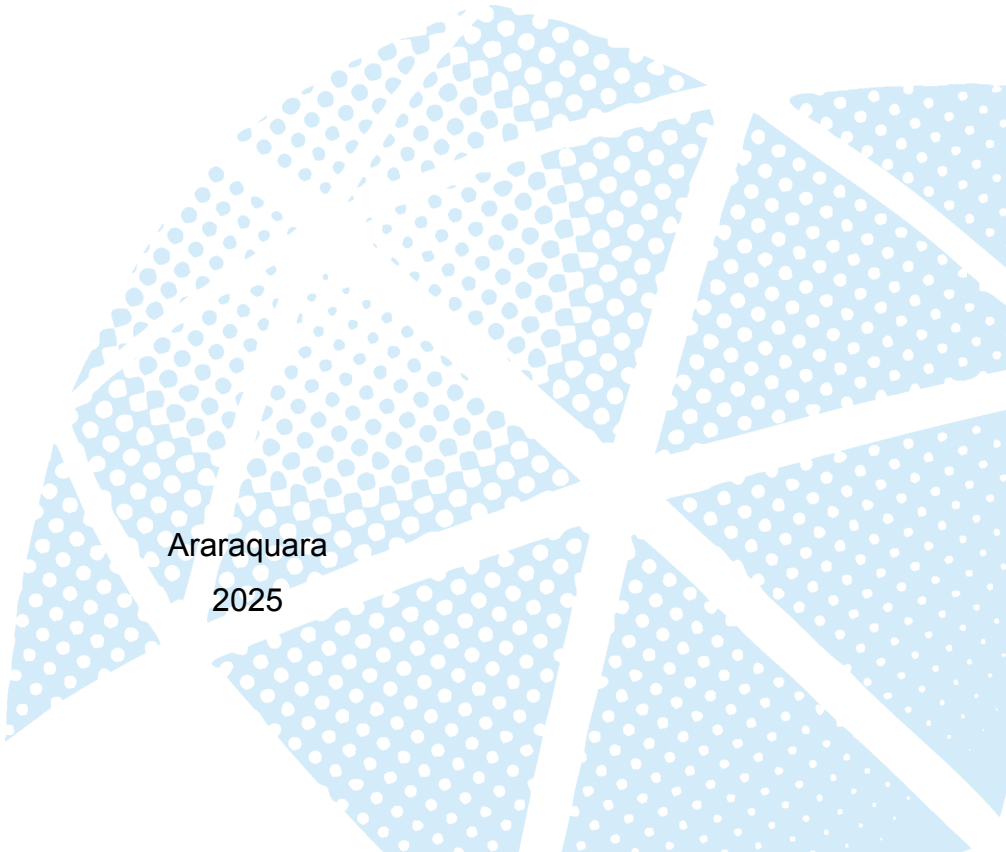


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Campus de Araraquara

MARIA CLAUDIA CORREIA FUZARO

Avaliação teórica da separação de xilanase produzida por *Escherichia coli* a partir dos processos de filtração e centrifugação com uso de flocculante

Araraquara
2025



MARIA CLAUDIA CORREIA FUZARO

Avaliação teórica da separação de xilanase produzida por Escherichia coli a partir dos processos de filtração e centrifugação com uso de floculante

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção da graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto

Araraquara

2025

F996a

Fuzaro, Maria Claudia Correia.

Avaliação teórica da separação de xilanase produzida por Escherichia coli a partir dos processos de filtração e centrifugação com uso de flocculante / Maria Claudia Correia Fuzaro. – Araraquara, 2025.
55 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Álvaro de Baptista Neto.

1. Xylanases. 2. Escherichia coli. 3. Centrifugação. 4. Ultrafiltração. 5. Flocculação. I. Baptista Neto, Álvaro de, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara
Vilma Bruna Mastelari Costa - CRB 8/10938

Esta ficha não pode ser modificada

MARIA CLAUDIA CORREIA FUZARO

Avaliação teórica da separação de xilanase produzida por Escherichia coli a partir dos processos de filtração e centrifugação com uso de flocculante

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção da graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Data da defesa: 27 /05 / 2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Me. Mateus Scontri
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Me. João Francisco Cabral do Nascimento
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos, que com risadas e companheirismo tornaram a jornada da graduação mais leve e inesquecível, meu sincero obrigado. À minha família, que me ofereceu apoio incondicional mesmo nos momentos mais desafiadores, minha eterna gratidão. E a Deus, por me guiar e fortalecer em cada passo desta caminhada, minha profunda reverência.

