A máxima atividade da enzima atingida foi nas temperaturas de 45 e 50 °C, em pH fixo 5,3 sem diferença significativa entre as temperaturas em teste Tukey ($p < 0,05$). A enzima apresentou mais de 60% de atividade relativa na faixa de 35 a 55 °C. A temperatura de 55 °C apresentou atividade relativa superior a 97% da atividade máxima, porém apresenta diferença estatística ($p < 0,05$) em relação as atividades nas temperaturas ótimas. Observa-se a elevada aplicabilidade do extrato enzimático bruto, visto a faixa de temperatura ótima na qual a atividade enzimática foi máxima, já que grande parte das endoxilanases apresenta pico bem

definido de temperatura ótima, restringindo sua aplicação (BALDEZ, 2018; CHANG et al., 2017a; KALLEL et al., 2015; KOCABAŞ; GÜDER; ÖZBEN, 2015).

Este patamar de máxima atividade também foi observado por Cunha (2016), quando avaliada uma xilanase de *Aspergillus foetidus*, o autor observou máxima atividade enzimática em 50 °C, porém em 60 °C, a atividade residual da xilanase estudada permanecia em torno de 97%. Resultados semelhantes foram encontrados por Leathers (1986) ao avaliar a produção de xilanases utilizando uma cepa variante de cor de *A. pulullans* Y-2311-1, observou níveis ótimos de atividade entre 45 e 50 °C, o autor verificou uma produção simultânea de duas isoenzimas de 20 e 21 kDa neste extrato. Collins, Gerday e Feller (2005) descrevem que muitos micro-organismos são capazes de produzir múltiplas xilanases (isoenzimas) e podem ter diferentes características físico-químicas, estruturais, diferentes atividades, etc.

Silva, Terrasan e Carmona (2015) também observaram a produção concomitante de duas isoenzimas em extrato enzimático de *Trichoderma inhamatum*, os autores caracterizaram as isoformas e verificaram que apesar de semelhantes, as enzimas apresentam propriedades hidrolíticas e físico-químicas distintas. Com temperatura ótima da xilanase 1 em 50 °C e da xilanase 2 na faixa de 45 a 55 °C.

Outros autores também obtiveram faixas ótimas de temperatura ao avaliar extratos brutos de xilanase. Benedetti et al. (2013) também observaram uma faixa ideal de temperatura para o extrato bruto de xilanase de *Aspergillus niger* e encontraram atividade enzimática máxima quando na faixa de 55 a 60 °C e verificaram que 78% da atividade relativa da enzima era mantida de 45 a 65 °C. Pode-se observar que é possível que a enzima bruta extraída obtida no presente estudo possua mais de uma isoforma de xilanase, com diferentes temperaturas ótimas.

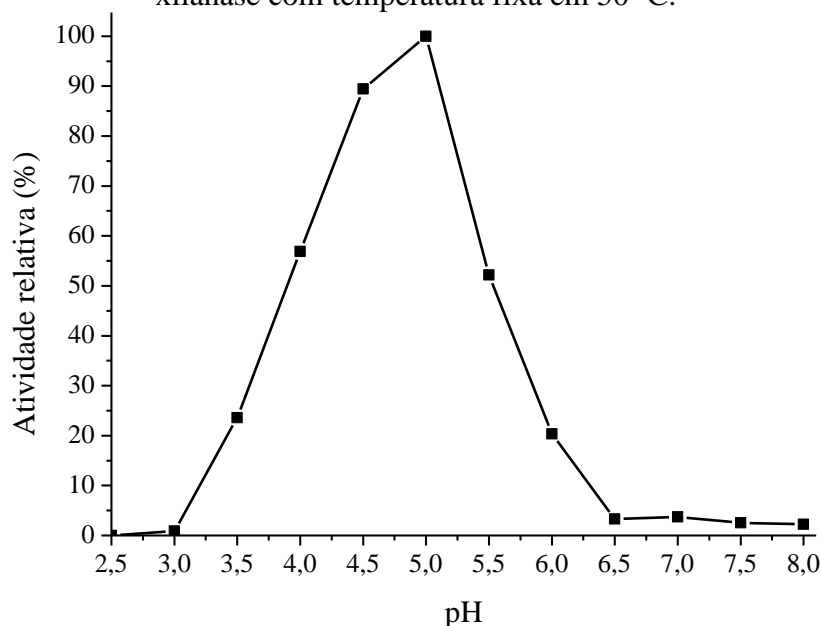
Temperaturas ótimas em torno de 45 e 50 °C também foram observadas por outros autores como, Archana, Amit e Dharm (2017), quando avaliaram a temperatura ótima de atuação para uma xilanase de *A. flavus* ARC-12, essa foi considerada termotolerante com a temperatura ideal de atividade em 50 °C. Seemakram et al. (2016) observaram temperatura ótima em 45 °C para de xilanase de *Neosartorya tatenoi*.

5.6.2 pH ótimo para atuação da endo- β -1,4-xilanase

O potencial hidrogênio iônico (pH) afeta diretamente a eficiência catalítica das enzimas, assim como a temperatura cada enzima apresenta uma faixa de pH ótima de atuação e valores fora desta faixa pode causar alterações conformacionais na estrutura da enzima,

alterando sua atividade enzimática (DALAGNOL et al., 2017; RIBEIRO; SALGADO; DIAS, 2008). Visto isso, foi avaliado o pH ótimo de atividade da endo- β -1,4-xilanase produzida e a Figura 10 apresenta a curva de pH na faixa de 2,5 a 8,0 em tampão citrato de sódio 50 mM.

Figura 10 - Efeito da variação de pH 2,5 a 8,0 sobre a atividade relativa da endo- β -1,4-xilanase com temperatura fixa em 50 °C.



Com o ensaio realizado foi possível identificar que o pH ótimo de atuação da endo- β -1,4-xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 é pH 5,0 a 50 °C. Observa-se a grande sensibilidade da enzima a mudanças de pH, pois com pH 5,5 a atividade enzimática cai para 52% da atividade no pH ótimo.

Outros autores como Bhushan et al. (2015) quando avaliaram enzima xilanase livre isolada de cultivo de *Aspergillus flavus* MTCC 9390, observaram um pH ótimo em 5,0, quando os autores aplicaram o processo de imobilização na xilanase o pH ótimo verificado foi de 5,5. Cunha (2016) em seus estudos relatou um pH ótimo para xilanase de *Aspergillus foetidus* em pH 5,0. Yegin (2017) descreve em seus estudos que pH ideal de atividade de xilanase de *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 purificada é 4,0 e que ocorre uma redução gradual na atividade enzimática em valores mais elevados de pH, perdendo praticamente toda a atividade em pH 7,0, o autor propõe que xilanases fúngicas exibem pH ótimo na faixa ácida ou neutra. Observa-se assim que xilanases de fungos filamentosos e leveduras apresentam um pH ótimo bastante próximo em torno de 5,0.

Outros estudos mostram pH ótimo de atuação de xilanases próximos ao encontrado no presente estudo como por exemplo, xilanase *A. pullulans* Y-2311-1 (YU et al., 2002)

xilanase de *Rhizopus oryzae* (BAKIR et al., 2001), xilanase livre isolada de *Aspergillus flavus* MTCC 9390 (BHUSHAN et al., 2015) e xilanase bruta e purificada de *A. pullulans* (RIBEIRO et al., 2019) foram 5,0, 4,5, 5,0 e 4,5 respectivamente. Assim como no presente estudo, Ribeiro et al. (2019) também observaram que a enzima bruta e purificada foi afetada negativamente por pH entre 7,0 e 8,0 sendo registrada atividade residual de 5%.

5.6.3 Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos avaliados foram, a constante cinética (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}), o K_m representa a afinidade da enzima para o substrato utilizado, quanto menor o valor de K_m maior a afinidade da enzima com o substrato testado, ou seja, mais fortes são as ligações entre o substrato e a enzima. O V_{max} é a maior velocidade na qual a enzima consegue transformar substrato em produto, obtida com a saturação da enzima com substrato, ou seja, a enzima atinge a máxima atividade, não ocorrendo mais aumento na velocidade de reação com o aumento do conteúdo de substrato (DALAGNOL, 2010).

