UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola*

Sibeli De Carli

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola*

Sibeli De Carli

Orientadora: Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Carli, Sibeli

Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola*. Ribeirão Preto, 2016.

139 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientadora: Furriel, Rosa dos Prazeres Melo.

1. *Colletotrichum graminicola.* 2. Endo-xilanase. 3. Halotolerante. 4. Termoestabilidade. 5. Sacarificação da hemicelulose. 6. Etanol lignocelulósico.

Folha de Aprovação

Sibeli De Carli

Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola*

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____

Assinatura _____

RESUMO

A viabilidade econômica da produção de etanol de segunda geração (2G) depende do desenvolvimento de tecnologias eficientes e baratas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Em particular, o grande consumo de água nas plantas de processamento de biomassa pode inviabilizar o processo. As xilanases são enzimas chave na hidrólise enzimática da xilana para a produção de etanol 2G e atualmente é grande o interesse na identificação de xilanases tolerantes a altas concentrações salinas, bem como aos subprodutos de etapas de pré-tratamento da biomassa, o que permitiria reduzir o volume de água empregado em etapas de lavagem e/ou a substituição da água doce pela água do mar. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram a purificação e caracterização bioquímica e cinética de uma endo-xilanase halotolerante e termoestável produzida por uma linhagem de *C. graminicola* isolada da floresta Amazônica (Brasil). A enzima pura (Excg1) apresentou massa molecular aparente de 20,0 ± 2,4 kDa em SDS-PAGE e 17,3 ± 1,9 kDa por filtração em gel, sugerindo que a enzima nativa é monomérica. O teor de carboidratos totais de Excg1 foi de 97,0 ± 3,7 % (m/m) e o seu ponto isoelétrico correspondeu a 9,200 ± 0,018. A enzima manteve cerca de 85% da atividade controle na presença de NaCl 0,5 $mol.L^{-1}$. Em ausência e presença de NaCl em concentração 0,5 $mol.L^{-1}$ a temperatura e o pH ótimos de atividade de Excg1 foram 65 ºC e 5,5, respectivamente, enquanto na presença de NaCl 2,5 $mol.L^{-1}$ o pH ótimo foi alterado para 6,0. Excg1 mostrou-se bastante termoestável a 50ºC, com tempo de meia-vida de 48 h na ausência do substrato. Já na presença de NaCl 2,5 $mol.L^{-1}$ a termoestabilidade foi substancialmente maior, com atividade residual de 75% após o mesmo intervalo de tempo. Excg1 apresentou excelente estabilidade na faixa de pH de 3,0-10,0 na ausência de sal, mantendo-se também completamente estável entre pH 4,0 e 10,0 na presença de NaCl em concentração 0,5 e 2,5 $mol.L^{-1}$. Os parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 na ausência de NaCl foram V_{max}= 481,3 ± 34,0 $U.mg^{-1}$ e K_M= 3,7 ± 0,3 $mg.mL^{-1}$, resultando em eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) de 36,9 $mL.s^{-1}.mg^{-1}$. Parâmetros muito similares foram determinados na presença de NaCl 0,5 $mol.L^{-1}$, porém em presença do sal em concentração 2,5 $mol.L^{-1}$ ocorreu diminuição da afinidade aparente pelo substrato e redução da velocidade máxima, resultando em eficiência catalítica 2,3 vezes menor. Já a hidrólise de xilana *Birchwood* em ausência de sal ocorreu com constante de afinidade aparente similar e eficiência catalítica cerca de 18% maior, se comparada à hidrolise de xilana *Beechwood* na mesma condição. Excg1 foi tolerante a K^+, Na^+, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+} e Sr^{2+} em concentração 10 $mmol.L^{-1}$, além de Cu^{2+}, Al^{3+}, Cr^{3+} e Fe^{3+} em concentração 1 $mmol.L^{-1}$. Além disso, Excg1 foi tolerante a diferentes solventes orgânicos e a acetato. A análise dos produtos de hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 revelou que os produtos principais formados foram xilobiose e xilotriose com uma ramificação de ácido 4-O-metilglucurônico. A presença de NaCl 0,5 $mol.L^{-1}$ não afetou este padrão de hidrólise e a enzima mostrou também boa tolerância aos produtos de hidrólise. Em conjunto, as propriedades de Excg1 sugeriram bom potencial de aplicação na sacarificação da biomassa lignocelulósica, particularmente em condições de salinidade elevada e/ou em presença de resíduos de etapas de pré-tratamento, o que é potencialmente interessante para viabilizar economicamente processos de produção de etanol 2G.

Palavras chaves: *Colletotrichum graminicola*, endo-xilanase, halotolerância, termostabilidade, sacarificação da hemicelulose, etanol lignocelulósico.

ABSTRACT

The economic viability of the production of second-generation (2G) ethanol depends on the development of efficient and inexpensive technologies for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. In particular, the large consumption of water in the biomass processing plants can make the process unfeasible. The xylanases are key enzymes in the enzymatic hydrolysis of xylan aiming the production of 2G ethanol and there is currently great interest in identifying xylanases tolerant to high salt concentrations and to the byproducts from biomass pretreatment steps, allowing the reduction of the volume of water used in washing steps and/or the replacement of fresh water by sea water. In this context, the objectives of this work were the purification and the biochemical and kinetic characterization of a salt-tolerant and thermostable endoxylanase produced by a strain of *C. graminicola* isolated from the Amazon forest (Brazil). The pure enzyme (Excg1) showed apparent molecular mass of 20.0 ± 2.4 kDa by SDS-PAGE and 17.3 ± 1.9 kDa by gel filtration, suggesting that the native enzyme is monomeric. The total carbohydrate content of Excg1 was 97.0 ± 3.7% (m/m) and its isoelectric point corresponded to 9.200 ± 0.018. The enzyme retained approximately 85% of control activity in the presence of 0.5 $mol.L^{-1}$ NaCl. In the absence and presence of NaCl at 0.5 $mol.L^{-1}$ concentration, the optimum reaction temperature and pH of Excg1 were 65 ° C and 5.5, respectively, while in the presence of 2.5 $mol.L^{-1}$ NaCl the optimum pH was altered to 6.0. Excg1 was highly thermostable at 50 °C, with a half-life of 48 h in the absence of substrate. In the presence of 2.5 $mol.L^{-1}$ NaCl the thermal stability was greatly increased, and a residual activity of 75% was determined after 48 h at 50 ºC. Excg1 showed excellent stability in the pH range from 3.0 to 10.0 in the absence of salt, and was likewise completely stable at pH 4.0-10.0 in the presence of NaCl at the concentrations 0.5 $mol.L^{-1}$ and 2.5 $mol.L^{-1}$. The kinetic parameters for the hydrolysis of Beechwood xylan by Excg1 in the absence of salt were V_{max} = 481.3 ± 34.0 $U.mg^{-1}$ and K_M = 3.7 ± 0.3 $mg.mL^{-1}$, with a catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) of 36.9 $mL.s^{-1}.mg^{-1}$. Similar parameters were determined in the presence of 0.5 $mol.L^{-1}$ NaCl, while in the presence of a higher salt concentration (2.5 $mol.L^{-1}$) decreases in the apparent affinity for the substrate and in the maximum velocity were observed, resulting in a catalytic efficiency 2.3 fold lower. In comparison with Beechwood xylan, the hydrolysis of Birchwood xylan in the absence of salt occurred with similar apparent affinity and catalytic efficiency about 18% greater. Excg1 was tolerant to 10 $mmol.L^{-1}$ K^+, Na^+, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+} or Sr^{2+}, and also to Cu^{2+}, Al^{3+}, Cr^{3+} e Fe^{3+} at 1 $mmol.L^{-1}$ concentration. Furthermore, the enzyme was tolerant to various organic solvents and acetate. The analysis of Beechwood xylan hydrolysis products by Excg1 revealed that the main products were xylobiose and xylotriose with a 4-O-methylglucuronic acid branch. The presence of 0.5 $mol.L^{-1}$ NaCl has not affected the hydrolysis pattern and the enzyme showed good tolerance to the hydrolysis products. Altogether, the properties of Excg1 suggested good potential for the saccharification of lignocellulosic biomass, particularly under high salinity conditions and/or in the presence of residues of pre-treatment steps, which is potentially interesting for the economically viable production of 2G ethanol.

Key words: *Colletotrichum graminicola*, endo-xylanase, halotolerance, thermostability, saccharification of hemicellulose, lignocellulosic ethanol.

Introdução

1. Introdução

1.1. Consumo de energia e o meio ambiente

A relação energia e meio ambiente, particularmente a questão do aquecimento global, devido à emissão dos gases causadores do efeito estufa, está entre as maiores preocupações da sociedade atual. Não há dúvidas de que a energia é a força motriz para o progresso da civilização, e que o consumo de energia *per capita* é um fator limitante para a prosperidade de uma nação. Durante décadas, o consumo de energia no mundo cresceu a passos largos para atender às necessidades da população mundial e à melhoria da qualidade de vida.

No entanto, a dependência global de combustíveis provenientes de fontes de energia não renováveis proporciona grandes prejuízos, tanto econômicos quanto ambientais. O consumo mundial de combustíveis derivados do petróleo, por exemplo, é cerca de 100.000 vezes mais rápido do que sua produção natural (CHAUHAN et al., 2016). De acordo com esta estimativa, a disponibilidade das reservas de combustíveis fósseis acabará em questão de anos (AMARA et al., 2016; CHAUHAN et al., 2016).

Além disso, a poluição atmosférica cresceu assustadoramente nas últimas décadas, em decorrência do consumo desenfreado de combustíveis fósseis. Isso porque o componente principal gerado na sua combustão é o gás carbônico (CO_2), que contribui substancialmente para o aquecimento global (VELEA et al., 2009; HUANG, G. et al., 2016). Do mesmo modo, este gás contribui para outros efeitos negativos sobre o ambiente, como a chuva ácida, e para uma série de problemas relativos à saúde humana (HUANG, G. et al., 2016).

Como alternativa ao uso de combustíveis derivados do petróleo e visando também à diminuição da emissão de poluentes e gases causadores do efeito estufa, atualmente há um grande interesse na utilização de combustíveis provenientes de

fontes de energia renováveis (LIMAYEM e RICKE, 2012; CHOVAU et al., 2013; KENNES et al., 2015; LIGUORI et al., 2016). Nesse sentido, a utilização do chamado “etanol de segunda geração” (etanol 2G) tem despertado grande atenção em nível mundial, devido às numerosas vantagens, tanto econômicas quanto ambientais (BUSSAMRA et al., 2015; SAINI et al., 2015; KENNES et al., 2015). Este biocombustível é obtido principalmente a partir de materiais lignocelulósicos, uma fonte de energia altamente abundante e renovável (KENNES et al., 2015; KUMAR, R. et al., 2016).