RESUMO

Este trabalho avalia teoricamente os processos de clarificação e separação na produção de xilanase por *Escherichia coli*, com foco nas técnicas de filtração e centrifugação, utilizando o flocculante quitosana. A xilanase, uma enzima que degrada xilana, é amplamente aplicada em indústrias como biocombustíveis, papel e celulose, alimentícia e de rações. A produção recombinante em *Escherichia coli* oferece vantagens como crescimento rápido e manipulação genética, mas enfrenta desafios na purificação devido a contaminantes celulares. Foram propostos testes de centrifugação (500, 1.000 e 10.000 G) e filtração (microfiltração de 0,45 µm e ultrafiltração de 30 kDa) com flocculante para otimizar a clarificação do caldo fermentativo.

Palavras-chave: xilanase; *Escherichia coli*; centrifugação; filtração; flocculantes.

ABSTRACT

This study theoretically evaluates the clarification and separation processes in the production of xylanase by *Escherichia coli*, focusing on filtration and centrifugation techniques, using different dosages of the flocculant chitosan. Xylanase, an enzyme that degrades xylan, is widely applied in industries such as biofuels, paper and pulp, food, and animal feed. Recombinant production in *Escherichia coli* offers advantages like rapid growth and genetic manipulation but faces challenges in purification due to cellular contaminants. Centrifugation tests (500, 1,000, and 10,000 G) and filtration (microfiltration at 0.45 μm and ultrafiltration at 30 kDa) with flocculant were proposed to optimize the clarification of the fermentation broth.

Keywords: xylanase; *Escherichia coli*; centrifugation; filtration; flocculants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cadeia principal de xilana e seus grupos substituintes.	17
Figura 2 – Interação da enzima com o substrato.	20
Figura 3 – Etapas de um processo genérico de purificação de biomoléculas.	29

SUMÁRIO

1 Introdução.....	15
2 Objetivos.....	16
3 Revisão bibliográfica.....	17
3.1 Xilana.....	17
3.2 Xilanase.....	19
3.1.1 Uso da xilanase na indústria de biocombustíveis.....	22
3.1.2 Uso da Xilanase na indústria de papel e celulose.....	23
3.1.3 Uso da xilanase indústria alimentícia.....	23
3.1.4 Uso da xilanase indústria de rações.....	24
3.2 Produção de xilanase por Escherichia coli: vantagens e desafios.....	25
3.3 Processos de clarificação.....	27
3.3.1 Sedimentação.....	29
3.3.2. Clarificação química.....	30
3.4 Separação por filtração e centrifugação.....	30
3.4.1 Filtração.....	31
3.4.2 Centrifugação.....	33
3.5 Floculantes.....	36
3.5.1 Floculantes orgânicos.....	36
3.5.2 Floculantes inorgânicos.....	37
3.5.3 Floculantes de origem microbiana.....	37
3.5.4 Mecanismos de ação.....	37
3.5.4.1 Neutralização de carga.....	38
3.5.4.2 Formação de pontes.....	38
3.5.5 Impacto na separação.....	38
3.5.6 Impacto na pureza e atividade enzimática.....	39
4 Metodologia proposta.....	41
4.1 Produção de caldo de cultivo com células e enzimas.....	41
4.2 Determinação da atividade enzimática.....	42
4.3 Determinação do crescimento celular por densidade óptica.....	42
4.4 Testes de centrifugação.....	42
4.5 Testes de filtração.....	42
4.6 Uso de floculantes.....	43
5 Resultados e discussão.....	44
5.1 Produção de caldo de cultivo com células e enzimas.....	44
5.2 Determinação da atividade enzimática.....	44
5.3 Determinação do crescimento celular por densidade óptica.....	45
5.4 Testes de centrifugação.....	45
5.5 Testes de filtração.....	46
5.6 Uso de floculantes.....	48