Assim, foi testada a faixa de concentração de 6 a 30 mg/mL, com o gráfico construído foi possível obter o valor de $V_{máx}$ igual a 2000,0 U/mL e K_m igual a 69,8 mg/mL, com estes dados observa-se a baixa afinidade da enzima pela xilana de madeira de faia.

Valores mais elevados da constante cinética para xilana de madeira de faia também foram observados por outros autores, como Pradeep et al., (2013) quando avaliaram xilanase purificada Xyn428 produzida *Streptomyces* sp. CS428 com K_m 102,3 mg/mL, estudos de Ribeiro et al. (2019), quando caracterizaram uma endo- β -1,4-xilanase bruta e purificada de *A. pullulans*, observaram um K_m de 31,0 mg/mL e 130,0 mg/mL, respectivamente. Chanwicha et al. (2015) encontraram K_m igual a 40,9 mg/mL quando avaliaram a xilanase de *Thermoascus aurantiacus*. Souza et al. (2018) avaliaram xilanase de *Penicillium roqueforti* e também observaram baixa especificidade para xilana de madeira de faia com k_m de 84,13 mg/mL.

Bibi et al. (2014), relatam que podem haver variações nos valores de constantes cinéticas, devido aos polímeros utilizados, disparidade nos métodos e nas condições e características das enzimas investigada. Xilanases com alta especificidade por xilana de madeira de faia também já foram relatadas, como relatado por Liao et al. (2015) que observaram quatro xilanases de *Penicillium oxalicum* GZ-2 com baixos valores de k_m , xyn10A 3,0 mg/mL, xyn11A 3,0 mg/mL, xyn10B 1,0 mg/mL e xyn11B 4,7 mg/mL. Yadav et al. (2018) observaram k_m de 0,7 mg/mL para xilanase de *Anoxybacillus kamchatkensis*.

5.6.4 Estabilidade térmica da endo- β -1,4-xilanase

A xilanase foi caracterizada quanto à estabilidade térmica, nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C, no pH ótimo de atividade 5,0. Para todas as condições foi realizado cálculo de meia vida ($t_{1/2}$) e constante de desnaturação térmica (Kd), valor D e z. A meia vida da enzima é definida como o tempo necessário para que a enzima perca pelo menos 50% de sua atividade original, a constante de desnaturação é um parâmetro inversamente proporcional à meia vida da enzima, sendo assim, quanto maior o valor de Kd mais instável a enzima é na temperatura testada (LEMES, 2015). O valor D, representa o tempo de redução decimal da atividade enzimática em cada temperatura testada até manter 10% da atividade residual e o valor z é calculado para determinar o aumento de temperatura necessário para reduzir um ciclo logarítmico do valor D (NAGAR; MITTAL; GUPTA, 2012). A Tabela 14, apresenta os valores de $t_{1/2}$, Kd, valor D e valor z obtidos com o extrato enzimático bruto.

Tabela 14 - Valores de meia vida ($t_{1/2}$), constante de desnaturação térmica (Kd), valor D e valor z para o extrato enzimático bruto.

Temp.	$t_{1/2}$ (h)	Kd (h^{-1})	Valor D (h)	z (°C)
40	266,59	0,0026	885,61	
45	9,14	0,0758	30,37	4,63
50	1,70	0,4058	5,67	
55	0,12	5,8165	0,39	

Entre os dados apresentados na Tabela 14, observa-se a maior estabilidade da endo- β -1,4-xilanase a 40 °C com meia vida em 266,59 h (11,10 dias), o valor reduzido da constante de desnaturação Kd de $0,0026 h^{-1}$ o elevado valor D de 885,61 h (36,9 dias) mostram a alta estabilidade da enzima nessa temperatura.

Nas temperaturas ótimas da enzima, 45 e 50 °C, a meia-vida foi encontrada às 9,14 e 1,7 h (5484 e 102 min), respectivamente, o valor D mostra que são necessárias 30,3 e 5,67 h (1822,2 e 340,2 min) para a xilanase perder 90% da sua atividade inicial nessas condições. Resultados semelhantes foram encontrados por Pal e Khanum (2011c) quando avaliaram a cinética de inativação de xilanase livre observaram na temperatura de 45 e 50 °C, meia vida de 462,0 e 267,0 min e valor D 1535,0 e 886,0 min, respectivamente. A estabilidade da enzima nessa faixa de temperatura é interessante para processos de hidrólise enzimática para produzir xilo-oligossacarídeos, pois essas são as temperaturas mais comuns desse processo (ANTHONY

et al., 2016; RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2017). A meia vida a 55 °C observada é baixa, perdendo mais de 50% da atividade inicial após 0,12 h (cerca de 7,2 min), o baixo valor D (0,39 h) mostra a rápida desnaturação da enzima nessa temperatura.

Outros autores estudaram a meia-vida a 40 °C para xilanases de *Holotrichia paralela*, a Xyn455 estudada por Sheng et al. (2014) com meia-vida de 5,3 h. Assim como a xilanase purificada de *A. pullulans* XAPI, estável a 40 °C, com meia-vida próxima de 10 h (VERJANS et al., 2010). A aplicabilidade de enzimas com estabilidade em temperatura próxima a 40 °C é interessante para os processos de clarificação de suco (ADIGUZEL et al., 2019; KALLEL et al., 2016), processos panificação (ADIGÜZEL; TUNÇER, 2016; BAJAJ; MANHAS, 2012).

O valor z, observado 4,63 °C mostra que a enzima apresenta sensibilidade a variações de temperatura menores que 5 °C. Assim, verifica-se que a estabilidade da enzima é afetada diretamente por pequenas variações de temperatura.

Outros estudos, diferentemente da xilanase estudada, encontraram xilanases sensíveis a permanência nas temperaturas como xilanase purificada de *Aspergillus niger* com valor z de 36,6 °C em estudos de Pal e Khanum (2011c) e xilanase livre de *Bacillus pumilus* com valor z 27,8 °C (NAGAR et al., 2012).

Verifica-se que com a caracterização parcial do extrato enzimático bruto foi observada uma temperatura e pH ótimo de 45 a 50 °C e 5,0, respectivamente. Baixa afinidade da enzima com a xilana de madeira de faia e meia vida elevada a 40 °C, o valor z observado demonstra que a enzima apresenta sensibilidade a pequenas variações de temperatura. A caracterização da xilanase demonstrou condições favoráveis a aplicação em processos de hidrólise enzimática e clarificação de sucos, visto que as temperaturas e pH utilizados nesses processos são semelhantes aos observados na caracterização.

5.7 PRODUÇÃO DE XOs POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise da xilana de madeira de faia com solução na concentração de 6% resultou na produção de xilo-oligossacarídeos e xilose, porém, essa última em menor proporção, os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Observa-se na Tabela 15, que a solução de xilana na concentração de 6% já apresentava conteúdo de XOs iniciais de 3,23 mg/mL, assim nota-se que a produção de XOs totais durante a hidrólise foi de 9,70±0,31 mg/mL com 24 h de hidrólise.

Tabela 15 - Síntese de XOs por hidrólise enzimática de xilana de madeira de faia na concentração de 6% (m/v), avaliação da concentração dos XOs produzidos

Amostra (h)	X1 (mg/mL)	X2 (mg/mL)	X3 (mg/mL)	X4 (mg/mL)	X5 (mg/mL)	Σ X2+...+X5 (mg/mL)
0	0,08±0,01	0,78±0,14	1,44±0,45	0,69±0,08	0,32±0,02	3,23±0,28 ^c
12	1,95±0,02	7,95±0,05	3,65±0,04	0,33±0,02	0,14±0,01	12,07±0,09 ^b
24	2,96±0,04	9,25±0,04	3,32±0,06	0,24±0,03	0,11±0,0	12,93±0,07 ^a

*Nota: Letras iguais indicam que não há diferença estatística ao nível de 5% de significância em teste Tukey. Entende-se: X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose.

Do conteúdo de XOs totais presentes (12,93 mg/mL em 24 h), 9,25 mg/mL são de xilobiose, 3,32 mg/mL de xilotriose e menores concentrações de xilotetraose e xilopentose que somadas representam 0,35 mg/mL, obtendo ao final 21,5% de rendimento de XOs, expresso como conversão de xilana em XOs. Essa baixa conversão, provavelmente deve ser associada a baixa especificidade da enzima pela xilana de madeira de faia, como foi observado pelo elevado valor de Km verificado no estudo. Estudos de Kallel et al. (2015) e Nieto Domínguez et al. (2017) também obtiveram rendimentos máximos de XOs próximos ao observado no presente estudo, 29% em 8 h de hidrólise e 28,8% em 10 h, respectivamente.