Além do crescente interesse mundial na utilização de biocombustíveis, no Brasil o desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol 2G também é estimulado pelos grandes volumes de resíduos agroindustriais gerados anualmente (FARINAS et al., 2008; BUSSAMRA et al., 2015; MORALES et al., 2015). Isso porque o país é o maior exportador e o segundo maior produtor de etanol de primeira geração no mundo, a partir da cana-de-açúcar (MORALES et al., 2015). Dados da safra 2015/2016 apontam para um processamento de cerca de 617,65 milhões de toneladas de cana-de-açúcar somente na região Centro-Sul do país (UNICA, 2016), e estudos indicam que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço, em massa seca (PIPPO et al., 2011; SANTOS et al., 2012). Embora esses resíduos sejam utilizados pelas usinas atualmente para cogeração de energia (PIPPO et al., 2011), o excedente poderia ser utilizado para a produção de etanol, aumentando substancialmente a produtividade por hectare de cana plantada, contribuindo, assim, para a diminuição da competição pelo uso da terra para a geração de energia e produção de alimentos (GOLDEMBERG et al., 2008; LIGUORI et al., 2016). Paralelamente, outros resíduos agroindústrias como casca e palha de arroz, bagaço de laranja, palha e sabugo de milho, além da palha da soja também são abundantes no país e representam potenciais matérias primas baratas para a produção de etanol de segunda geração (LIGUORI et al., 2013). Em contraste, esses resíduos podem representar grande ameaça ao meio ambiente quando descartados de maneira inadequada (BHATIA et al., 2012). Assim, o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis pode trazer grandes benefícios, tanto em aspectos econômicos quanto ambientais (BHATIA et al., 2012; IQBAL et

al., 2013; SINGHANIA et al., 2013; COLABARDINI et al., 2014; KENNES et al., 2015).

Embora existam dificuldades técnicas e econômicas para a produção do etanol 2G em escala industrial, ela já é uma realidade no Brasil. Atualmente existem três usinas no país que produzem o biocombustível (UNICA, 2016). A primeira delas foi inaugurada em 2014 pela empresa Granbio Sérgio Godoy, em São Miguel dos Campos - AL. Outras duas foram inauguradas recentemente, no estado de São Paulo: em 2014, a Usina São Manoel, localizada no município de São Manuel; e em 2015, a primeira usina do grupo Raízen produtora de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana, em Piracicaba (UNICA, 2016).

A despeito disso, é necessário o contínuo aperfeiçoamento dos processos de produção de etanol 2G, visando maior competitividade no mercado, o que tem sido limitado, entre outros fatores, pela recalcitrância da biomassa lignocelulósica (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). Essa resistência, tanto à hidrólise química quanto biológica, está relacionada ao fato de celulose, hemicelulose e lignina formarem uma matriz tridimensional complexa, nas paredes celulares vegetais (GUPTA e VERMA, 2015; DAMM et al., 2016; SUN et al., 2016). De fato, como resultado de processos de adaptação evolutiva, as paredes celulares dos vegetais desenvolveram a importante função de impedir o ataque exercido por microrganismos, constituindo a primeira barreira entre as células e o ambiente (SØRENSEN et al., 2010). Nessa matriz tridimensional complexa, os polissacarídeos, em especial a celulose, estão protegidos da degradação (ZHAO, X. et al., 2012; DIMAROGONA et al., 2013; IQBAL et al., 2013).

1.2. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por lignina, celulose e hemicelulose (Fig. 1), além de pectina, proteínas, ceras e sais minerais (ZHAO, X. et al., 2012; JORDAN et al., 2012 ; WANG, M. et al., 2013; KENNES et al., 2015).

A lignina é um heteropolímero aromático que, associado aos polissacarídeos, confere rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. É constituída por unidades fenilpropano, sintetizadas a partir de três álcoois *p*-hidróxi-cinamílicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Fig. 1) (BHATIA et al., 2012; ZHAO, X. et al., 2012; IQBAL et al., 2013).

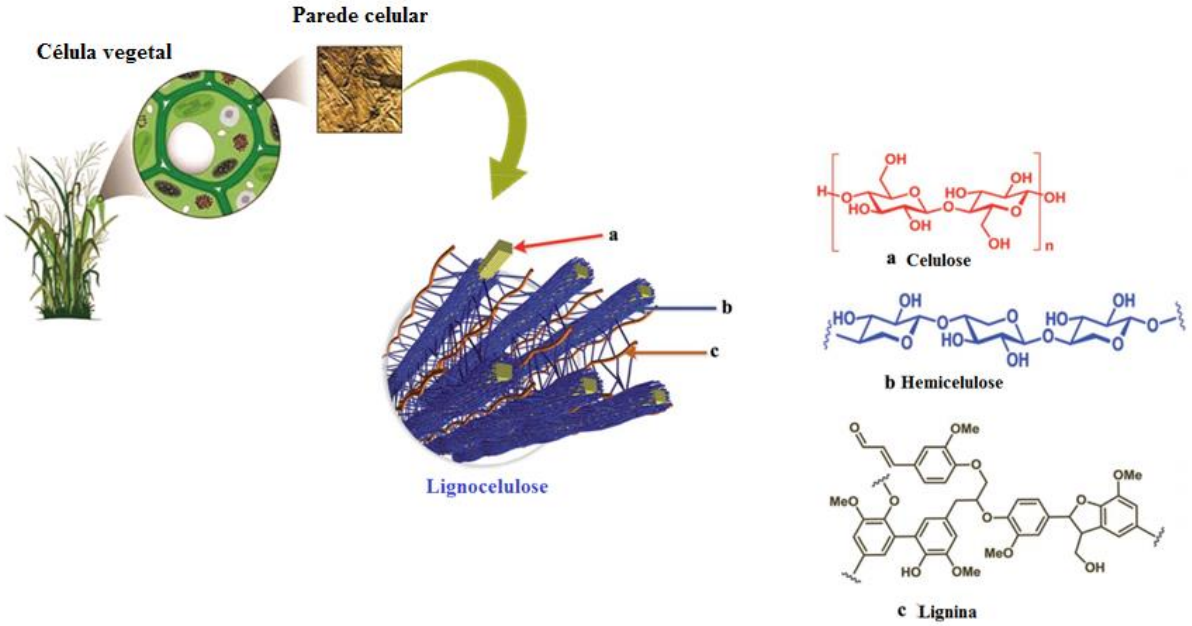

Figura 1. Organização estrutural da parede celular vegetal. Adaptado de Kondo et al. (1996).

A celulose é o principal componente (35 a 50% em massa) da parede celular das plantas. Este polímero é constituído por uma cadeia não ramificada de monômeros de D-glicose unidos entre si por ligações O-glicosídicas do tipo β-1,4 (Fig. 1) (IQBAL et al., 2013; SUN et al., 2016). Sua conformação estendida é a mais estável, devido à configuração β das ligações glicosídicas, originando cadeias longas e retas (GIBSON, 2012; DAMM et al., 2016). Várias cadeias de celulose, paralelas entre si, unem-se por ligações de hidrogênio formando microfibrilas, estruturas supramoleculares cristalinas, de alta resistência tensional e com poucas

regiões amorfas (ZHAO, X. et al., 2012; IQBAL et al., 2013; SUN et al., 2016). A junção de várias microfibrilas originam as fibrilas, redes de microfibrilas embebidas por uma matriz amorfa, constituída por polissacarídeos não celulósicos, em especial as hemiceluloses, além de lignina (ZHAO, X. et al., 2012; PAULY et al., 2013; DAMM et al., 2016).

As hemiceluloses constituem uma classe de heteropolissacarídeos estruturalmente diversos que se associam à celulose principalmente por ligações de hidrogênio, formando também ligações covalentes com a lignina, favorecendo a adesão e coesão das fibras, a manutenção da integridade da parede celular vegetal e a proteção da celulose contra a ação de celulases (BEG et al., 2001; JORDAN et al., 2012; ZHAO, X. et al., 2012; SHARMA e KUMAR, 2013; DAMM et al., 2016). Este polissacarídeo representa cerca de 20 a 35%, em massa, da parede celular vegetal e apresenta grande variabilidade química e molecular. Sua cadeia principal é composta por pentoses (principalmente D-xilose, L-arabinose) e hexoses (D-manose, D-glicose ou D-galactose) unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β-1,4 e geralmente possui ramificações (Fig. 1) (DEUTSCHMAN e DEKKER, 2012). As ramificações podem conter ácidos urônicos (ácidos α-D-glucurônico, α-D-4-O-metil-galacturônico e α-D-galacturônico), ácido ferúlico e outros açúcares, como arabinose, galactose, além de α-L-ramnose e α-L-fucose, em pequenas proporções. Além disso, os grupos hidroxila dos monossacarídeos podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil (DEUTSCHMAN e DEKKER, 2012; SUN et al., 2016). As cadeias principais apresentam grau de polimerização (~70 a 200), grau de substituição, tipo e distribuição de substituintes altamente variáveis, dependendo do tecido celular, do estágio de desenvolvimento e da espécie vegetal (ZHAO, X. et al., 2012; PAULY et al., 2013; SUN et al., 2016).

As xilanas são a principal forma de hemicelulose encontrada na parede celular vegetal, representando cerca de 5 a 15% da biomassa da madeira de folhosas, e até cerca de 50% dos tecidos de monocotiledôneas, gramíneas e cereais (COLLINS et al., 2005; DEUTSCHMAN e DEKKER, 2012; DAMM et al., 2016). A cadeia principal é constituída por resíduos de xilose e sua estrutura química varia desde um homopolímero linear até um heteropolissacarídeo altamente ramificado (Fig. 2). As ramificações, que contêm usualmente arabinose, ácido glucurônico ou metilglucurônico, determinam em grande parte as propriedades da xilana, tais como

solubilidade, conformação e reatividade (PAULY et al., 2013; GORSHKOVA et al., 2013; JURUTU e WU, 2013; SHARMA e KUMAR, 2013; SUN et al., 2016).

Com relação à estrutura e aos grupos substituintes mais comuns, as xilanas podem ser classificadas como: homoxilanas lineares, arabinoxilanas, glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas e galactoglucoronoarabinoxilanas. As homoxilanas são formadas unicamente por resíduos de D-xilose, não são ramificadas e não são comumente encontradas na natureza, sendo isoladas de poucas fontes, como alguns tipos de gramas, algas e talos de tabaco (FILHO, 2004; CORRAL e VILLASEÑOR-ORTEGA, 2006; MOTTA et al., 2013).