6 Conclusão..... 49
REFERÊNCIAS..... 50

1 Introdução

A xilanase, uma enzima hidrolítica capaz de degradar as ligações β -1,4-glicosídicas da xilana, desempenha um papel crucial em diversos setores industriais, como a produção de biocombustíveis, o branqueamento de polpa celulósica, a melhoria de rações animais e a clarificação de sucos na indústria alimentícia. Sua produção recombinante por *Escherichia coli* destaca-se devido ao rápido crescimento do microrganismo, à facilidade de manipulação genética e à possibilidade de otimização da expressão enzimática. Contudo, a eficiência do processo de purificação, conhecido como downstream, representa um desafio significativo, especialmente na remoção de debris celulares, proteínas hospedeiras e outros resíduos liberados. Técnicas de clarificação e separação, como centrifugação e filtração, são amplamente empregadas para superar esses obstáculos, e o uso de flocculantes tem se mostrado uma estratégia promissora para aumentar a eficiência dessas etapas, ao promover a agregação de partículas e facilitar sua remoção.

2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre a xilana, um polissacarídeo presente na hemicelulose vegetal, e a xilanase, enzima responsável por sua degradação, destacando sua relevância e impactos positivos em diversos setores industriais. A revisão também aborda a importância de desenvolver métodos de cultivo escaláveis, como a produção de xilanase por *Escherichia coli* geneticamente modificada, visando viabilizar sua aplicação industrial. Além disso, foi analisada a relevância dos processos iniciais de clarificação no downstream, como centrifugação e filtração, enfatizando o impacto positivo do uso de flocculantes na melhoria da eficiência desses processos. Por fim, foi proposta uma metodologia para avaliar o potencial da *Escherichia coli* geneticamente modificada na produção de xilanase, bem como a eficácia de técnicas de centrifugação e filtração combinadas ao uso do flocculante quitosana como estratégia de clarificação inicial, e apresentado de maneira geral os resultados esperados com a aplicação dessa metodologia.

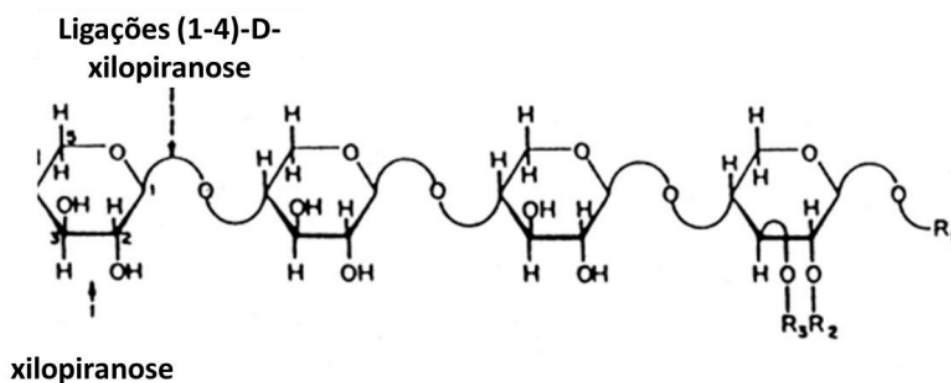
3 Revisão bibliográfica

3.1 Xilana

A matriz lignocelulósica da madeira é composta por celulose, lignina e hemicelulose, que conferem rigidez e resistência mecânica ao vegetal. A hemicelulose representa cerca de 15-30 % da biomassa e está localizada na parede celular e no meio da lamela média da célula vegetal. Os tipos de hemicelulose são designados de acordo com a presença na cadeia principal de xilana, manana, galactana e arabinana, sendo as mais comuns a base de xilana (Beg, 2001). A xilana é um polímero heterogêneo, altamente ramificado, atua como uma interface entre a celulose e a lignina, formando ligações cruzadas que estabilizam a estrutura, (Uffen, 1997). É considerado o segundo polissacarídeo mais abundante quando considerado o reino vegetal, após a celulose (Walia et al., 2017).