Na amostragem realizada em 24 h, verificou-se uma concentração final de 2,96 mg/mL de xilose, porém esse valor representa apenas 18,6% do total de carboidratos do hidrolisados. Assim, 81,4% são representados por XOs totais, desses 58,25% é xilobiose e 20,9% é de xilotriose. Foi testada a atividade da β -xilosidase no extrato enzimático bruto e verificou-se uma atividade insignificante de 0,00050 U/mL, observando que a produção de xilose provavelmente não é devido à presença dessa enzima e sim ao modo aleatório de atuação de endo- β -1,4-xilanase. Assim como observado por Azelee et al. (2016), apesar do elevado conteúdo de XOs totais produzidos, a aplicação de endo- β -1,4-xilanase resulta inevitavelmente na formação de monômeros de xilose, pois essa enzima exibe um modo de ação aleatório no esqueleto da xilana. Ding, Li e Hu (2018) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no estudo, com 81,6% de XOs totais e dentre esses 76,7% são uma mistura de xilobiose e xilotriose.

Em trabalhos anteriores do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações, nos quais os autores estudaram a maximização da produção de XOs por hidrólise enzimática com endo- β -1,4-xilanase produzida em meio de cultivo com farelo de arroz como fonte de xilana. As condições de maior produção de XOs, obtidas na maximização, foram utilizadas como base para aplicação da endo- β -1,4-xilanase do presente estudo. Os autores encontraram uma

concentração média de XOs totais na validação do planejamento proposto de 10,7 mg/mL, representando 80,9% de total de açúcares, com conversão média de 17,8% de xilana em XOs. Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, verificando que a endo- β -1,4-xilanase de *A. pullulans* produzida em meio contendo casca de aveia pré-tratada, é capaz de degradar a cadeia da xilana de madeira de faia para a produção de XOs de baixo grau de polimerização, principalmente xilobiose e xilotriose.

Como no presente estudo, Guido, Silveira e Kalil (2019) observaram que o percentual de XOs com GP de 3 a 5 diminuem significativamente com o tempo de hidrólise, ao mesmo tempo que a concentração de xilobiose (X2) e xilose (X1) aumentavam. Assim, observa-se que esse fato ocorre pela hidrólise dos xilo-oligossarídeos maiores para a formação de X1 e X2. Resultados do autor com 12 e 24 h de hidrólise com endo- β -1,4-xilanase comercial de *Aspergillus oryzae* (Shearyzme®), mostram-se muito próximos aos encontrados no estudo, com 11,8 e 12,6 mg/mL de XOs totais, respectivamente. Quando avaliada a hidrólise com endo- β -1,4-xilanase (Spring Mono®) de *Thermomyces lanuginosus* e (Amano®) de *Aspergillus niger* observaram resultados inferiores de produção de XOs totais com 24 h de hidrólise, 9,2 mg/mL e 10,2 mg/mL, respectivamente. Mostrando que o extrato enzimático bruto de endo- β -1,4-xilanase estudado, assemelha-se à eficiência de xilanases comerciais purificadas, estudada por Guido, Silveira e Kalil (2019).

Barreto, Zancan e Menezes (2015) descrevem que para aplicação em alimentos os xilo-oligossacarídeos de GP 2 (xilobiose) são os mais utilizados. No presente estudo, do total de XOs produzidos 58,2% são representados por xilobiose, uma concentração de 9,2 mg/mL, mostrando o potencial de aplicação desta enzima para produção de XOs próprios para adição em alimentos em substituição da sacarose. Outros autores como Cunha (2016), também observaram conteúdo significativo de xilose após a 12 h de hidrólise de xilana de bétula, por xilanase de *Aspergillus foetidus* purificada. Os autores sugerem que o mecanismo catalítico das xilanases hidrolisa a xilana e utiliza os produtos formados como a xilotriose, para formação de novos produtos de menor grau de polimerização, como por exemplo, a degradação da xilotriose para a formação de xilobiose e xilose.

Quando testada a hidrólise da xilana de madeira de faia com solução na concentração de 1%, verificou-se que a aplicação de ultrassom no substrato antes da hidrólise ocasionou o aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de XOs, como ilustrado na Tabela 16.

Tabela 16 – Comparativo da síntese de XOs com xilana bruta e xilana tratada com ultrassom, na concentração de 1% (m/v)

Amostras (h)	X1 (mg/mL)	X2 (mg/mL)	X3 (mg/mL)	X4 (mg/mL)	X5 (mg/mL)	\sum X2+...+X5 (mg/mL)	
Bruta	0	0,05±0,00	0,15±0,02	0,26±0,03	0,23±0,02	0,14±0,01	0,79±0,04 ^e
	12	0,23±0,03	1,23±0,02	1,08±0,01	0,12±0,01	0,10±0,00	2,54±0,03 ^d
	24	0,47±0,03	1,47±0,02	1,12±0,01	0,12±0,01	0,09±0,01	2,80±0,03 ^c
Sônica	0	0,05±0,00	0,10±0,02	0,20±0,03	0,18±0,02	0,13±0,01	0,62±0,07 ^f
	12	0,29±0,01	1,54±0,02	1,30±0,01	0,14±0,00	0,10±0,01	3,08±0,03 ^b
	24	0,55±0,00	1,80±0,01	1,36±0,01	0,11±0,00	0,09±0,00	3,36±0,01 ^a

*Nota: Letras iguais indicam que não há diferença estatística ao nível de 5% de significância em teste Tukey. Entende-se: X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose.

Com os dados apresentados na Tabela 16, verifica-se que existe diferença estatística ($p < 0,05$) na produção de XOs, entre as amostras tratadas com ultrassom, na frequência de 5 W/mL por 5 min e as amostras obtidas da hidrólise da xilana bruta. Observa-se aumento de 20% na produção de XOs totais, passando de 2,80 para 3,36 mg/mL, com o pré-tratamento com ultrassônico na xilana de madeira de faia em 24 h de processo hidrolítico. Observa-se aumento principalmente no conteúdo de X2 e X3 nas amostras com a xilana tratada, representando em média 45,95±0,15% e 34,87±0,15%, respectivamente, do total de carboidratos hidrolisados, com rendimento total de XOs de 85,93%.

Os resultados de Guido (2016) quando avaliou a hidrólise enzimática com solução de xilana de madeira de faia na concentração de 1% corroboram com os resultados do presente estudo, o autor observou uma produção de 3,70 mg/mL de XOs totais ao final de 24 h e concentração de 0,30 mg/mL de xilose. O autor também observou que menores concentrações de xilana no meio reacional ocasionam maior rendimento de XOs com aproximadamente 37% de conversão de xilana em XOs. No presente estudo, o rendimento de XOs foi de 33,60% na amostra tratada.

Com os resultados encontrados observa-se que ocorre uma modificação na cadeia da xilana com o pré-tratamento, que proporciona maior ação da enzima sobre esse substrato. Esses resultados condizem com resultados da aplicação do pré-tratamento na xilana antes da atividade enzimática onde foi observado um aumento máximo de 16,6% da atividade com o tratamento a xilana de madeira de faia.

Assim como observado por Dalagnol (2010) o ultrassom pode ser utilizado como alternativa para reduzir o tempo de processo, pois quando aplicado ao substrato, cria aberturas na superfície da molécula, resultado do impacto mecânico da cavitação, favorecendo a ação da enzima. Quando o autor testou a pré-sonicação do substrato antes da atividade enzimática,

observou maior atividade da xilanase com o pré-tratamento e conclui que o ultrassom deve ter agido na cadeia da xilana reduzindo seu tamanho ou causando desdobramentos na molécula que facilitaram o acesso da enzima ao substrato. A redução do tempo de processo pode ser observado no presente estudo, visto que a concentração de XOs totais nas 12 h de hidrólise com xilana tratada (3,08 mg/mL) apresentam diferença estatística quando comparadas às 24 h com a xilana bruta (2,80 mg/mL), produzindo assim maior conteúdo de XOs em menor tempo de processo.