Já as xilanas substituídas podem ser classificadas em quatro grandes grupos (POLIZELI et al., 2005; CORRAL e VILLASEÑOR-ORTEGA, 2006; MOTTA et al., 2013):

1. Arabinoxilanas: possuem cadeias laterais formadas apenas por unidades de α-L-arabinofuranosil e são comumente isoladas de cereais, como o trigo;
2. Glucuronoxilanas: possuem o ácido α-D-glucurônico ou o seu derivado, o ácido 4-O-metil-glucurônico, como único substituinte. São encontradas na madeira de folhosas, como a faia (*Beechwood*) e a bétula (*Birchwood*);
3. Glucuronoarabinoxilanas: possuem tanto os ácidos α-D-glucurônico e 4-O-metil-glucurônico, como unidades de α-L-arabinofuranosil como grupos substituintes. São tipicamente encontradas em gimnospermas, como coníferas, além de estarem presentes em gramíneas e cereais.
4. Galactoglucoronoarabinoxilanas: apresentam resíduos de β-D-galactopiranosil na cadeia lateral, além dos grupos já presentes em glucuronoarabinoxilanas. São encontradas em plantas perenes.

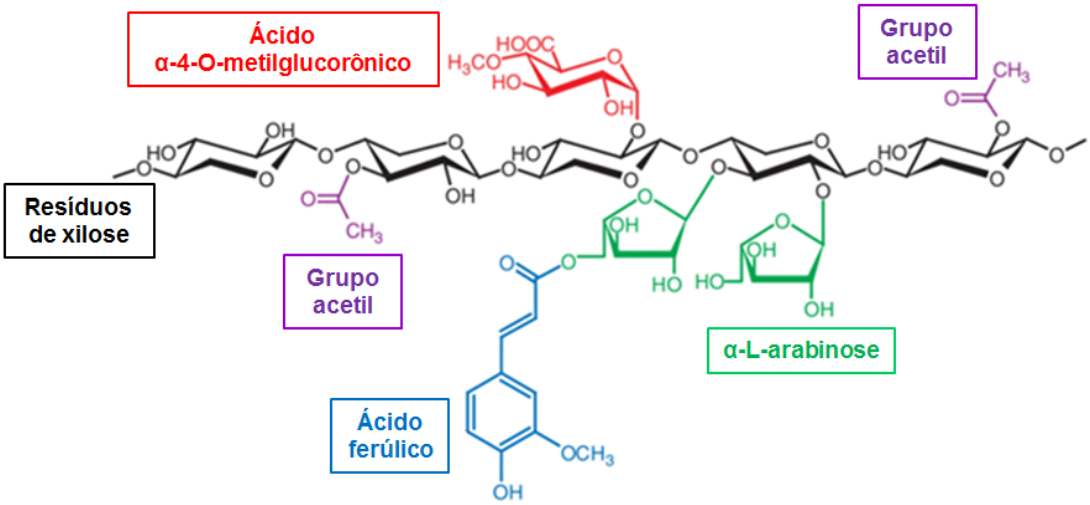

Figura 2. Estrutura química geral das xilanas. Adaptado de Collins et al. (2005).

1.3. Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica: o complexo xilanolítico

A hidrólise eficiente da biomassa lignocelulósica é um dos passos essenciais para a produção economicamente viável de etanol 2G. A hidrólise pode ser realizada por métodos químicos ou enzimáticos; entretanto, os métodos enzimáticos são considerados atualmente mais promissores, além de menos agressivos ao meio ambiente (LIGUORI et al., 2013; JONSSON et al., 2013; SINGHVI et al., 2014; KENNES et al., 2015, LIGUORI et al., 2016).

Durante décadas apenas a hidrólise da celulose foi o foco da atenção dos pesquisadores. O consenso atual sugere, entretanto, que a produção de etanol de segunda geração a preços competitivos depende da hidrólise eficiente tanto da celulose como das hemiceluloses, além da fermentação eficiente das pentoses e hexoses liberadas e do aproveitamento da lignina (LIMAYEM e RICKE, 2012; CHOVAU et al., 2013; SINGHVI et al., 2014; RAGAUSKAS et al., 2014; MORALES et al., 2015). Dessa forma, é crescente o interesse na hidrólise enzimática das hemiceluloses (JUTURU e WU, 2012; SHARMA e KUMAR, 2013; MORALES et al., 2015) e da lignina (RICO et al., 2014), bem como no desenvolvimento, por meio de

técnicas de engenharia metabólica, de leveduras capazes de fermentar pentoses e hexoses com bons rendimentos (NIELSEN et al., 2013; COLABARDINI et al., 2014; MORALES et al., 2015).

A hidrólise eficiente e completa da xilana requer um sistema enzimático complexo devido à sua heterogeneidade química e estrutural, uma vez que vários tipos de ligações e unidades monoméricas estão presentes em sua estrutura (MOREIRA e FILHO, 2016; KUMAR, V. et al., 2016). Este sistema enzimático é conhecido como sistema ou complexo xilanolítico (Fig. 3) e suas principais enzimas atuam sinergicamente tanto sobre a cadeia principal quanto sobre as cadeias laterais da xilana (MOREIRA e FILHO, 2016).

As principais enzimas do complexo xilanolítico são a endo-β-1,4-xilanase (1,4 β-1,4-xilana xilohidrolase, EC 3.2.1.8), que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas internas da cadeia principal liberando xilooligossacarídeos, xilobiose e xilose (MOREIRA e FILHO, 2016; KUMAR, V. et al., 2016) e a β-D-xilosidade (β-D-xilosídeo xilohidrolase, EC 3.2.1.37), que atua sobre os xilooligossacarídeos e a xilobiose, liberando xilose (POLIZELI et al., 2005; SHARMA e KUMAR, 2013; UDAY et al., 2016). Já a remoção dos grupos substituintes é catalisada por diferentes enzimas acessórias, que incluem α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), que remove resíduos de arabinose; α-glucuronidase (EC 3.2.1.139), que libera ácido glucurônico ou metilglucurônico; α-galactosidase (EC 3.2.1.22), que remove resíduos de galactose; acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72), que hidrolisa ligações acetil-éster; ácido *p*-cumárico esterase (EC 3.1.1.-) e ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.73), que hidrolisa ligações feruloiléster e *p*-cumaroil-éster, respectivamente (POLIZELI et al., 2005; JUTURU e WU, 2012; SHARMA e KUMAR, 2013; ERGÜN e ÇALIK, 2016).

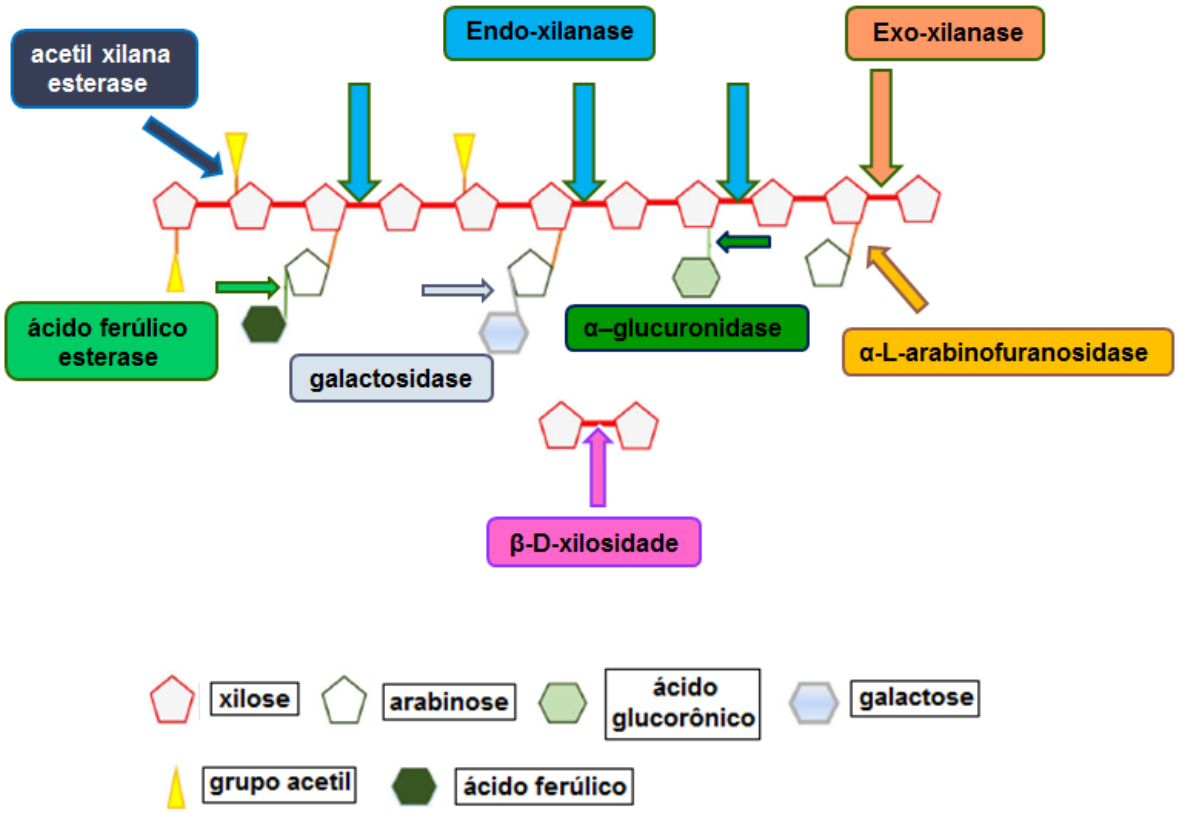

Figura 3. Estrutura da xilana e pontos de ação das enzimas do complexo xilanolítico. Adaptado de Ergün e Çalik (2016).

As endo-xilanases e β-xilosidases atuam sinergicamente na hidrólise da xilana, e uma boa parte das endo-xilanases conhecidas é inibida pelos produtos finais de reação, xilobiose e xilooligossacarídeos curtos (POLIZELI et al., 2005; KNOB et al., 2010; YANG et al., 2014). Assim, além de catalisar o passo final da hidrólise, as β-xilosidases desempenham um papel importante no alívio da inibição das endo-xilanases pelos produtos, possibilitando uma maior eficiência do processo como um todo. Um forte sinergismo também é observado entre as endo-xilanases e as enzimas acessórias. Considerando, por exemplo, a presença de ramificações de arabinose, estas podem dificultar a ação das endo-xilanases sobre a cadeia principal; entretanto, a remoção dos resíduos de arabinose pelas α-L-arabinofuranosidases facilita o acesso à cadeia principal, potencializando a ação das endo-xilanases (LAGAERT, et al. 2014).