Estruturalmente, consiste em uma cadeia principal de resíduos de β -D-xilopiranoose ligados por ligações β -1,4-glicosídicas, frequentemente ramificada com grupos substituintes como acetila, arabinose, glucuronila e 4-O-metilglucuronila, conforme figura 1 abaixo, dependendo da fonte vegetal (Polizeli et al., 2005). Essa heterogeneidade confere à xilana propriedades específicas, como solubilidade parcial e capacidade de formar geis viscosos, que impactam sua degradabilidade e aplicações industriais.

Figura 1: Cadeia principal de xilana e seus grupos substituintes.



Fonte: Atkins, 1992.

R1:

p-ácido cumárico

α -D-ácido glucurônico

α -D- arabinofuranose

R2:

Grupo acetil

α -D- glucuronopirranose (C α lignina)

4-O-metil- α -D- glucuronopirranose (C α lignina)

α -L- arabinofuranose (C α e C α lignina)

ácido ferúlico, grupo acetil, ácido p-cumárico

R3:

α -L- arabinofuranose (C α e C α lignina, ácido ferúlico, grupo acetil, ácido p-cumárico)

β -D-galactopiranosil (1-5) α -L-arabinofuranose

β -D-xilopiranosil (1-2) α -L-arabinofuranose

α -L-arabinofuranosil (1-2, 1-3, 1-2 arabinofuranose)_n

β -D-galactopiranosil (1-4) D-xilopiranosil (-2)- α -L-arabinofuranose

As xilanas são classificadas em categorias com base em suas cadeias laterais e fontes vegetais, influenciando sua hidrólise por xilanases e os processos de purificação. As arabinoxilanas, predominantes em gramíneas, possuem cadeias de β -1,4-xilopirranose com unidades terminais de α -L-arabinofuranosil, representando 20-30% da biomassa, e são hidrolisadas por xilanases GH10 e GH11 (Burlacu et al, 2016). As glucuronoxilanas, comuns em folhosas, contêm ácido α -D-glucurônico e seu derivado 4-O-metil, constituindo 15-25% da madeira, e requerem α -glucuronidases acessórias. As glucuronoarabinoxilanas, típicas de coníferas, combinam resíduos de α -L-arabinose e ácido glucurônico, sendo mais recalcitrantes devido à sua complexidade (5-15% da biomassa). As galactoglucuronoarabinoxilanas, com resíduos terminais de β -D-galactopiranosil em cadeias laterais complexas, são menos comuns, enquanto as homoxilanas, formadas apenas por xilosil e isoladas de fontes raras, apresentam estrutura linear e

alta solubilidade (Burlacu et al, 2016). A complexidade das xilanas aumenta com cadeias laterais, afetando sua solubilidade, conformação física e interação com xilanases, o que gera fragmentos heterogêneos no sobrenadante durante ensaios de atividade, exigindo técnicas robustas de filtração e floculação na purificação de xilanases.

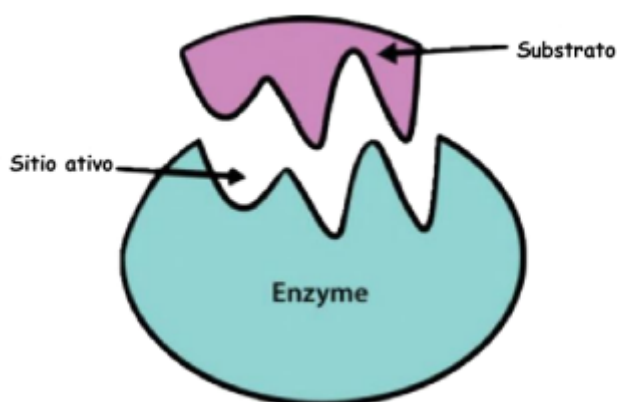
A composição da xilana em diferentes materiais afeta diretamente a eficiência das xilanases. Por exemplo, xilanas altamente ramificadas (como em folhosas) requerem xilanases com atividades acessórias, enquanto xilanas menos substituídas são mais facilmente degradadas por endo-xilanases das famílias GH10 e GH11 (Nordberg Karlsson et al., 2018). A heterogeneidade da xilana, caracterizada por variações em suas ramificações e grau de polimerização, gera fragmentos de xilooligossacarídeos (XOS) e xilose durante ensaios de atividade da xilanase, especialmente quando xilana é usada como substrato para avaliar a eficiência enzimática. Esses fragmentos, presentes no sobrenadante após o cultivo em *Escherichia coli* recombinante, aumentam a viscosidade e a complexidade do meio, dificultando a purificação da enzima (Mendonça et al., 2020).