Até o presente momento na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos com aplicação de pré-tratamento com ultrassom diretamente na xilana de madeira de faia, para a hidrólise enzimática para produção de XOs. Contudo, observa-se a eficiência desse método de pré-tratamento para aumento da concentração de XOs e redução do tempo de processo.

5.8 CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE LARANJA POR VIA ENZIMÁTICA

A clarificação do suco de laranja foi testada nas temperaturas de 45 e 50 °C (temperaturas ótimas de atuação da enzima) com concentração de enzima fixa em 12,5 U/mL e amostras coletadas em 0, 30, 60 e 120 min. Os resultados encontrados com os ensaios estão apresentados na Tabela 17, com aumento na claridade dos sucos, redução da turbidez e aumento do teor de açúcares redutores. O rendimento dos sucos foi avaliado após a centrifugação e filtração em todos os testes, porém não foram observadas mudanças de rendimento com os tratamentos aplicados.

Com os dados apresentados na Tabela 17, observa-se que a endo- β -1,4-xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 quando aplicada na forma bruta para clarificação de suco de laranja, na concentração de 12,5 U/mL aplicada na temperatura de 45 °C, mostra-se eficiente com aumento máximo de 28,3% da claridade. Concomitantemente ao aumento da claridade do suco, foi observada a redução da turbidez com máximo de 23,9% em relação a amostra controle, juntamente com o aumento máximo de 5,9% do teor de açúcares redutores até 60 min de tratamento, resultando em uma concentração final de 350 μ g/mL de açúcares redutores no suco. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) nas amostras tratadas por 60 e 120 min nos três parâmetros analisados

O aumento da claridade dos sucos tratados por método enzimático é resultado da quebra dos carboidratos em açúcares redutores e a formação de aglomerado, que facilitam sua separação por método de centrifugação e filtração, resultando em sucos de maior clareza, aroma e cor. A presença de carboidratos poliméricos das frutas nos sucos resulta em coloração

nebulosa e aumento da viscosidade. Quando o suco é tratado com xilanase, são reveladas unidades redutoras da hemicelulose. Assim a quantidade de açúcar redutor resultante do tratamento enzimático é um indicador da decomposição do carboidrato polimérico pela enzima (ADIGUZEL et al., 2019).

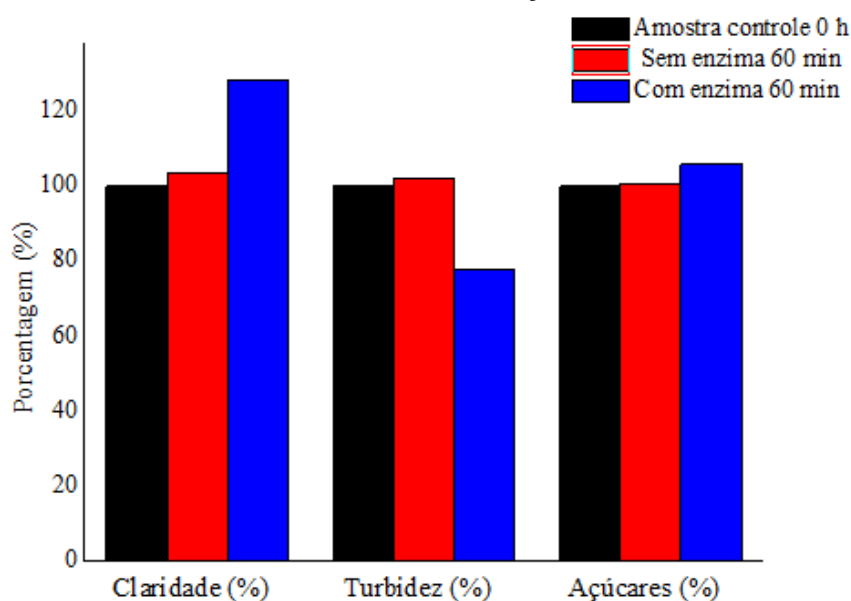
Tabela 17 - Parâmetros de clarificação de suco de laranja com aplicação de 12,5 U/mL de extrato enzimático bruto produzido em cultivo submerso.

Amostras	Temperatura (°C)	Clareza (%)	Turbidez (%)	Açúcares Red. (%)
30 min	45	11,5±0,3 ^b	-18,6±0,7 ^b	3,6±0,3 ^b
60 min		28,3±1,9 ^a	-23,9±0,7 ^a	5,9±0,4 ^a
120 min		24,0±1,2 ^a	-23,1±0,0 ^a	6,2±0,5 ^a
30 min	50	-39,2±0,3 ^A	38,5±0,2 ^A	3,9±0,6 ^B
60 min		-21,2±0,3 ^B	32,5±0,8 ^B	5,3±0,2 ^A
120 min		-20,6±1,7 ^B	31,2±1,3 ^B	6,6±0,7 ^A

*Nota: Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística ao nível de 5% de significância, teste Tukey aplicado para cada temperatura separadamente.

Para verificar qual a influência da temperatura durante o processo de clarificação do suco de laranja, foi feito um controle com a amostra de suco tratado na temperatura de 45 °C sem a presença da enzima. A Figura 11, apresenta um comparativo da amostra controle, amostra sem enzima mantida a 45 °C por 60 min e a amostra que apresentou a melhor resposta quando tratada com 12,5 U/mL a 45 °C por 60 min.

Figura 11 - Avaliação da temperatura de 45 °C no processo de clarificação do suco de laranja, análise de clareza, turbidez e açúcares redutores



Na Figura 11, observa-se que a temperatura do processo não apresenta efeito na clarificação dos sucos de laranja, mostrando a eficiência do extrato enzimático bruto na clarificação desse suco. Resultados semelhantes ao do estudo foram observados por Adiguzel et al. (2019) quando avaliaram a clarificação de sete sucos de frutas com uso de xilanase purificada, na temperatura de 40 °C por 1 h de processo, observaram uma redução da absorvância das amostras de 24,4% em suco de pêsego, 17,6% em sucos de laranja e 13,9% em suco de maçã. Os autores observaram ainda aumento do teor de açúcares redutores muito semelhantes ao do presente estudo, com aumento de 5,6% no suco de laranja tratado.

No estudos de Shahrestani et al. (2016) os autores observaram que a turbidez natural dos sucos é devido a compostos como hemicelulose, amido, pectina e celulose presentes na parede celular dos frutos, que durante a extração são liberados e ficam em suspensão. A degradação desses compostos leva a clarificação de sucos, melhora das qualidades sensoriais e tempo de armazenamento do produto. Os autores quando avaliaram a clarificação de sucos de abacaxi, maçã e laranja com xilanase livre e imobilizada, observaram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Com 60 min de processo os autores observaram redução máxima da turbidez de 12% para xilanase livre e 17% para xilanase imobilizada em suco de laranja, porém uma redução de 26,3% foi observada em 120 min de processo.

Estudos de Adigüzel, Tunçer (2016), Kumar et al. (2014) e Rosmine et al. (2017) quando avaliaram a aplicação de xilanase purificada no tratamento de sucos de laranja, observaram aumentos de claridade de 18,3%, 15,0% e 20,8%, respectivamente, com máximo de 150 min de processo. Kumar et al. (2014) observaram ainda um aumento máximo de 12% no teor de açúcares redutores com processo a 50 °C e concentração de 20 U/g de polpa de fruta.

Com os resultados apresentados observa-se que o aumento do tempo de processo além de 60 min de clarificação não apresenta diferença estatística ($p < 0,05$) nos parâmetros testados no presente estudo. Nagar, Mittal e Gupta (2012) descrevem que o aumento do tempo de tratamento não são preferidos, pois podem causar a formação de partículas de neblina, compostas por complexos de proteínas-carboidratos ou ainda proteínas-taninos, dependendo do suco ao qual a enzima é aplicada. Assim, em seus estudos os autores optaram por tempos de processo variando de 30 a 90 min, dependendo do suco de fruta clarificado. Tempos de clarificação de sucos com uso de xilanase de 30 a 90 min também foram relatados por Dhiman et al. (2011), Kumar et al. (2014) e Pal e Khanum (2011).