1.4. Xilanases

As endo-xilanases são as principais enzimas do complexo xilanolítico que atuam no processo de despolimerização da xilana (POLIZELI et al., 2005; JUTURU e WU, 2012; SHARMA e KUMAR, 2013; UDAY et al., 2016). A hidrólise do polímero pode ocorrer randomicamente, porém podem existir sítios específicos para hidrólise que dependem da natureza do substrato, como por exemplo, do comprimento da cadeia principal, do grau de ramificação e do número de substituintes (LI et al., 2000; POLIZELI et al., 2005; CHUTANI et al., 2015).

De acordo com o sistema de classificação das glicosil hidrolases (GH), disponível no banco de dados Cazy (Carbohydrate-Active enzymes), as endo-xilanases pertencem principalmente às famílias GH 10 e 11. No entanto, enzimas com atividade xilanásica também foram classificadas nas famílias GH 5, 7, 8 e 43, por apresentarem diferenças em seus domínios catalíticos, nas propriedades físico-químicas, na estrutura, no modo de ação e/ou na especificidade de substrato (DODD e CANN, 2010; MOTTA et al., 2013; UDAY et al., 2016).

As xilanases pertencentes à família GH 10 tem como propriedades principais a massa molecular usualmente maior que 30 kDa e baixo valores de pI, enquanto as enzimas classificadas na família GH 11 apresentam massa molecular abaixo de 30 kDa e altos valores de pI. Entretanto, exceções a esses padrões já foram relatadas (COLLINS et al., 2005; UDAY et al., 2016).

As xilanases das famílias GH 10 e 11 catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da cadeia principal da xilana com retenção da configuração do carbono anomérico. Dois resíduos de glutamato adequadamente posicionados no sítio ativo estão diretamente envolvidos no mecanismo de catálise, que envolve a formação de um intermediário covalente glicosil-enzima (Fig. 4) (COLLINS et al., 2005; MOREIRA e FILHO, 2016). Um dos resíduos de glutamato, inicialmente protonado, age como catalisador ácido-base, doando H^+ para o substrato, enquanto o outro atua como nucleófilo, atacando o carbono anomérico e levando à clivagem da ligação glicosídica, com saída do grupo de partida e formação do intermediário covalente. No segundo passo, a cadeia lateral do primeiro resíduo de glutamato, que se

encontra desprotonada, atua como aceptor de H^+, abstraindo um próton de uma molécula de água que ataca o carbono anomérico, liberando o produto final e regenerando a enzima livre.

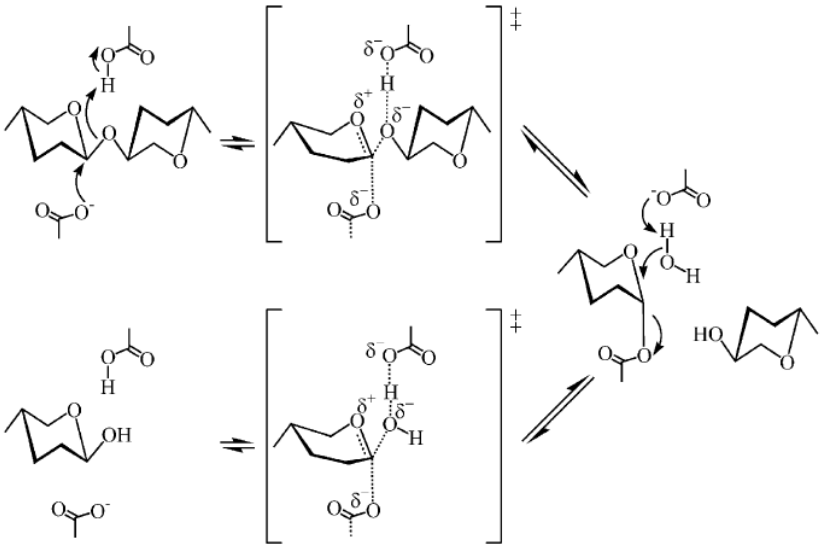

Figura 4: Mecanismo de reação das xilanases das famílias GH10 e 11. Adaptado de Collins et al. (2005).

Na natureza, uma grande variedade de microrganismos é capaz de produzir endo-xilanases, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (POLIZELI et al., 2005; KUMAR, V. et al. 2013a; LOMBARD et al. 2014; KUMAR, V. et al., 2016). Além disso, já foram descritas xilanases purificadas de invertebrados como moluscos, gastrópodes e crustáceos (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997; TURKIEWICZ et al., 2000). No entanto, os fungos filamentosos são conhecidos por produzirem xilanases extracelulares em níveis mais elevados em comparação com leveduras e bactérias, tornando-os atraentes para a produção dessas enzimas em escala industrial (POLIZELI et al., 2005; PAL e KHANUM, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHUTANI et al., 2015). Em particular, os gêneros *Aspergillus, Trichoderma* e *Penicillium*, entre os fungos mesófilos, e o gênero *Thermomyces*, entre os fungos termófilos, são considerados bons produtores de diferentes enzimas eficientes para

a sacarificação da xilana (KNOB e CARMONA, 2010; CHUTANI et al., 2015; KUMAR, V. et al., 2016).

Embora muitas xilanases fúngicas já tenham sido descritas, para cada aplicação pretendida é importante empregar uma enzima que apresente propriedades que favoreçam a sua utilização nas condições desejadas, no que diz respeito a pH e temperatura ótimos de reação, estabilidade ao pH e à temperatura, etc (KUMAR, V. et al., 2016; SUN et al., 2016). Além disso, uma propriedade muito atraente nas endo-xilanases é uma boa tolerância aos produtos de reação (SUN et al., 2016), contribuindo para elevar o rendimento final da sacarificação da xilana. No entanto, esta última propriedade tem sido pouco explorada entre as endo-xilanases já estudadas até o momento.

1.5. Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

Embora a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica seja o processo mais promissor para a produção de etanol 2G, a recalcitrância da matéria-prima dificulta o acesso e a ação das enzimas hidrolíticas sobre os polissacarídeos da parede celular vegetal. Em função disso, é necessário realizar uma ou mais etapas de pré-tratamento da biomassa, que são fundamentais para aumentar a eficiência do processo de hidrólise (KENNES et al., 2015; KARIMI e TAHERZADEH, 2016, SUN et al., 2016). Os diferentes processos de pré-tratamento têm, então, por objetivo aumentar a área superficial e a porosidade da biomassa, bem como reduzir a cristalinidade da celulose (PORTILLO e SAADEDDIN, 2015; KENNES et al., 2015; KARIMI e TAHERZADEH, 2016; KIM, J. et al., 2016).

Nas últimas décadas, vários processos de pré-tratamento foram desenvolvidos, sendo classificados como físicos, químicos e biológicos (SUN et al., 2016). Cada um dos processos de pré-tratamento tem suas vantagens e desvantagens, e algumas combinações de processos podem não só melhorar a acessibilidade dos polissacarídeos da parede celular à ação das enzimas, mas

também facilitar a recuperação da lignina, por exemplo, para a geração de produtos de alto valor agregado (KENNES et al., 2015; KIM, J. et al., 2016; SUN et al., 2016).

Os principais efeitos de alguns dos processos de pré-tratamento conhecidos sobre a composição química e estrutural dos materiais lignocelulósicos estão resumidos na Tabela 1. Considerando a produção de etanol 2G, os processos mais interessantes são aqueles que removem essencialmente a lignina, preservando a celulose e a hemicelulose (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016).

Tabela 1: Efeito de diferentes processos de pré-tratamento sobre a composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos

Método de pré-tratamento	**Remoção da lignina**	**Remoção da hemicelulose**	**Aumento da área acessível**	**Diminuição do grau de cristalinidade da celulose**	**Aumento da porosidade**	**Geração de inibidores de hidrolases**
Alcalino	+++	++	+++	·	+++	-
Ácido	+	+++	+++	·	+	+++
Deslignificação oxidativa	+++	·	·	·	+++	-
Organosolv	+++	-	+++	·	+	-
Líquidos Iônicos	+	-	+++	+++	+++	-
Moagem	·	·	+++	+++	·	+++
Hidrotérmico	+	+++	+	·	+	+++
Explosão a vapor	+++	+++	+++	-	+++	+++
Explosão da fibra com amônia	+	-	+++	+++	+++	-

+++ Efeito alto
+ Efeito médio
- Efeito baixo
· Sem Efeito
Adaptado de SUN et al., 2016.

Assim, dentre os diversos pré-tratamentos desenvolvidos até o momento, os mais apropriados quando se visa à produção de etanol 2G seriam os alcalinos e aqueles que empregam solventes orgânicos (*organosolv*) ou líquidos iônicos (LIs).

Os pré-tratamentos alcalinos brandos envolvem a utilização de reagentes como NaOH, $Ca(OH)_2$, KOH, Na_2CO_3, CaO e hidróxido de amônio, e são comumente usados para remover a lignina (KENNES et al., 2015; KIM, J. et al., 2016; SUN et al., 2016). No entanto, a celulose e a hemicelulose são degradadas e removidas parcialmente (CHENG et al., 2010; KENNES et al., 2015; KIM, J. et al., 2016). Portanto, caso sejam utilizados pré-tratamentos alcalinos, as condições devem ser criteriosamente otimizadas para maximizar a remoção de lignina e minimizar a hidrólise dos polissacarídeos (CHENG et al., 2010; KIM, J. et al., 2016). A despeito disso, após um pré-tratamento alcalino diferentes subprodutos são formados, os quais podem inibir a ação das enzimas hidrolíticas (KENNES et al., 2015; JÖNSSON e MARTÍN, 2016). Um subproduto típico de pré-tratamento alcalino é o ácido acético, formado a partir dos grupos acetil presentes na hemicelulose (JÖNSSON e MARTÍN, 2016). Outra desvantagem dos processos alcalinos é a necessidade de neutralizar a biomassa pré-tratada, levando ao acúmulo de sais, que também podem causar inibição enzimática no passo subsequente, exigindo a realização de etapas de lavagem (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016).