Compreender a composição da xilana em madeira e resíduos agrícolas é fundamental para otimizar bioprocessos industriais. A variabilidade química e estrutural desses materiais determina as condições de pré-tratamento, a escolha da xilanase e as estratégias de downstream, impactando o rendimento e a viabilidade econômica da produção enzimática.

3.2 Xilanase

Enzimas proteicas são proteínas especializadas que atuam como biocatalisadores, acelerando reações químicas em sistemas biológicos sem serem consumidas no processo. Sua estrutura tridimensional permite a interação específica com substratos, reduzindo a energia de ativação e aumentando a eficiência de processos metabólicos e industriais. Um dos modelos que melhor descreve a funcionalidade é o modelo de chave e fechadura, como ilustrado na figura 2, em que a enzima possui uma estrutura complexa que permite a interação específica com o substrato (Robinson, 2015).

Figura 2: Interação da enzima com o substrato.



Fonte: Robinson, 2015.

Entre essas enzimas, as xilanases destacam-se por sua capacidade de degradar a xilana, formada por uma cadeia principal de D-xilose com ramificações como L-arabinose, ácido glucurônico, galactose e grupos acetila, conferindo alta heterogeneidade à sua composição (Kumar et al., 2018). Ao hidrolisar as ligações β -1,4-glicosídicas do xilano, as xilanases geram xilooligossacarídeos (XOS) e xiloses, importantes para a reciclagem de carbono em ecossistemas naturais (Juturu; Wu, 2018).

As xilanases pertencem a famílias de glicosídeo hidrolases (GH), que quebram ligações entre açúcares, sendo as famílias GH10 e GH11 as mais estudadas devido à sua eficiência (Nordberg Karlsson et al., 2018). Outras famílias, como GH5, GH8, GH30 e GH43, também exibem atividade xilanolítica, embora sejam menos exploradas comercialmente (Motta et al., 2013). Essas enzimas operam por dois mecanismos catalíticos: retenção, predominante em GH10 e GH11, que utiliza resíduos de ácido glutâmico para formar um intermediário temporário, ou inversão, que altera a configuração do açúcar (Nordberg Karlsson et al., 2018).

Essas enzimas são produzidas por diversos organismos, incluindo bactérias como *Bacillus*, fungos como *Aspergillus* e *Trichoderma*, leveduras, algas marinhas, protozoários, insetos e até ruminantes, que dependem de microbiota simbiótica. Para a indústria, microrganismos recombinantes, como *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, são frequentemente usados para otimizar o rendimento (Rosano et al., 2019). A diversidade de xilanases reflete adaptações a ambientes variados,

desde solos tropicais até fontes termais, onde xilanases de *Thermotoga maritima* resistem a temperaturas acima de 80 °C, ou ecossistemas salinos, com enzimas halófilas (Kumar et al., 2018).

A função principal das xilanases é quebrar xilano em XOS e xilose, facilitando a decomposição de biomassas vegetais. As endoxilanases, o maior grupo, cortam a cadeia principal aleatoriamente, produzindo oligossacarídeos solúveis de diferentes tamanhos (LI et al., 2014). Elas atuam em sinergia com β -xilosidases, que convertem XOS em xilose, e com arabinofuranosidases e esterases, que removem ramificações, aumentando a eficiência da hidrólise. Essa ação conjunta pode ser essencial para aplicações industriais que dependem da quebra completa de biomassas lignocelulósicas. (Motta et al., 2013).

A eficiência das xilanases é modulada por diversos fatores ambientais e químicos. O pH ótimo para sua atividade varia geralmente entre 4,0 e 7,0, mas enzimas alcalófilas podem atuar em pH de até 9,0. A temperatura ideal também varia, sendo de 20 a 50 °C para xilanases mesófilas e acima de 70 °C para termófilas, o que as torna adequadas para processos industriais extremos (Kumar et al., 2018). Além disso, íons metálicos, como cálcio e magnésio, frequentemente estabilizam a estrutura enzimática, enquanto outros íons podem inibir sua atividade. Esses fatores são cruciais para otimizar o desempenho das xilanases em diferentes aplicações biotecnológicas (Kumar et al., 2018).