Contudo, quando o mesmo tratamento foi aplicado ao suco na temperatura de 50 °C, foi observada redução da claridade inicial do suco, aumento da turbidez, principalmente nos primeiros 30 min de processo, porém o teor de açúcares redutores apresentou aumento

máximo de 6,6% em relação ao ensaio controle. Nagar, Mittal e Gupta (2012) quando avaliaram a clarificação de sucos de maçã, abacaxi e tomate em temperaturas variando de 27 a 60 °C, observaram um crescente aumento da claridade, rendimento e açúcares redutores até a temperatura de 40 °C, porém em temperaturas superiores os autores observaram queda da claridade e rendimento, e assim como no presente estudo o teor de açúcares redutores foi o parâmetro que teve a menor queda em comparação aos demais parâmetros estudados pelos autores.

Visto que a enzima utilizada no presente estudo é uma endo- β -1,4-xilanase bruta e seus resultados se assemelham a resultados de estudos utilizando xilanases purificadas, observa-se a elevada aplicabilidade da enzima. Assim, observa-se que para a endo- β -1,4-xilanase estudada a temperatura ideal para processo de clarificação de sucos de laranja é na temperatura de 45 °C, dentro da faixa de temperatura estudada e para uma concentração de enzima de 12,5 U/mL de suco.

6 CONCLUSÃO

Com o planejamento experimental proposto foi possível a maximização da produção da endo- β -1,4-xilanase, com um aumento da produção da enzima de 6,37 vezes. Com a validação do modelo matemático escolheu-se a condição com concentração de 50 g/L de casca de aveia pré-tratada, 1,5 g/L de extrato de leveduras, 5,0 g/L de KH_2PO_4 , 2,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com pH inicial do meio de cultivo ajustado para 3,0 para produção enzimática.

O método de purificação aplicado, precipitação com sulfato de amônia, não foi eficiente na purificação da enzima produzida, pois houve desnaturação enzimática com recuperação de apenas 9,1% e fator de purificação inferior a 1,0. Porém, o método de aplicação de ondas ultrassônicas mostrou-se eficiente no aumento da atividade enzimática, quando aplicado como pré-tratamento ao extrato enzimático bruto e a xilana de madeira de faia, em ambos os casos causou aumento da atividade enzimática de 4,3% quando aplicado a xilanase e 16,6% quando aplicado a xilana de madeira de faia.

Com a caracterização da enzima bruta foi possível observar que a endo- β -1,4-xilanase apresenta pH e temperatura ótimos de 5,0 e 45 a 50 °C, com meia vida 11 dias a 40 °C e de 9,14 h a 45 °C os valores D e z mostraram que a enzima apresenta sensibilidade a variações de temperatura menores que 5 °C. Verificou-se a especificidade da enzima frente ao substrato xilana de madeira de faia e foi observado um V_{max} 2000 U/mL e K_m de 69,8 mg/mL, mostrando a baixa especificidade pelo substrato testado.

Com a aplicação do extrato enzimático bruto na xilana de madeira de faia observa-se que a enzima apresenta capacidade catalítica de hidrolisar esse substrato e produzir XOs. Quando aplicada a solução na concentração de 6% de xilana, verifica-se uma produção de 12,93 mg/mL de XOs totais, 81,4% do total de carboidratos presentes. Verifica-se que a aplicação de pré-tratamento com ultrassom na xilana (1%), antes do processo de hidrólise, aumenta em 20% a concentração de XOs totais quando comparada a amostra não tratada.

Com o presente estudo foi possível constatar que a endo- β -1,4-xilanase bruta apresenta potencial de clarificação de suco de laranja com aumento máximo de claridade de 28,31%, redução de 23,93% da turbidez e aumento de 5,97% do teor de açúcares redutores quando aplicada na concentração de 12,5 U/mL a 45 °C por 60 min de processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Corncob-induced endo-1,4- β -D-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: Production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3981–3988, jun. 2008.
- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 991–995, jan. 2009.
- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 2–16, 2011.
- ADIGÜZEL, A. O.; TUNÇER, M. Production, Characterization and Application of a Xylanase from *Streptomyces* sp. AOA40 in Fruit Juice and Bakery Industries. **Food Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 189–218, 2016.
- ADIGUZEL, G.; FAIZ, O.; SISECIOGLU, M.; SARI, B.; BALTACI, O.; AKBULUT, S.; GENÇ, B.; ADIGUZEL, A. A novel endo- β -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 571–578, 2019.
- ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6488–6495, dez. 2009.
- AFTAB, M. N.; ZAFAR, A.; IQBAL, I.; KALEEM, A.; ZIA, K. M.; AWAN, A. R. Optimization of saccharification potential of recombinant xylanase from *Bacillus licheniformis*. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2017.
- AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; RIAZ, M. Partial purification and characterization of xylanase produced from *Aspergillus niger* using wheat bran. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 50, n. 3, p. 433–437, 2013.
- AHMED, S.; RAHMAN, M. S.; HASAN, M. M.; PAUL, N.; SAJIB, A. A. Microbial degradation of lignocellulosic biomass: discovery of novel natural lignocellulolytic bacteria. **BioTechnologia**, v. 99, n. 2, p. 137–146, 2018.
- AHMED, S. A.; SALEH, S. A. A.; MOSTAFA, F. A.; ABD EL ATY, A. A.; AMMAR, H. A. M. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 134–144, jul. 2016.
- AKPINAR, O.; AK, O.; KAVAS, A.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Cotton Stalks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5544–5551, jul. 2007.
- ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; FALKOSKI, D. L.; PAES, G. B. T.; RIBEIRO, J. I.; VISSER, E. M.; ALFENAS, R. F.; PEREIRA, O. L.; REZENDE, S. T. Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous

saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 3, p. 1332–1346, fev. 2014.

ALTA, S. O. M. D. E.; ESTUDO, I.; EFEITOS, D. O. S.; AUGUSTO, J.; DELEZUK, D. E. M.; REAÇÃO, T. D. A. Desacetilação De Beta-Quitina Assistida Por Ultra- Amplitude E Do Tempo De Irradiação E Da Desacetilação De Beta-Quitina Assistida Por Ultra-. **Group**, 2009.

ANTHONY, P.; HARISH, B. S.; JAMPALA, P.; RAMANUJAM, S.; UPPULURI, K. B. Statistical optimization, purification and applications of xylanase produced from mixed bacteria in a solid liquid fermentation using *Prosopis juliflora*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, n. June, p. 213–220, 2016.

AOAC. . 17 th ed. Maryland, USA: Association of official analytical chemists, 2000.

AZELEE, N. I. W.; JAHIM, J. M.; ISMAIL, A. F.; FUZI, S. F. Z. M.; RAHMAN, R. A.; MD ILLIAS, R. High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 11–19, 1 mar. 2016.

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, 13 dez. 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, 1 maio 1992.

BAJAJ, B. K.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 330–337, 2012.

BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: Production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 6–7, p. 328–334, 2001.

BALDEZ, T. O. **Estudo cinético da hidrólise de xilooligômeros por xilanases e beta-xilosidade na forma livre e imobilizada**. [s.l.] Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos p.44, 2018.

BANDIKARI, R.; MANNEPULA, S.; POLUDASU, R. M.; REDDY OBULAM, V. S. Supplementation of fruit processing waste for endoxylanase production by *Trichoderma koenigii* isolate and its optimization using central composite design: application of produced endoxylanase in mango juice clarification. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 05, n. 02, p. 162–166, 2015.

BANKEEREE, W.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; CHAIAREEKIJ, S.; EVELEIGH, D. E.; KIM, S. W.; PUNNAPAYAK, H. Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2014.

BANKEEREE, W.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; KIM, S. W.; PUNNAPAYAK, H. Enhanced production of cellulase-free thermoactive xylanase using corncob by a black yeast, *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Korean Chemical Engineering Research**, v. 54, n. 6, p. 822–829, 2016.

BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 503–529, 1 set. 2017.

BARRETO, A. R.; ZANCAN, L. R.; MENEZES, C. R. DE. Obtenção de xilooligossacarídeos

por resíduos lignocelulósicos : alternativa para produção de compostos funcionais para alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2015, p. 821–836, 2015.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3–4, p. 326–338, 1 ago. 2001.

BENEDETTI, A. C. E. P.; COSTA, E. D.; ARAGON, C. C.; SANTOS, A. F.; GOULART, A. J.; ATTILLI-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.