No processo *organosolv*, os solventes orgânicos são utilizados principalmente para extrair a lignina, aumentando o volume e a área superficial das fibras lignocelulósicas e tornando-as mais acessíveis à ação das enzimas hidrolíticas. Muitos solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona, ácidos orgânicos, perácidos orgânicos e etilenoglicol, têm sido utilizados com sucesso para pré-tratar diferentes biomassas (ZHAO, X. et al., 2009; ZHANG, K. et al., 2016). Entretanto, a presença de níveis residuais de solventes na biomassa pré-tratada pode inibir fortemente a atividade das enzimas hidrolíticas e, portanto, o solvente deve ser eliminado após o pré-tratamento. Um dos solventes mais empregados atualmente é o etanol, devido à sua baixa toxicidade e principalmente à facilidade de recuperação (SUN et al., 2016), permitindo prevenir a inibição enzimática e reduzir os custos do processo de pré-tratamento (JÖNSSON e MARTÍN, 2016).

Os pré-tratamentos em que se utilizam LIs, sais com ponto de fusão geralmente menor que 100ºC e usualmente formados por um ânion inorgânico e um cátion orgânico volumoso, têm sido considerados uma alternativa menos poluente para o processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Além disso, reduzem eficientemente a cristalinidade da celulose, preservam grande parte da hemicelulose e removem parte da lignina sem gerar inibidores das hidrolases, contribuindo, assim, para aumentar o rendimento da sacarificação (QIU et al., 2012; KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). No entanto, os próprios LIs frequentemente inibem as glicosil-hidrolases, o que tem sido atribuído à sua interferência sobre as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas das moléculas das enzimas, bem como à eliminação da camada de hidratação, essencial para a função e estabilidade estrutural das proteínas de uma forma geral (PORTILLO e SAADEDDIN, 2015; ZHANG, L. et al., 2007). Consequentemente, etapas de lavagem após o pré-tratamento com LIs também são requeridas, encarecendo o processo (PORTILLO e SAADEDDIN, 2015).

1.6. A produção de etanol 2G e o consumo de água

Nos últimos anos, o elevado consumo de água nas plantas de processamento de biomassa para produção de etanol 2G (1,9 - 5,9 m^3 de água por m^3 de biocombustível produzido) tem despertado grande preocupação da comunidade científica (FANG, C. et al., 2015). Dada a escassez de água doce que já ocorre em muitas regiões ao redor do mundo, privilegiando o uso para consumo humano e resultando também em elevação de preços, a operação das biorrefinarias pode tornar-se difícil, ou até insustentável. Em função disso, vem ganhando relevância a possibilidade do uso de recursos hídricos não potáveis, com destaque para a água do mar, na etapa de pré-tratamento da biomassa e também na etapa de sacarificação, substituindo a água doce nos meios de reação empregados nas biorrefinarias. De fato, este parece ser um campo promissor de pesquisa, além de integrar questões sociais, energéticas, econômicas e ambientais (de MARÍA, 2013).

Até o momento, o emprego de água do mar na fase de pré-tratamento da biomassa foi pouco estudado. Entretanto, alguns autores investigaram o efeito da adição de sais sobre a eficiência do pré-tratamento hidrotérmico de diferentes biomassas (LIU, L. et al., 2009; YU et al. 2011). Mais recentemente, Fang, C. et al. (2015) relataram ainda que a eficiência do pré-tratamento hidrotérmico de folhas de tamareira foi maior quando a água doce foi substituída por água do mar, resultando em maior percentual de celulose amorfa e melhor efeito de descristalização da celulose (menor índice de cristalinidade) ao final do processo. Segundo os autores, a ação dos íons seria análoga à dos LIs, ou seja, a penetração de íons no interior das fibras celulósicas teria um efeito perturbador sobre a extensa rede de ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares (FANG, C. et al., 2015).

No que diz respeito à etapa de sacarificação, por sua vez, é bem conhecido que diferentes íons, em baixas concentrações, podem inibir ou estimular a atividade de muitas enzimas, entre elas as glicosil-hidrolases (ZANOELO et al., 2004; SOUZA, F. et al., 2010; SILVA, J. et al., 2013; MELEIRO et al., 2014; GAUR et al., 2015). Esse efeito pode estar relacionado à interação dos íons com diferentes sítios de ligação presentes nas moléculas das enzimas, e/ou com certos resíduos de aminoácidos importantes para a catálise, ou ainda com o substrato.

Já em presença de concentrações elevadas de sais, a maioria das enzimas apresenta baixa ou nenhuma atividade catalítica, o que tem sido atribuído ao efeito dos íons sobre a estrutura e a dinâmica da água (KARAN et al., 2012). É bem conhecido que a função biológica e a estrutura de uma proteína são afetadas de maneira crítica pelas suas interações superficiais com as moléculas de água, que tendem a interagir favoravelmente com os grupos polares superficiais, formando, ao contrário, capas ordenadas de moléculas unidas por ligações de hidrogênio ao redor das regiões hidrofóbicas expostas. Em altas concentrações salinas, entretanto, os íons sequestram as moléculas de água, limitando a disponibilidade de moléculas livres para a hidratação da proteína. Além disso, desarranjam as estruturas locais organizadas de moléculas de água, por ruptura de ligações de hidrogênio intermoleculares, e perturbam as interações eletrostáticas entre cadeias laterais de resíduos de aminoácidos carregados. Em conjunto, esses efeitos afetam a estrutura e a função da proteína, sua solubilidade, estabilidade e capacidade de interação

com outras moléculas, incluindo outras proteínas, e até mesmo a interação entre subunidades da mesma proteína (KARAN et al., 2012; FANG, C. et al., 2015).

Além da concentração, a natureza dos íons presentes em solução também é importante no que diz respeito aos efeitos desestabilizantes que exercem sobre a estrutura e a função das proteínas. Em geral, o efeito desestabilizante de um íon pode ser previsto pela sua posição na série de Hofmeister (KARAN et al., 2012; FANG, C. et al., 2015). Embora a concentração salina da água do mar varie amplamente de acordo com a localização geográfica, sua composição é bastante conhecida (Tabela 2) e de acordo com a série de Hofmeister, a maior parte dos íons presentes (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Br^{-}, Cl^{-}) pode exercer efeitos desestabilizantes sobre diferentes enzimas, podendo assim influenciar negativamente a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (ZHAO, H., 2005; FANG, C. et al., 2015).

Além dos meios reacionais, outro fator que contribui grandemente para elevar o consumo de água nas biorrefinarias é a necessidade de etapas de lavagem antes da sacarificação da biomassa, visando à remoção de resíduos (tais como altas concentrações de sais, solventes e LIs residuais) e subprodutos de diferentes processos de pré-tratamento (SUN et al., 2016). Em função disso, é crescente o interesse na identificação de glicosil hidrolases, entre elas xilanases, tolerantes a esses resíduos e subprodutos.

Tabela 2: Composição média estimada da água do mar

Componente	**Concentração na água do mar ($g.L^{-1}$)**
NaCl	27,133
$MgCl_2$	2,504
$MgSO_4$	3,382
$CaCl_2$	1,17
KCl	0,74
$NaHCO_3$	0,21
NaBr	0,08
Total de sal	35,22
Água remanescente	964,78

Adaptado de *de* María (2013).

1.7. Microrganismo de estudo: *Colletotrichum graminicola*

Como já citado, os fungos filamentosos são reconhecidamente excelentes produtores de xilanases e outras enzimas lignocelulolíticas (POLIZELI et al., 2005; PAL e KHANUM, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHUTANI et al., 2015). Entre estes, os fungos decompositores de materiais lignocelulósicos são os principais microrganismos utilizados industrialmente para a produção de enzimas lignocelulolíticas com interesse biotecnológico, e os sistemas lignocelulolíticos de diferentes espécies fúngicas têm sido muito estudados (BALDRIAN e GABRIEL, 2003).

Os fungos do gênero *Colletotrichum*, pertencentes ao filo Ascomycota, são fungos mesófilos, endofíticos, fitopatogênicos e apresentam um ciclo de vida hemibiotrófico, ou seja, se hospedam durante uma fase da vida em tecidos vivos e durante outra, em tecidos mortos da planta (PEREIRA et al., 1993; TANG et al., 2006; LUDWIG et al., 2014). O alojamento dos fungos do gênero *Colletotrichum* nos tecidos vegetais parece estar relacionado à sua capacidade em produzir enzimas

extracelulares, que podem degradar os componentes da parede celular das plantas (ACOSTA-RODRIGUES et al., 2005; GAN et al., 2012). Além disso, foi demonstrada a existência de genes nesses microrganismos que codificam para diversas hidrolases (KING et al., 2011; O'CONNELL et al., 2012; GAN et al., 2012).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* são considerados modelos experimentais para o estudo dos mecanismos moleculares dos processos de infecção, resistência do hospedeiro, transdução de sinais e interações planta-patógeno (O'CONNEL et al., 2012; ACOSTA-RODRIGUES et al., 2005). Até o momento, dentre as enzimas produzidas por diferentes espécies de *Colletotrichum* as mais estudadas foram as pectinases e poligalacturonases, responsáveis pelo ataque à pectina presente em folhas e frutos das plantas hospedeiras (HEBERT et al., 2004) e as quitinases, que atuam da degradação da quitina presente nas paredes celulares de fungos e insetos (SOUZA, R. et al., 2003). No entanto, o potencial dos fungos deste gênero para produzir enzimas com interesse biotecnológico foi pouco explorado até o momento.

Recentemente, as condições de cultivo para a produção de xilanases extracelulares, por fermentação em estado sólido (FES) por uma linhagem de *C. graminicola* em troncos em decomposição da floresta Amazônica (Brasil) foram otimizadas empregando a metodologia de superfície de resposta (ZIMBARDI et al., 2013). Este microrganismo mostrou-se excelente produtor de xilanases termoestáveis em meio simples constituído de farelo de trigo, sabugo de milho e sulfato de amônio. Além disso, o extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* mostrou bom potencial para a hidrólise de palha de cana de açúcar, sem pré-tratamento (ZIMBARDI et al., 2013).