A produção de xilanases é frequentemente induzida por compostos como xilano, xilose, xilobiose ou derivados β -D-xilopiranosil, presentes em resíduos agrícolas, que ativam genes específicos (Beg et al., 2001; Kulkarnil et al., 1999; Polizeli et al., 2005; Kumar et al., 2009). Alguns microrganismos, no entanto, produzem xilanase de forma constitutiva, sem necessidade de indutores. A repressão catabólica, em que a glicose inibe a síntese da enzima, é um desafio comum, já que microrganismos priorizam fontes de carbono mais simples, mas estudos mostram que essa repressão pode ser contornada por manipulação genética (Kulkarni et al., 1999).

A eficiência das xilanases pode ser avaliada por técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria, que medem açúcares liberados, e ensaios de viscosidade, que verificam a redução da viscosidade de soluções de xilano, um fator crucial em rações, pois melhora a digestibilidade e a eficiência alimentar.

Em suma, as xilanases têm amplas aplicações industriais, como na produção de bioetanol, ao hidrolisar biomassas, na fabricação de XOS prebióticos para alimentos, no branqueamento de polpa de papel e na melhoria da digestibilidade de rações (; Wu, 2018). A bioprospecção de xilanases extremófilas e o uso de sistemas recombinantes continuam a expandir seu potencial, especialmente em condições industriais desafiadoras (Kumar et al., 2018). Na seção seguinte, serão exploradas em maior detalhe algumas aplicações industriais das xilanases, destacando seu impacto em setores como energia, alimentação e branqueamento de papel.

3.1.1 Uso da xilanase na indústria de biocombustíveis

A produção de bioetanol a partir de resíduos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo é extremamente importante pois é capaz de gerar uma fonte de energia limpa e sustentável. Um dos problemas é a dificuldade da fermentação do resíduo devido a estrutura recalcitrante dos compostos lignocelulósicos, exigindo que seja feito um pré tratamento químico que acaba gerando resíduos poluentes altamente prejudiciais ao meio ambiente. O uso de enzimas como a xilanase é capaz de reduzir o uso dessas substâncias e tornar o processo mais sustentável. Essas enzimas quebram a xilana em açúcares simples, como xilose, que são fermentados por leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, para produzir etanol, contribuindo de maneira significativa na produção do bioetanol de segunda geração (Rajabi, 2022).

A combinação de xilanases com celulasas aumenta a eficiência da hidrólise, liberando mais açúcares a partir de biomassas lignocelulósicas, facilitando assim a fermentação e aumentando a produtividade. Por exemplo, em bagaço de cana pré-tratado com álcalis, a adição de xilanases e de celulasas resultou em até 48,5% de conversão de açúcares, reduzindo a necessidade de pré-tratamentos químicos intensos (LI et al., 2014). Em farelo de trigo, uma xilanase extremófila do rúmen de camelo, usada com *Bacillus subtilis*, hidrolisou 100% do substrato farelo de trigo, melhorando o rendimento de etanol em processos de fermentação simultânea (Rajabi, 2022).

A eficiência das xilanases depende de sua estabilidade e produção econômica, frequentemente em sistemas recombinantes como *Bacillus subtilis*.

Processos de *downstream*, como filtração e cromatografia, são cruciais para purificar essas enzimas, garantindo maior viabilidade industrial (Rajabi, 2022; LI et al., 2014). Esses avanços destacam o potencial das xilanases para tornar a produção de bioetanol mais sustentável, especialmente em países como o Brasil, onde resíduos como bagaço de cana são abundantes.