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

BHUTTO, A. W.; QURESHI, K.; HARIJAN, K.; ABRO, R.; ABBAS, T.; BAZMI, A. A.; KARIM, S.; YU, G. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 122, p. 724–745, 2017.

BIBI, Z.; ANSARI, A.; ZOHRA, R. R.; AMAN, A.; UL QADER, S. A. Production of xylan degrading endo-1, 4- β -xylanase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 478–485, 2014.

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

CAO, Y.; MENG, D.-J.; LU, J.; LONG, J. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 631–638, 2008.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. DE O.; DA SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 1 abr. 2013.

CHANG, S.; GUO, Y.; WU, B.; HE, B. Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 249–256, mar. 2017a.

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, p. 1–13, 10 fev. 2017b.

CHANWICHA, N.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. levisporus KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 309–318, 2015.

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.

CHAUD, L. C. S.; SILVA, D. D. V.; MATTOS, R. T.; FELIPE, M. DAS G. A. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipitis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 771–777, 2012.

CHEN, H.; LIU, J.; CHANG, X.; CHEN, D.; XUE, Y.; LIU, P.; LIN, H.; HAN, S. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. **Fuel Processing Technology**, v. 160, p. 196–206, 2017.

CHEN, M. H.; BOWMAN, M. J.; DIEN, B. S.; RAUSCH, K. D.; TUMBLESON, M. E.; SINGH, V. Autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* for the production of xylooligosaccharides (XOS): Kinetics, characterization and recovery. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 359–365, 2014.

CHEN, Y.; STEVENS, M. A.; ZHU, Y.; HOLMES, J.; XU, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 8, 2013.

CHEN, Z.; ZAKY, A. A.; LIU, Y.; CHEN, Y.; LIU, L.; LI, S.; JIA, Y. Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs. **Protein Expression and Purification**, v. 154, n. 11, p. 91–97, 2019.

CHRISTOV, L. P.; MYBURGH, J.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 21–29, 1997.

COLLINS, T.; HOYOUX, A.; DUTRON, A.; GEORIS, J.; GENOT, B.; DAUVRIN, T.; ARNAUT, F.; GERDAY, C.; FELLER, G. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 79–84, jan. 2006.

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

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira - Grãos. **Companhia Nacional de Abastecimento**, 2018. v. 5, p. 1–178, 2018.

CORRÊA JUNIOR, L. C. S.; MATTOS, M. V. C. V. DE; MACHADO, T. B. **Produção de endoxilanase por *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 em cultivo submerso utilizando casca de aveia como fonte de xilana**. [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande, 2018.

CORTIVO, P. R. D.; HICKERT, L. R.; HECTOR, R.; AYUB, M. A. Z. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 10–18, mar. 2018.

COSTA, D. R. **Resíduo industrial de aveia: Extração e caracterização do amido visando aplicação em revestimento comestível adicionado de composto antifúngico natural**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná –, 2018.

CUNHA, C. C. Q. B.; GAMA, A. R.; CINTRA, L. C.; BATAUS, L. A. M.; ULHOA, C. J. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–14, 2018.

CUNHA, L. L. **Purificação e caracterização bioquímica e biofísica de uma xilanase de *Aspergillus foetidus***. [s.l.] Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2016.

DALAGNOL, L. M. G. **Avaliação do uso do ultrassom na extração do mosto de uva Cabernet sauvignon e na atividade enzimática.** [s.l.] Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

DALAGNOL, L. M. G.; SILVEIRA, V. C. C.; DA SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80–87, 2017.

DEMIREL, F.; GERMEC, M.; COBAN, H. B.; TURHAN, I. Optimization of dilute acid pretreatment of barley husk and oat husk and determination of their chemical composition. **Cellulose**, v. 25, n. 11, p. 6377–6393, 2018.

DHIMAN, S. S.; GARG, G.; SHARMA, J.; MAHAJAN, R.; METHOXY. Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 746–755, 2011.

DÍAZ, A. B.; ALVARADO, O.; DE ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Valorization of grape pomace and orange peels: Improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 580–586, out. 2013.

DING, C.; LI, M.; HU, Y. High-activity production of xylanase by *Pichia stipitis*: Purification, characterization, kinetic evaluation and xylooligosaccharides production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 72–77, 2018.

DOTSENKO, G.; MEYER, A. S.; CANIBE, N.; THYGESEN, A.; NIELSEN, M. K.; LANGE, L. Enzymatic production of wheat and ryegrass derived xylooligosaccharides and evaluation of their in vitro effect on pig gut microbiota. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 3, p. 497–507, 2018.

FARIA, N. T.; MARQUES, S.; FERREIRA, F. C.; FONSECA, C. Production of xylanolytic enzymes by *Moesziomyces* spp. using xylose, xylan and brewery's spent grain as substrates. **New Biotechnology**, v. 49, p. 137–143, 2019.

FONSECA, M. A. Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja. p. 115, 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, F. . [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=458&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=OLIGO>. Acesso em: 24 out. 2018.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 1 nov. 2012.

GALLO, M.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, D.; GALLO, M.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, D. Application of Ultrasound in Food Science and Technology: A Perspective. **Foods**, v. 7, n. 10, p. 164, 4 out. 2018.

GAUTAM, A.; KUMAR, A.; DUTT, D. Production and characterization of cellulase-free xylanase by *Aspergillus flavus* ARC-12 and its application in pre-bleaching of ethanol-soda pulp of eulaliopsis binata. **Research Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 63–71, 2017.

GAUTÉRIO, G. V.; VIEIRA, M. C.; SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p.

335–345, 2018.

GAUTÉRIO, G. V.; DA SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; DA ROSA RIBEIRO, T.; KALIL, S. J. Maximization of xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using a by-product of rice grain milling as xylan source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101511, jan. 2020.

GERMEC, M.; DEMIREL, F.; TAS, N.; OZCAN, A.; YILMAZER, C.; ONUK, Z.; TURHAN, I. Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugar production. **Cellulose**, v. 24, n. 10, p. 4337–4353, 2017.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; LUKASIK, R. B. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 1 jul. 2010.

GOLUNSKI, S. M.; MULINARI, J.; CAMARGO, A. F.; VENTURIN, B.; BALDISSARELLI, D. P.; MARQUES, C. T.; VARGAS, G. D. L. P.; COLLA, L. M.; MOSSI, A.; TREICHEL, H. Ultrasound effects on the activity of *Aspergillus niger* lipases in their application in dairy wastewater treatment. **Environmental Quality Management**, v. 27, n. 1, p. 95–101, 2017.

GOMES, J.; GOMES, I.; STEINER, W. Thermolabile xylanase of the antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: Production and properties. **Extremophiles**, v. 4, n. 4, p. 227–235, 2000.

GONÇALVES, I.; SILVA, C.; CAVACO-PAULO, A. Ultrasound enhanced laccase applications. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1362–1374, 9 mar. 2015.

GOYAL, M.; KALRA, K. L.; SAREEN, V. K.; SONI, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 535–541, 2008.

GRACIOLI, M. R. **Purificação e caracterização de uma xilanae halotolerante de *Aspergillus hortai* CRM 1919 e aplicação de hidrólise de substratos agroindustriais.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2018.

GUIDO, E. S. **Produção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática de xilanas.** [s.l.] p. 130. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, 2016.

GUIDO, E. S.; SILVEIRA, J. T.; KALIL, S. J. Enzymatic production of xylooligosaccharides from beechwood xylan: Effect of xylanase preparation on carbohydrate profile of the hydrolysates. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 2, p. 713–721, 2019.

GUISA, J. M. L.; HARNED, M. C.; DUBIELZIG, R.; RAO, S. C.; MARLETT, J. A. Processed oat hulls as potential dietary fiber sources in rats. **Journal of Nutrition**, v. 118, n. 8, p. 953–962, 1 ago. 1988.

HOU, F.; MA, X.; FAN, L.; WANG, D.; WANG, W.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Activation and conformational changes of chitinase induced by ultrasound. **Food Chemistry**, v. 285, p. 355–362, 2019.

HU, A.; LU, J.; ZHENG, J.; SUN, J.; YANG, L.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; LIN, Q. Ultrasonically aided enzymatical effects on the properties and structure of mung bean starch. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 146–151, 2013.