Conclusão

5. Conclusão

- ✓ A estratégia padronizada para a purificação de uma xilanase produzida por *C. graminicola* por FES em meio simples e barato mostrou-se eficiente, caracterizando-se pela rapidez, pequeno número de passos e bom rendimento.
- ✓ A enzima purificada (Excg1) é monomérica, apresenta baixa massa molecular (cerca de 20 kDa) e pI elevado (9,2).
- ✓ Excg1 apresentou propriedades interessantes para aplicações biotecnológicas em geral, como boa termoestabilidade e excelente tolerância a uma ampla faixa de pH.
- ✓ O pH ótimo na faixa de 4,5 a 6,0, além da boa tolerância a diferentes íons metálicos e aos produtos de hidrólise (xilose, xilobiose e xilotriose com uma ramificação de ácido 4-O-metilglucorônico) tornam Excg1 particularmente atraente para compor coquetéis enzimáticos para a hidrólise de biomassa lignocelulósica.
- ✓ A atividade de Excg1 mostrou-se tolerante a concentrações elevadas de NaCl e ocorreu aumento da termoestabilidade da enzima em presença de alta concentração do sal (2,5 $mol.L^{-1}$).
- ✓ Na presença de NaCl em concentração 0,5 $mol.L^{-1}$ (concentração média deste sal na água do mar), os parâmetros cinéticos e o padrão de hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 não foram alterados.
- ✓ Excg1 também se mostrou tolerante a acetato e níveis residuais de solventes orgânicos.
- ✓ As propriedades de Excg1 em presença de altas concentrações de NaCl sugerem bom potencial de aplicação em processos biotecnológicos conduzidos em salinidades elevadas, como aqueles em que se pretenda substituir água doce por água do mar. A tolerância a solventes e acetato tornam a enzima potencialmente atraente também para aplicação em processos de sacarificação de biomassa pré-tratada, reduzindo gastos relativos a etapas de lavagem.

Referências

6. Referências

ACOSTA-RODRIGUES, I.; PIÑÓN-ESCOBEDO, C.; ZAVALA-PÁRAMO, M. A. G.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CANO-CAMACHO, H. Degradation of celulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. **Antonie. Van. Leeuwenhoek.**, 87, 301-310, 2005.

AMARA, A. B.; DAUPHIN, R.; BABIKER, H.; VIOLLET, Y.; CHANG, J.; JEULAND, N.; AMER, A. Revisiting diesel fuel formulation from Petroleum light and middle refinery streams based on optimized engine behavior. **Fuel**, 174, 63–75, 2016.

ALCOCER, M. J. C.; FURNISS, C. S. M.; KROON, P. A.; CAMPBELL, M.; ARCHER, D. B. Comparison of modular and non-modular xylanases as carrier proteins for the efficient secretion of heterologous proteins from *Penicillium funiculosum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 60, 726–732, 2003.

BAJAJ, B. K.; ABBASS, M. Studies on an alkali-thermostable xylanase from *Aspergillus fumigatus* MA28. **3 Biotech**, 1, 161–171, 2011.

BAJPAI, P. “Xylanases” in: Schaechter, M. (ed.), Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), **Academic Press**. Oxford, 600-612, 2009.

BAI, W.; XUE, Y.; ZHOU, C.; MA, Y. Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5. **Biotechnol. Lett.**, 34, 2093–2099, 2012.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in presence of cadmium. **FEMS Microbiol. Lett.**, 220, 235-240, 2003.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanase and their mode of action. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 8, 353-368, 1992.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 56, 326–338, 2001.

BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresour. Technol.**, 128, 751–759, 2013.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, 2, 65, 2012.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8, 93-99, 1987.

BRASSEUR, C.; BAUWENS, J.; TARAYRE, C.; MATTÉOTTI, C.; THONART, P.; DESTAIN, J.; FRANCIS, F.; HAUBRUGE, E.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M.; FOCANT, J. F.; PAUW, E. MALDI-TOF MS analysis of cellodextrins and xylo-oligosaccharides produced by hindgut homogenates of *Reticulitermes santonensis*. **Molecules**, 19, 4578-4594, 2014.

BROWN, R. J.; MILLER, G. C.; GRIFFON, N.; LONG, C. J.; RADER, D. J. Glycosylation of endothelial lipase at asparagine-116 reduces activity and hydrolysis of native lipoproteins in vitro and in vivo. **J. Lipid. Res.**, 48, 1132–1139, 2007.

BORNSCHEUER, U.; BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Enzymatic degradation of (ligno)celulose. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 53, 10876 – 10893, 2014.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresour. Technol.**, 187, 173–181, 2015.

CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI E. B.; COELHO, G. D.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process. Biochem.**, 40, 359-364, 2005.

CHANG, K. L.; ARAI, T.; IBRAHIM, D.; PRAWITWONG, P.; LAN, D.; MURATA, Y.; MORI, Y.; KOSUGI, A. Purification and characterization of a xylanase from the newly isolated *Penicillium rolfsii* c3-2(1) IBRL. **BioResources.**, 10, 1627-1643, 2015.

CHAPLA, D.; DHOLAKIYA, S.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Characterization of purified fungal endoxylanase and its application for production of value added food ingredient from agroresidues. **Food Bioprod. Process.**, 91, 682–692, 2013.

CHAUHAN, B. S.; SINGH, R. K.; CHO, H. M.; LIM, H. C. Practice of diesel fuel blends using alternative fuels: A review. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 59, 1358–1368, 2016.

CHEN, L. L.; ZHANG, M.; ZHANG. D. H.; CHEN, X. L.; SUN, C. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Purification and enzymatic characterization of two β-endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresour. Technol.**, 100, 5230–5236, 2009.

CHEN, M. H.; RAJAN, K.; CARRIER, D. J.; SINGH, V. Separation of xylose oligomers from autohydrolyzed *Miscanthus giganteus* using centrifugal partition chromatography. **Food Bioprod. Process.**, 95, 125–132, 2015.

CHENG, Y. S.; ZHENG, Y.; YU, C. W.; DOOLEY, T. M.; JENKINS, B. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. **Appl. Biochem, Biotechnol.**, 162, 1768 – 1784, 2010.

CHOVAU, S.; DEGRAUWE, D.; VAN DER BRUGGEN, B. Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. **Renew Sust. Energ. Rev.**, 26, 307–321, 2013.

CHUTANI, P. E.; SHARMA, K. K. Biochemical evaluation of xylanases from various filamentous fungi and their application for the deinking of ozone treated newspaper pulp. **Carbohydr. Polym.**, 127, 54–63, 2015.

COLABARDINI, A. C.; RIES, L. N. A.; BROWN, N. A.; REIS, T. F.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; MENINO, J. F.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnol. Biofuels**, 7, 46, 2014.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, 29, 3-23, 2005.

CORAL, G.; ARIKAN, B.; ÜNALDI3, M. N.; GÜVENMEZ, H. K. Some properties of thermostable xylanase from an *Aspergillus niger* strain. **Ann. Microbiol.**, 52, 299-306, 2002.

CORRAL, O. L.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F. Xylanases. In: Advances in Agricultural and Food Biotechnology, **Research Signpost**. India, 305-322, 2006.

DAMM, T.; COMMANDEUR, U.; FISCHER, R.; USADEL, B.; KLOSEA, H. Improving the utilization of lignocellulosic biomass by polysaccharide modification. **Process Biochem.**, 51, 288–296, 2016.

DEBEIRE, P.; DELALANDE, F.; HABRYLO, O.; JELTSCH, J. M.; DORSSELAER, A. V.; PHALIP, V. Enzymatic cocktails produced by *Fusarium graminearum* under submerged fermentation using different lignocellulosic biomasses. **FEMS Microbiol. Lett.**, 355, 116–123, 2014.

de MARÍA, P. D. On the use of seawater as reaction media for large-scale applications in biorefineries. **Chem. Cat. Chem.**, 00, 1–7, 2013.

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

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. **Biotechnol. Adv.**, 30, 1627-1640, 2012.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 97, 8455–8465, 2013.

DO, T. T.; QUYEN, D. T.; DAM, T. H. Purification and characterization of an acid-stable and organic solvent-tolerant xylanase from *Aspergillus awamori* VTCC-F312. **ScienceAsia**, 38, 157–165, 2012.

DOBREV, G.; ZHEKOVA, B.; DELCHEVA, G.; KOLEVA, L.; TZIPORKOV, N.; PISHTIYSKI, I. Purification and characterization of endoxylanase Xln-1 from *Aspergillus niger* B03. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 25, 2095–2102, 2009.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, 1, 2–17, 2010.

DONG, X.; MEINHARDT, S. W.; SCHWARZ, P. B. Isolation and characterization of two endoxylanases from *Fusarium graminearum*. **J. Agric. Food Chem.**, 60, 2538−2545, 2012.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent tolerant enzymes. **Biochem. Eng. J.**, 48, 270–282, 2010.

DRISS, D.; BHIRI, F.; SIELA, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Purification and properties of a thermostable xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 168, 851-863, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28, 350–6, 1956.

DUTTA, T.; SENGUPTA, R.; SAHOO, R.; SINHA RAY, S.; BHATTACHARJEE, A.; GOSH, S. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. **Lett. Appl. Microbiol.**, 44, 206-211, 2007.

EICHLER, J. Biotechnological uses of archael extremoenzymes. **Biotecnol. Adv.**, 19, 261-278, 2001.

ELCOCK, A. H.; MCCAMMON, J. A. Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. **J. Mol. Biol.**, 280, 731-748, 1998.

ERGÜN, B. G.; ÇALIK, P. Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: current status and future prospects. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, 39, 1–36, 2016.

FANG, C.; THOMSEN, M. H.; BRUDECKI, G. P.; CYBULSKA, I.; FRANKAR, C. G.; BASTIDAS-OYANEDEL, J. R.; SCHMIDT, J. E. Seawater as alternative to freshwater in pretreatment of date palm residues for bioethanol production in coastal and/or arid areas. **Chem. Sus. Chem.**, 8, 3823 – 3831, 2015.

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

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; ZÚÑIGA, U. F. R.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. **Boletim Pesquisa Desenvolvimento/Embrapa**, 22, 1-16, 2008.

FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresour. Technol.**, 99, 5938–5941, 2008.

FERNANDEZ-SANDOVAL, M. T.; HUERTA-BERISTAIN, G.; TRUJILLO-MARTINEZ, B.; BUSTOS, P.; GONZALEZ, V.; BOLIVAR, F.; GOSSET, G.; MARTINEZ, A. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 96, 1291–1300, 2012.

FIALHO, M. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*. **Folia Microbiol.**, 49, 13–18, 2004.

FILHO, E. X. F. Xilanases. In: SAID, S., PIETRO, R. Enzimas como Agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: **Legis Summa Ltda**, 1, 137-148, 2004.

FONSECA-MALDONADO, R.; VIEIRA, D. S.; ALPONTI, J. S.; BONNEIL, E.; THIBAULT, P.; WARD, R. J. Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase. **J. Biol. Chem.**, 288, 25522-25534, 2013.

FONTANA, J. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JOHNSON, K. G. α-4-O-methyl-Dglucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymol.**, 160, 560-571, 1988.

GAN, P.; IKEDA, K.; IRIEDA, H.; NARUSAKA, M.; O'CONNELL, R. J.; NARUSAKA, Y.; TAKANO, Y.; KUBO, Y.; SHIRASU, K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Phytol.**, 197, 1236–1249, 2012.