3.1.2 Uso da Xilanase na indústria de papel e celulose

As xilanases são amplamente utilizadas no branqueamento de polpa kraft, removendo lignina residual para aumentar a alvura e melhorar as propriedades mecânicas do papel (Sharma et al., 2014). Diferentemente dos métodos tradicionais com compostos clorados (ex.: dióxido de cloro), que geram subprodutos organoclorados tóxicos (AOX), as xilanases hidrolisam xilanas residuais na superfície da polpa, expondo a lignina e reduzindo o uso de químicos. Sharma et al. (2014) relataram que xilanases de *Bacillus pumilus* elevaram consideravelmente a alvura da polpa, com 30% menos cloro, minimizando AOX em efluentes.

A eficiência das xilanases depende de sua estabilidade em pH alcalino (8-10) e temperaturas elevadas (60-80°C). Xilanases alkalotolerantes de *Staphylococcus sp.*, com 85% de atividade a pH 9, melhoraram a alvura, reduzindo o cloro em 20% (Gupta et al., 2000). Em polpa de palha de trigo, xilanases de *Streptomyces thermoviolaceus* elevaram a alvura, com 30% menos cloro (Zhao et al., 2006).

3.1.3 Uso da xilanase indústria alimentícia

As xilanases desempenham um importante papel também na indústria alimentícia. Na panificação, melhoram a qualidade e a textura dos produtos, essas enzimas hidrolisam arabinoxilanos presentes na farinha, reduzindo a viscosidade da massa e promovendo maior elasticidade da rede de glúten, o que resulta em pães com maior volume e melhor estrutura de miolo. Um estudo demonstrou que xilanases aumentam a retenção de gás na massa, prolongando a vida de prateleira e aprimorando a textura de pães brancos e integrais (Butt et al., 2008). Além disso, a suplementação com xilanase recombinante, produzida em *Pichia pastoris*, melhorou a porosidade e a umidade do pão, destacando o potencial de enzimas

geneticamente modificadas para processos industriais de panificação (Cunha et al., 2018).

Na clarificação de sucos, as xilanases são amplamente utilizadas para reduzir a turbidez e aumentar o rendimento, degradando polissacarídeos coloidais que afetam a viscosidade. Um experimento com xilanase de *Bacillus stearothermophilus* otimizada por metodologia de superfície de resposta mostrou que uma dose de 12,5 U/g foi eficaz na clarificação de suco de cítricos, melhorando a filtrabilidade e a claridade (Dhiman et al., 2011). Da mesma forma, a xilanase purificada de *Bacillus pumilus* VLK-1, imobilizada para reutilização, reduziu significativamente a turbidez em sucos de laranja e uva, aumentando o rendimento e tornando o processo mais econômico (Kumar et al., 2014).

Essas aplicações demonstram a versatilidade das xilanases na indústria alimentícia, com benefícios que vão além da funcionalidade, incluindo sustentabilidade e eficiência. A combinação de xilanases com outras enzimas, como amilases na panificação, ou a otimização de sua produção e purificação, reforça seu potencial para atender às demandas de processos industriais modernos (Butt et al., 2008; Kumar et al., 2014). No contexto brasileiro, onde a produção de sucos cítricos é significativa, o uso de xilanases pode agregar valor aos produtos, enquanto a panificação se beneficia de enzimas recombinantes para pães de alta qualidade (Cunha et al., 2018; Dhiman et al., 2011).

3.1.4 Uso da xilanase indústria de rações

Além da aplicação na indústria de alimentação humana, as xilanases também são amplamente utilizadas na produção de rações animais para melhorar a digestibilidade de dietas ricas em polissacarídeos não amiláceos, como os arabinoxilanos, presentes em grãos como milho e trigo. Essas enzimas degradam compostos não amiláceos, reduzindo a viscosidade intestinal e liberando nutrientes encapsulados, o que aumenta a eficiência alimentar. Em galinhas poedeiras, a suplementação com xilanase termoestável em rações à base de trigo e milho elevou a digestibilidade de proteína bruta em 3,2% e acelerou a taxa de passagem de digestão, melhorando a eficiência alimentar (Van Hoeck et al., 2021). Em frangos de corte, xilanases aumentaram o ganho de peso em 4-6% e a produção de ácidos

graxos de cadeia curta, promovendo saúde intestinal por meio de efeitos prebióticos (Singh et al., 2021).