HUANG, G.; CHEN, S.; DAI, C.; SUN, L.; SUN, W.; TANG, Y.; XIONG, F.; HE, R.; MA,

- H. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 144–149, 1 jul. 2017.
- HUANG, L.; LUO, L.; JIA, J.; ZHU, W.; MA, H.; HE, R.; HUANG, L.; JIA, J.; HE, R.; LUO, L.; ZHU, W. Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 419–424, 2010.
- IBGE. 3. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>>. Acesso em: 13 nov. 2019.
- İLGÜ, H.; SÜRMELE, Y.; ŞANLI-MOHAMED, G. A thermophilic α -l-Arabinofuranosidase from *Geobacillus vulcani* GS90: heterologous expression, biochemical characterization, and its synergistic action in fruit juice enrichment. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 9, p. 1627–1636, 2018.
- IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 317–326, 2014.
- ISLAM, M. N.; ZHANG, M.; ADHIKARI, B. The Inactivation of Enzymes by Ultrasound-A Review of Potential Mechanisms. **Food Reviews International**, v. 30, n. 1, p. 1–21, 2014.
- JAVED, U.; AMAN, A.; QADER, S. A. U. Utilization of corncob xylan as a sole carbon source for the biosynthesis of endo-1,4- β xylanase from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2017.
- JIANG, Z. Q.; YANG, S. Q.; TAN, S. S.; LI, L. T.; LI, X. T. Characterization of a xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 69–76, 1 jul. 2005.
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 1 jan. 2016.
- KALLEL, F.; DRISS, D.; BOUAZIZ, F.; NEIFER, M.; GHORBEL, R.; ELLOUZ CHAABOUNI, S. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 536–546, 2015.
- KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; ZOUARI-ELLOUZI, S.; CHAABOUNI, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 1–10, 2016.
- KIM, J. S.; LEE, Y. Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.
- KOCABAŞ, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66–75, maio 2015.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, jul. 1999.
- KUMAR, A.; GUPTA, R.; SHRIVASTAVA, B.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **Journal of**

Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 74, n. 3–4, p. 170–177, 2012.

KUMAR, D.; KUMAR, S. S.; KUMAR, J.; KUMAR, O.; MISHRA, V.; KUMAR, R.; MALYAN, S. K. Xylanases and their industrial applications : A review. **Biochemical Cellular Archives**, v. 17, n. 1, p. 353–360, 2017.

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

LADOLE, M. R.; MEVADA, J. S.; PANDIT, A. B. Ultrasonic hyperactivation of cellulase immobilized on magnetic nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 117–126, 2017.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D.; TOLAN, J. S. Comparative ethanol productivities of different zymomonas recombinants fermenting oat hull hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91–93, n. 1–9, p. 133–146, 2001.

LEAES, E. X.; LIMA, I.; MIKLASEVICIUS, L.; RAMON, A. P.; PRÁ, D.; BASSACO, M. M.; TERRA, L. M.; MAZUTTI, M. A. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 21–25, 2013.

LEATHERS, T. D. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1026–1030, 1986.

LEITE, P.; SALGADO, J. M.; VENANCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 737–746, 2016.

LEMES, A. C. **Obtenção e caracterização de queratinase de Bacillus sp. P45 a partir de coprodutos e aplicação na produção de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.** [s.l.] Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande, 2015.

LI, Y.; CUI, F.; LIU, Z.; XU, Y.; ZHAO, H. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1381–1388, 2007.

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, n. 1, p. 12631, 30 out. 2015.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658–666, mar. 1934.

LOPES, F. P. Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre. 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265–275, maio 1951.

MA, J.; YANG, H.; KUN, W.; LIU, X. Structural modification of hemicelluloses and lignin based on the biorefinery process with white-rot fungal. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 7–13, 20 nov. 2016.

MA, X.; WANG, D.; YIN, M.; LUCENTE, J.; WANG, W.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Characteristics of pectinase treated with ultrasound both during and after the immobilization

process. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 1–10, 2017.

MAKAROVA, E. I.; BUDAIEVA, V. V.; KUKHLENKO, A. A.; ORLOV, S. E. Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of *Miscanthus* and oat hulls. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, p. 317, 14 out. 2017.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 105–114, jun. 2002.

MARIANO, M.; KISSI, N. EL; DUFRESNE, A. Cellulose nanocrystals and related nanocomposites: Review of some properties and challenges. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 52, n. 12, p. 791–806, 15 jun. 2014.

MARQUES, N. P.; DE CASSIA PEREIRA, J.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66–75, out. 2018.

MENG, H.; LI, D.; ZHU, C. The effect of ultrasound on the properties and conformation of glucoamylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 411–417, 1 jul. 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONIZ, P.; HO, A. L.; DUARTE, C.; KOLIDA, S.; RASTALL, R. A.; PEREIRA, H.; CARVALHEIRO, F. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylo-oligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466–473, 2016.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Sonochemical effect on activity and conformation of commercial lipases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 4, p. 1435–1453, abr. 2017.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; GUPTA, V. K. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1402–1410, 2012.

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

NASR, S.; SOUDI, M. R.; HATEF SALMANIAN, A.; GHADAM, P. Partial optimization of endo-1,4-beta-xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using agro-industrial residues. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 12, p. 1245–1253, 2013.

NIETO DOMÍNGUEZ, M.; EUGENIO, L. I.; DURÁN, M. J. Y.; COLINAS, B. R.; PLOU, F. J.; CHENOLL, E.; PARDO, E.; CODOÑER, F.; MARTÍNEZ, M. J. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. **Food Chemistry**, v. 232, p. 105–113, 2017.

OLIVEIRA, H. M.; CORREIA, V. S.; SEGUNDO, M. A.; FONSECA, A. J. M.; CABRITA, A. R. J. Does ultrasound improve the activity of alpha amylase? A comparative study towards a tailor-made enzymatic hydrolysis of starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84,

p. 674–685, 2017.

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

OTERO, D. M.; CADAVAL, C. L.; TEIXEIRA, L. M.; ROSA, C. A.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Screening of yeasts capable of producing cellulase-free xylanase. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 23, p. 1961–1969, 2015.

OTERO, D. M. **Isolamento, Seleção e Produção de leveduras com potencial biotecnológico para produção de endo-xilanases**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande, 2015.

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

PAL, A.; KHANUM, F. Efficacy of xylanase purified from *Aspergillus niger* DFR-5 alone and in combination with pectinase and cellulose to improve yield and clarity of pineapple juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 5, p. 560–568, 2011b.

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, 2011c.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, ago. 2000.

PANWAR, D.; SRIVASTAVA, K. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 118–125, 2014.

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**. [s.l.] Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.

PEREIRA, P. H. F.; WALDRON, K. W.; WILSON, D. R.; CUNHA, A. P.; BRITO, E. S. DE; RODRIGUES, T. H. S.; ROSA, M. F.; AZEREDO, H. M. C. Wheat straw hemicelluloses added with cellulose nanocrystals and citric acid. Effect on film physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 317–324, 15 maio 2017.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 27 jun. 2005.

POVEDANO, M. M. D.; CASTRO, M. D. L. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 1–21, 19 ago. 2015.

PRADEEP, G. C.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. S.; SEONG, C. N.; CHO, S. S.; LEE, H. J.; YOO, J. C. A novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces* sp. CS428. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1188–1196, 2013.