GAO, D.; UPPUGUNDLA, N.; CHUNDAWAT, S.P.; YU, X.; HERMANSON, S.; GOWDA, K.; BRUMM, P.; MEAD, D.; BALAN, V.; DALE, B.E. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnol. Biofuels.**, 4, 1–11, 2011.

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

GAUR, R.; TIWARI, S.; RAI, P.; SRIVASTAVA, V. Isolation, production, and characterization of thermotolerant xylanase from solvent tolerant *Bacillus vallismortis* RSPP-15. **Int. J. Polym. Sci.**, 2015.

GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **J. R. Soc. Interface**, 9, 2749–2766, 2012.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energ Policy**, 36, 2086-2097, 2008.

GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; ADDEPALLY, U.; SHETTY, P. R. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC1467): Purification and kinetic characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, 82, 823–829, 2016.

GORSHKOVA, T. A.; KOZLOVA, L. V.; MIKSHINA, P. V. Spatial structure of plant cell wall polysaccharides and its functional significance. **Biochem.-Moscow***,* 78, 836-853, 2013.

GUERFALI, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. *Talaromyces thermophiles* β-D-xylosidase: purification, characterization and xylobiose synthesis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 150, 267–279, 2008.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 41, 550 – 567, 2015.

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

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour. Technol.**, 89, 17–34, 2003.

HE, H.; QIN, Y.; LI, N.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and characterization of a thermostable hypothetical xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 175, 3148–3161, 2015.

HEBERT, P. D.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biol.**, 2, e312, 2004.

HESPELL, R. B.; COTTA, M. A. Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylans with different chemical and physical properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61, 3042–3050, 1995.

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

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J.N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect? **Biotechnol. Biofuels.**, 4, 2–13, 2011.

HUANG, G.; CHEN, F.; KUANG, Y.; HE, H.; QIN, A. Current techniques of growing algae using flue gas from exhaust gas industry: a review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 178, 1220–1238, 2016.

HUANG, X.; LIN, J.; YE, X.; WANG, G. molecular characterization of a thermophilic and salt- and alkaline-tolerant xylanase from *Planococcus* sp. SL4, a strain isolated from the sediment of a soda lake. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 25, 662–671, 2015.

IQBAL, H. M.N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. **Bioresources**, 8, 3157-3176, 2013.

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

JOMMUENGBOUT, P.; PINITGLANG, S.; KYU, K. L.; RATANAKHANOKCHAI, K. Substrate-binding site of family 11 xylanase from *Bacillus firmus* K-1 by molecular docking. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 73, 833-839, 2009.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour. Technol.**, 199, 103 – 112, 2016.

JONSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnol. Biofuels**, 6, 16, 2013.

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

JØRGENSEN, H.; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme Microb. Technol.**, 32, 851–861, 2003.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial Exo-xylanases: A Mini Review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 174, 81–92, 2014.

JUTURU, V.; WU, J. C. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 88, 353-363, 2013.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnol. Adv.**, 30, 1219-27, 2012.

KARAN, R.; CAPES, M. D.; DASSARMA, S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. **Aquat. Biosyst.**, 8, 2012.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. **Bioresour. Technol.**, 203, 348 – 356, 2016.

KENNES, D.; ABUBACKAR, H. N.; DIAZ, M.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 91, 304–317, 2016.

KHANDEPARKER, R.; VERMA, P.; DEOBAGKAR, D. A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. **N. Biotechnol.**, 28, 2011.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, 199, 42 – 48, 2016.

KIM, S. D.; KIM, H. J.; KIM, C. J. Enhancement of the enzymatic digestibility of waste newspaper using tween. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 129–132, 486–495, 2006.

KIMURA, T.; ITO, J.; KAWANO, A.; MAKINA, T.; KONDO, H.; KARITA, S.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Purification, characterization and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp.40. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 64, 1230-1237, 2000.

KING, B. C. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnol. Biofuels.**, 4, 4, 2011.

KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **Biomed. Res. Int.**, 2013, 1-8, 2013.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 162, 429-443, 2010.

KONDO, T.; NOJIRI, M. Application of region selective substituted methylcelluloses to characterize the reaction mechanism of cellulose. **Macromolecules**, 29: 239-2395, 1996.

KUHAD, R. C.; MEHTA, G.; GUPTA, R.; SHARMA, K. K. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulosics improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass Bioenerg.**, 34, 1189-1194, 2010.

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. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, 74, 170–177, 2012.

KUMAR, R.; TABATABAEI, M.; KARIMI, K.; HORVÁTH, I. S. Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol - A review. **Biofuels Res. J.**, 9, 347-356, 2016.

KUMAR, V.; MARÍN-NAVARRO, J.; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 32, 34, 2016.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Production of thermo-alkali-stable xylanase by a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1 in cane molasses medium and its applicability in making whole wheat bread. **Bioprocess Biosyst Eng.**, 37, 1043–1053, 2014.

KUMAR, V.; VERMA, D.; ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Thermostable bacterial xylanases. In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y (eds) Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology, **Springer.** New York, 813–857, 2013a.

KUMAR, V.; SYAL, P.; SATYANARAYANA, T. Highly thermo–halo–alkali-stable b-1,4-endoxylanase from a novel polyextremophilic strain of *Bacillus halodurans*. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, 36, 555–565, 2013b.

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

LAGAERT, S.; POLLET, A.; COURTIN, C. M.; VOLCKAERT, G. β-Xylosidases and α-L-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnol. Adv.**, 32, 316–332, 2014.

LEE, J. M.; KIM, Y. R.; KIM, J. K.; JEONG, G. T.; HA, J. C.; KONG, I. S. Characterization of salt-tolerant b-glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from *Bacillus* sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, 38, 1335–1346, 2015.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P. M.; BORIN, I. A. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, 33, 399-403, 2005.

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON KARL-ERIK, L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme Microb. Technol.**, 27, 89–94, 2000.

LIGUORI, R.; VENTORINO, V.; PEPE, O.; FARACO, V. Bioreactors for lignocellulose conversion into fermentable sugars for production of high added value products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 100, 597–611, 2016.

LIGUORI, R.; AMORE, A.; FARACO, V. Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 97, 6129-6147, 2013.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Prog. Energy Combust. Sci.**, 38, 449-467, 2012.

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

LIU, L.; SUN, J.; CAI, C.; WANG, S.; PEI, H.; ZHANG, J. Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicellulose and cellulose degradation. **Bioresour. Technol.**, 100, 5865–5871, 2009.

LOMBARD, V.; RAMULU, G. H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy). **Nucleic Acids Res.**, 42, D490-D495, 2014.

LUDWIG, N.; LÖHRER, M.; HEMPEL, M.; MATHEA, S.; SCHLIEBNER, I.; MENZEL, M.; KIESOW, A.; SCHAFFRATH, U.; DEISING, H. B.; HORBACH, R. Melanin is not required for turgor generation but enhances cell-wall rigidity in appressoria of the corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 27, 315–327, 2014.

MACHADO, C. B.; CITADINI, A. P.; GOLDBECK, R.; LIMA, E. A.; FIGUEIREDO, F. L.; SILVA, T. M.; HOFFMAM, Z. B.; SOUSA, A. S.; SQUINA, F. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; RULLER, R.; WARD, R. J. Increased biomass saccharification by supplementation of a commercial enzyme cocktail with endo-arabinanase from *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol. Lett.**, 37, 1455–1462, 2015.

MARTINEZ, A.; RODRÍGUEZ, M. E.; WELLS, M. L.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnol. Prog.**, 17, 287–293, 2001.

MCGREGOR, J. L.; CLEMETSON, K. J.; JAMES, E.; LUSCHER, E. F.; DECHAVANNE, M. Characterization of human blood platelet membrane proteins and glycoproteins by their isoelectric point (pI) and apparent molecular weight using two-dimensional electrophoresis and surface-labelling techniques. **BBA Biomemb.**, 599, 473 - 483, 1980.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biol. Chem.**, 49, 183-186, 1921.

MCPHILLIPS, K.; WATERS, D. M.; PARLET, C.; WALSH, D. J.; ARENDT, E. K.; MURRAY, P. G. Purification and characterisation of a β-1,4-xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and its application in bread making. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 172, 1747–1762, 2014.

MELEIRO, L. P.; ZIMBARDI, A. L. R. L.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, D. C.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. A novel β-glucosidase from *Humicola insolens* with high potential for untreated waste paper conversion to sugars. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 173, 391–408, 2014.

MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 27, 150–158, 2014.

MICHELIN, M.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical properties of multiple xylanases from *Aspergillus ochraceus* tolerant to Hg^{2+} ion and a wide range of pH. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 174, 206–220, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, 31, 426-428, 1959.

MILLS, T. Y.; SANDOVAL, N. R.; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Biofuels**, 2, 26–35, 2009.

MOHANRAM, S.; AMAT, D.; CHOUDHARY, J.; ARORA, A.; NAIN, L. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustain. Chem. Process.**, 1, 2013.

MORAÏS, S.; BARAKA, Y.; HADAR, Y.; WILSON, D. B.; SHOHAM, Y.; LAMED, R.; BAYER, E. A. Assembly of xylanases into designer cellulosomes promotes efficient hydrolysis of the xylan component of a natural recalcitrant cellulosic substrate. **Mbio.** 2, 2011.

MORAÏS S.; BARAKA, Y.; CASPI, J.; HADAR, Y.; LAMED, R.; SHOHAM, Y.; WILSON, D. B.; BAYER, E. A. Contribution of a xylan-binding module to the degradation of a complex cellulosic substrate by designer cellulosomes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 76, 3787–3796, 2010.

MORALES, M.; QUINTERO, J.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 42, 1349–1361, 2015.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 100, 5205–5214, 2016.

MOREIRA, L. R. S.; CAMPOS, M. C.; SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FILHO, E. X. F. Two b-xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genet. Biol.**, 60, 46-52, 2013.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: Classification, characterization and applications. In: Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, **InTech**. 251-275, 2013.

NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 149, 229–243, 2008.