- QADIR, F.; SHARIQ, M.; AHMED, A.; SOHAIL, M. Evaluation of a yeast co-culture for cellulase and xylanase production under solid state fermentation of sugarcane bagasse using multivariate approach. 2018.
- RAJAGOPALAN, G.; SHANMUGAVELU, K.; YANG, K. L. Production of prebiotic-xylooligosaccharides from alkali pretreated mahogany and mango wood sawdust by using purified xylanase of *Clostridium strain* BOH3. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 158–166, 2017.
- RAZA, A.; BASHIR, S.; TABASSUM, R. Statistical based experimental optimization for co-production of endo-glucanase and xylanase from *Bacillus sonorensis* BD92 with their application in biomass saccharification. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 3, p. 295–305, 25 maio 2019.
- 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, 1 jan. 2016.
- RIBEIRO, M. A. Z. C.; SALGADO, A. M.; DIAS, B. **Tecnologia Enzimática**. Epub edito ed. Rio de Janeiro: Epub editora, 2008.
- RIBEIRO, T. DA R.; KALIL, S. J.; SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; GAUTÉRIO, G. V. Caracterização de xilanase bruta e parcialmente purificada produzida por *Aureobasidium pullulans* utilizando farelo de arroz como substrato. Anais do 1 Congresso de Inovação e Biotecnologia - InovaBiotec. In: **Anais...** 1. ed. Lajeado: Editora Univates, 2019. p. 22.
- RODRIGUES, C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; JUNIOR LETTI, L. A.; KARP, S. G.; GOELZER, F. D.; SOBRAL, K. C. A.; CORAL, J. D.; CAMPIONI, T. S.; MACENO, M. A. C.; SOCCOL, C. R. Materias lignocelulósicos como matéria-prima para obtenção de biomoléculas de valor comercial. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. (Eds.). **Biotecnologia aplicada à agro&indústria : fundamentos e aplicações**. São Paulo: Bluche, 2016. p. 1069.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 3º ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade fé e Amor, 2014.
- ROSMINE, E.; SAINJAN, N. C.; SILVESTER, R.; ALIKKUNJU, A.; VARGHESE, S. A. Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 393–401, 2017.
- SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. DE; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SEEMAKRAM, W.; BOONRUNG, S.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of low molecular weight alkaline xylanase from *Neosartorya tatenoi* KCU-CLB-3-2-4-1. **Mycoscience**, v. 57, n. 5, p. 326–333, set. 2016.
- SHAHRESTANI, H.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; TAVAKOLI, O. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-

- functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 51–58, 15 maio 2016.
- SHARIQ, M.; SOHAIL, M. Application of *Candida tropicalis* MK-160 for the production of xylanase and ethanol. 2018.
- SHENG, P.; XU, J.; SACCONI, G.; LI, K.; ZHANG, H. Discovery and characterization of endo-xylanase and β -xylosidase from a highly xylanolytic bacterium in the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 33–40, 2014.
- SILVA, J. R. F.; CANTELLI, K. C.; ASTOLFI, V.; TRES, M. V.; DALLA ROSA, C.; BENDER, J. P.; FOLETTO, E. L.; RICORDI, R. G.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. Influence of ultrasound and compressed liquefied petroleum gas on xylanase activity. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 2, p. 109–116, 17 mar. 2014.
- SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology Purification**, v. 18, n. 2015, p. 307–313, 2015.
- SILVA MENEZES, B.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 58, 25 mar. 2017.
- SIN, H. N.; YUSOF, S.; HAMID, N. S. A.; RAHMAN, R. A. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 4, p. 313–319, 2006.
- SINDHU, R.; BINOD, P.; MATHEW, A. K.; ABRAHAM, A.; GNANSOUNOU, E.; UMMALYMA, S. B.; THOMAS, L.; PANDEY, A. Development of a novel ultrasound-assisted alkali pretreatment strategy for the production of bioethanol and xylanases from chili post harvest residue. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 146–151, 2017.
- SINGH, J.; KUNDU, D.; DAS, M.; BANERJEE, R. Enzymatic Processing of Juice From Fruits/Vegetables : An Emerging Trend and Cutting Edge Research in Food. In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 419–432.
- SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 19–30, jan. 2015.
- SIPPONEN, M. H.; PASTINEN, O. A.; STRENGELL, R.; HYÖTYLÄINEN, J. M. I.; HEISKANEN, I. T.; LAAKSO, S. Increased water resistance of CTMP fibers by oat (*Avena sativa* L.) husk lignin. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3511–3518, 13 dez. 2010.
- SKIBA, E. A.; MIRONOVA, G. F.; KUKHLENKO, A. A.; ORLOV, S. E. Enhancing the yield of bioethanol from the lignocellulose of oat hulls by optimizing the composition of the nutrient medium. **Catalysis in Industry**, v. 10, n. 3, p. 257–262, 9 jul. 2018.
- SOUZA, L. O.; BRITO, A. R.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FERRAZ, J. L. A. A.; OLIVEIRA, E. A.; FERNANDES, A. G. A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bag.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 16, p. 277–284, 2018.

SUBHEDAR, P. B.; BABU, N. R.; GOGATE, P. R. Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 326–332, 2015.

SUGUMARAN, K. R.; GOWTHAMI, E.; SWATHI, B.; ELAKKIYA, S.; SRIVASTAVA, S. N.; RAVIKUMAR, R.; GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 697–703, jan. 2013.

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, 1 jan. 2016.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39–67, 27 jan. 1997.

SURYAWANSHI, R. K.; JANA, U. K.; PRAJAPATI, B. P.; KANGO, N. Immobilization of *Aspergillus quadrilineatus* RSNK-1 multi-enzymatic system for fruit juice treatment and mannooligosaccharide generation. **Food Chemistry**, v. 289, n. October 2018, p. 95–102, 2019.

SZABO, O. E.; CSISZAR, E. Some factors affecting efficiency of the ultrasound-aided enzymatic hydrolysis of cotton cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 357–363, 2017.

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. 1, p. 447, 9 set. 2013.

TAMANINI, C.; OLIVEIRA, A. S. DE; FELIPE, M. DAS G. DE A.; CANETTIERI, E. V.; CÂNDIDO, E. DE J.; HAULY, M. C. DE O. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum Technology**, v. 26, n. 2, p. 117–125, 2004.

TAVARES, E. Q. P.; BUCKERIDGE, M. S. Do plant cell walls have a code? **Plant Science**, v. 241, p. 286–294, 1 dez. 2015.

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4139–4143, jun. 2010.

TOMME, P.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. In: **Advances in Microbial Physiology**. Advances i ed. Canada: Academic Press Ltda, 1995. v. 37p. 1–81.

TRAN, T. T. T.; NGUYEN, K. T.; LE, V. V. M. Effects of ultrasonication variables on the activity and properties of alpha amylase preparation. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 3, p. 702–710, 2018.

ULLAH, S.; IRFAN, M.; SAJJAD, W.; RANA, Q. U. A.; HASAN, F.; KHAN, S.; BADSHAH, M.; ALI SHAH, A. Production of an alkali-stable xylanase from *Bacillus pumilus* K22 and its application in tomato juice clarification. **Food Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 353–372, 2 out. 2019.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

- USDA. **United States Department of Agriculture**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2019.
- UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. **Enzymes in the Beverage Industry**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- VÁZQUEZ, M. .; ALONSO, J. .; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. . Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387–393, nov. 2000.
- VERJANS, P.; DORNEZ, E.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Selectivity for water-unextractable arabinoxylan and inhibition sensitivity govern the strong bread improving potential of an acidophilic GH11 *Aureobasidium pullulans* xylanase. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 331–337, 2010.
- WANG, D.; YAN, L.; MA, X.; WANG, W.; ZOU, M.; ZHONG, J.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 453–461, 2018.
- WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; WANG, C. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 816–821, 19 jul. 2009.
- WANG, Z.; LIN, X.; LI, P.; ZHANG, J.; WANG, S.; MA, H. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 222–227, 1 ago. 2012.
- WEI, P.; CHENG, C.; LIN, M.; ZHOU, Y.; YANG, S. T. Production of poly(malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans* : Kinetics and process economics. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 581–589, jan. 2017.
- WU, H.; CHENG, X.; ZHU, Y.; ZENG, W.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 1, p. 46–51, 2018.
- YANG, H.; WANG, K.; SONG, X.; XU, F. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7171–7176, 2011.
- YEGIN, S. Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* on globe artichoke stem: Bioprocess optimization, enzyme characterization and application in saccharification of lignocellulosic biomass. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 441–449, 2016.
- YEGIN, S.; BUYUKKILECI, A. O.; SARGIN, S.; GOKSUNGUR, Y. Exploitation of Agricultural Wastes and By-Products for Production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 Xylanase: Screening, Bioprocess Optimization and Scale Up. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 999–1010, 2017.
- YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 67–75, 2017.
- YEĞİN, S. *Aureobasidium pullulans* ile ksilanaz üretimine etki eden biyoproses

parametrelerin belirlenmesi. **Gida The Journal of Food**, v. 42, n. 1, p. 67–75, 2017.

YU, H.; GONG, J.; ZHANG, C.; JIN, F. Purification and characterization of ginsenoside- α -L-rhamnosidase. **Chemical and pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 2, p. 175–178, 2002.