NIELSEN, J.; LARSSON, C.; VAN MARIS, A.; PRONK, J. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 24, 398–404, 2013.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; DAMM, U.; BUIATE, E. A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N.; ALTMÜLLER, J.; ALVARADO-BALDERRAMA, L.; BAUSER, C. A.; BECKER, C.; BIRREN, B. W.; CHEN, Z.; CHOI, J.; CROUCH, A. A.; DUVICK, J. P.; FARMAN, M. A.; GAN, P.; HEIMAN, HENRISSAT, B.; HOWARD, R.; KABBAGE, M.; KOCH, C.; KRACHER, B.; KUBO, Y.; D LAW, A.; LEBRUN, M.; LEE, Y.; MIYARA, I.; MOORE, N.; NEUMANN, U.; NORDSTRÖM, K.; PANACCIONE, D.; RALPH, P.; PLACE, M.; PROCTOR, R. H.; PRUSKY, D.; RECH, G.; REINHARDT, R.; ROLLINS, J. A.; ROUNSLEY, S.; SCHARDL, C. L.; SCHWARTZ, D. C.; SHENOY, N.; SHIRASU, K.; SIKHAKOLLI, U. R.; STÜBER, K.; SUKNO, S. A.; SWEIGARD, J. A.; TAKANO, Y.; TAKAHARA, H.; TRAIL, F.; DOES, H.; M, L. VOLL, WILL, I.; YOUNG, S.; ZENG, Q.;

ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B.; SCHULZE-LEFERT, P.; THEMAAT, E. V. L.; MA, L.; YOUNG, L. J. V. S.; ZENG, Q.; JINGZE ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B; LEFERT, P. S.; THEMAAT, E. V. L. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genet.**, 44, 1060-1067, 2012.

O'FARRELL, P. Z.; GOODMAN, H. M.; O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, 12, 1133-1142, 1977.

OHTA, K.; MORIYAMA, S.; TANAKA, H.; SHIGE, T.; AKIMOTO, H. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, 92, 262-270, 2001.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process. Biochem.**, 46, 879–887, 2011.

PAULY, M.; GILLE, S.; LIU, L.; MANSOORI, N.; SOUZA, A.; SCHULTINK, A.; XIONG, G. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, 238, 627–642, 2013.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of stylosanthes a Æerst report. **Mycologia**, 85, 362-364, 1993.

PIPPO, W. A.; LUENGO, C. A.; ALBERTERIS, L. A. M.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. **Waste Biomass Valor.**, 2, 1–16, 2011.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.***,* 67, 577-591, 2005.

PORTILLO, M. C., SAADEDDIN, A. Recent trends in ionic liquid (IL) tolerant enzymes and microorganisms for biomass conversion. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 35, 294–301, 2015.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; PRAKASH, B.; RUBUL, M.; SREERAMULU, K. Production of alkaliphilic, halotolerent, thermostable cellulose free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 28, 183–192, 2012.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C.E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresour. Technol.**, 101, 9624–9630, 2010.

QIU, Z., AITA, G. M., WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresour. Technol.**, 117, 251–256, 2012.

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

RAHMAN, A. K. M. S.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase, α-L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. **Can. J. Microbiol.**, 49, 58-64, 2003.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different protein of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Anal. Biochem.**, 116, 53-64, 1981.

REIS, A.; PINTO, P.; EVTUGUIN, D. V.; NETO, C. P.; DOMINGUES, P.; FERRER-CORREIA, A. J.; DOMINGUES, M. R. M. Electrospray tandem mass spectrometry of underivatised acetylated xylo-oligosaccharides. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 19, 3589–3599, 2005.

REISFELD, R. A.; LEWIS, U. J.; WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**. 195, 281-3, 1962.

RICO, A.; RENCORET, J.; DEL RÍO, J. C.; MARTÍNEZ, A. T.; GUTIÉRREZ, A. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. **Biotechnol. Biofuels**, 7, 6, 2014.

ROLLIN, J. A.; ZHU, Z.; SATHITSUKSANOH, N.; ZHANG, Y. H. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnol. Bioeng.**, 108, 22-30, 2011.

ROMANOWSKA, I.; POLAK, J.; BIELECKI, S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 69, 665–671, 2006.

RYAN, S. E.; NOLAN, K.; THOMPSON, R.; GUBITZ, G. M.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme Microb. Technol.**, 33, 775-785, 2003.

RYVARDEN, L. Genera of Polypores: Nomenclature and Taxonomy. **Synopsis Fungorum.** Fungi Flora A/S, Oslo, Norway. 5, 1-363, 1991.

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

SAHA, B. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochem.**, 37, 1279–1284, 2002.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, 35, 1004-1010, 2012.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: an overview. **Br. Biotechnol. J.**, 3, 1-28, 2013.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electron. J. Biotechnol.**, 18, 307–313, 2015.

SILVA, J. C. R.; GUIMARÃES, L. H. S.; SALGADO, J. C. S.; FURRIEL, R. P. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; ROSA, C. R.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of glucose–cellobiose-tolerant cellulases from *Scytalidium thermophilum*. **Folia Microbiol.**, 58, 561-568, 2013.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Biores. Technol.**, 127, 500–507, 2013.

SINGHVI, M. S.; CHAUDHARI, S.; GOKHALE, D. V. Lignocellulose processing: a current challenge. **RSC Adv.**, 4, 8271–8277, 2014.

SKROPETA, D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. **Bioorg. Med. Chem.**, 17, 2645–2653, 2009.

SØRENSEN, I.; DOMOZYCH, D.; WILLATS, W. G. T. How have plant cell walls evolved? **Plant Physiol.**, 154, 366-372, 2010.

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

SOUZA, F. H. M.; NASCIMENTO, C. V.; ROSA, J. C.; MASUI, D. C.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated b-glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochem.**, 45, 272–278, 2010.

SOUZA, R. F.; GOMES, R. C.; COELHO, R. R. R.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. A. Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 222, 45-50, 2003.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresour. Technol.**, 199, 49–58, 2016.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 17, 39-67, 1997.

TANAKA, H.; MUGURUMA, M.; OHTA, K. Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 70, 202–211, 2006.

TANAKA, H.; NAKAMURA, T.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and properties of an extracellular endo-1,4-β-xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, 100, 623–630, 2005.

TANG, W.; COUGHLAN, S.; CRANE, E.; BEATTY, M.; DUVICK, J. The application of laser microdissection to in planta gene expression profiling of the maize anthracnose stalk rot fungus *Colletotrichum graminicola*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 19, 1240–1250, 2006.

TEIXEIRA, A. R. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. **Manual n° 6**. São Paulo, Instituto de Botânica, 1995.

TEIXEIRA, R. S. S.; SIQUEIRA, F. G.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X. F.; BOM, E. P. S. Purification and characterization studies of a thermostable β-xylanase from *Aspergillus awamori*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 37, 1041–1051, 2010.

THIAGARAJAN, S.; JEYA, M.; GUNASEKARAN, P. Purification and characterization of an endoxylanase from solid-state culture of alkalitolerant *Aspergillus fumigatus* MKU1. **Indian J. Biotechnol.**, 5, 351-35, 2006.

TURKIEWICZ, M.; KALINOWSKA, H.; SKA, M. Z.; BIELECKI, S. Purification and characterization of two endo-1,4-b-xylanases from Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, 127, 325–335, 2000.

UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **Int. J. Biol. Macromol.**, 82, 1041–1054, 2016.

ÚNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. http://www.unica.com.br. Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

VELEA, S.; DRAGOS, N.; SERBAN, S.; ILIE, L.; STALPEANU, D.; NICOARA, A.; STEPAN, E. Biological sequestration of carbon dioxide fromthermal power plant emissions, by absorbtion in microalgal culture media. **Rom. Biotech. Lett.**, 14, 4485–4500, 2009.

VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHMAANPERA, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, 108, 121–145, 2007.

WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. An extracellular endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, 109, 227–229, 2010.

WAKIYAMA, M.; TANAKA, H.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and properties of family-10 endo-1,4-β-xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, 105, 367–374, 2008.

WANG, C. Y.; CHAN, H;. LIN, H. T.; SHYU, Y. T. Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from *Bacillus* sp. NTU-06. **Ann. Appl. Biol.**, 187–197, 2010.

WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Appl. Energy.**, 99, 23–31, 2012.

WANG, M.; LIU, K.; DAI, L.; ZHANGA, J.; FANGA, X. The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 88, 491–500, 2013.

XU, B.; DAI, L.; LI, J.; DENG, M.; MIAO, H.; ZHOU, J.; MU, Y.; WU, Q.; TANG, X.; YANG, Y.; DING, J.; HAN, N.; HUANG, Z. Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from *Massilia* sp. RBM26 isolated from the feces of *Rhinopithecus bieti*. J. Microbiol. Biotechnol., 26, 9–19, 2016.

YAN, Q. J.; WANG, L.; JIANG, Z. Q.; YANG, S. Q.; ZHU, H. F.; LI, L. T. A xylose-tolerant β-xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: Characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresour. Technol.**, 99, 5402–5410, 2008.

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

YU, Q.; ZHUANG, X.; YUAN, Z.; QI, W.; WANG, Q.; TAN, W. The effect of metal salts on the decomposition of sweet sorghum bagasse in flow-through liquid hot water. **Bioresour. Technol.**, 102, 3445–3450, 2011.

YUAN, L.; SCANLON, M. G.; ESKIN, N. A. M.; THIYAM-HOLLANDER, U.; AACHARY, A. A. Effect of pretreatments and endo-1,4-β-xylanase hydrolysis of canola meal and mustard bran for production of oligosaccharides. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 175, 194–208, 2015.

ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant beta-D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 4, 170-176, 2004.

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; PURANEN, T.; TANG, M.; TENKANEN, M.; VIIKARI, L. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnol. Biofuels.**, 4, 12, 2011.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. **Bioresour. Technol.**, 199, 21 – 33, 2016.

ZHANG, L.; WANG, L.; KAO, Y. T.; QIU, W.; YANG, Y.; OKOBIAH, O.; ZHONG, D. Mapping hydration dynamics around a protein surface. **PNAS**, 104, 18461–18466, 2007.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels Bioprod. Bioref.**, 6, 465–482, 2012.

ZHAO, X., CHENG, K., LIU, D., Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 82, 815–827, 2009.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **J. Mol. Catal. B**, 37, 16–25, 2005.

ZHOU, J.; WU, Q.; ZHANG, R.; MO, M.; TANG, X.; LI, J.; XU, B.; DING, J.; LU, Q.; HUANG, Z. A thermo-halo-tolerant and proteinase-resistant endoxylanase from *Bacillus* sp. HJ14. **Folia Microbiol.**, 59, 423–431, 2014.

ZHOU, P.; ZHU, H.; YAN, Q.; KATROLIA, P.; JIANG, Z. Purification and properties of a psychrotrophic *Trichoderma* sp. xylanase and its gene sequence. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 164, 944–956, 2011.

ZHOU, Q.; PARK, S. H.; BOUCHER, S.; HIGGINS, E.; LEE, K.; EDMUNDS, T. N-linked oligosaccharide analysis of glycoprotein bands from isoelectric focusing gels. **Anal. Biochem.**, 335, 10–16, 2004.

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