Além dos benefícios nutricionais, as xilanases contribuem para a sustentabilidade na produção de rações ao permitir o uso de coprodutos, como grãos secos por destilação, e reduzir custos de formulação. Em suínos, a suplementação com xilanase em dietas à base de milho e esse tipo de resíduo melhorou o ganho diário médio em 7% e a eficiência alimentar em 5%, com aumento de xilo-oligossacarídeos que estimulam a microbiota benéfica, como *Bifidobacterium* (Petry; Patience, 2020). No contexto brasileiro, onde milho e trigo são amplamente utilizados na avicultura e suinocultura, as xilanases agregam valor às rações, otimizando a digestibilidade e reduzindo impactos ambientais (Singh et al., 2021).

3.2 Produção de xilanase por *Escherichia coli*: vantagens e desafios

Dada a relevância da xilanase em diversas indústrias, a produção eficiente dessa enzima é crucial para atender às demandas do mercado e reduzir custos. Nesse contexto, a biotecnologia oferece soluções inovadoras, como a utilização de *Escherichia coli* geneticamente modificada para expressar xilanases com alta eficiência

Escherichia coli é um dos microrganismos mais utilizados em biotecnologia para a produção de proteínas recombinantes, devido à sua versatilidade e ao vasto conhecimento acumulado sobre sua biologia molecular. Desde a introdução dos primeiros sistemas de expressão recombinante na década de, *Escherichia coli* tornou-se um hospedeiro padrão para a síntese de proteínas heterólogas, especialmente em contextos industriais e de pesquisa (Rosano et al., 2014). A produção de xilanase por *Escherichia coli* oferece vantagens significativas, como crescimento rápido e facilidade de manipulação genética, mas também enfrenta desafios relacionados à contaminação celular e à purificação da enzima, que impactam diretamente a eficiência do processo e a qualidade do produto final.

Uma das principais vantagens da *Escherichia coli* como hospedeiro é sua taxa de crescimento excepcionalmente rápida. Em condições ótimas (37°C, pH 7,0, meio rico como LB), *Escherichia coli* pode dobrar sua população em aproximadamente 20-30 minutos, permitindo a produção de biomassas significativas em poucas horas (Sezonov et al., 2007; Rosano et al., 2014). Essa característica é

particularmente vantajosa na produção de xilanase, pois reduz o tempo de produção e os custos operacionais em comparação com microrganismos mais lentos, como fungos filamentosos (*Trichoderma spp.*), que podem levar dias para atingir densidades celulares semelhantes. Além disso, o crescimento rápido facilita a escalabilidade, tornando *Escherichia coli* ideal para processos industriais de grande volume (Sezonov et al., 2007).

A facilidade de manipulação genética de *Escherichia coli* é outro fator determinante para sua escolha como hospedeiro. O genoma de *Escherichia coli* é bem caracterizado, e ferramentas moleculares como plasmídeos de expressão (ex.: pET, pBAD), sistemas de promotores induzíveis (ex.: T7, arabinose) e técnicas de edição genômica (ex.: CRISPR-Cas9) permitem a introdução e regulação precisa de genes heterólogos, como os que codificam xilanases (Rosano et al., 2019). A manipulação genética também possibilita a otimização de propriedades da xilanase, como estabilidade térmica ou especificidade ao substrato, por meio de mutagênese dirigida ou fusão com tags de afinidade (ex.: His-tag) para facilitar a purificação (Rusly, 2009).

Um dos principais desafios na produção de xilanase por *Escherichia coli* é a contaminação celular decorrente da liberação de proteínas hospedeiras e outros componentes intracelulares durante a lise celular. Como *Escherichia coli* é um hospedeiro bacteriano Gram-negativo, sua parede celular contém lipopolissacarídeos (LPS), e endotoxinas, que são liberados no sobrenadante após a ruptura celular, especialmente em processos de expressão intracelular (Rosano et al., 2019; Rusly, 2009). Essas endotoxinas podem comprometer a pureza da xilanase, sendo particularmente problemáticas em aplicações alimentícias ou farmacêuticas, onde níveis de LPS superiores a 0,1 EU/mL (unidades de endotoxina por mililitro) são inaceitáveis. Além disso, a superprodução de xilanase frequentemente leva à formação de corpos de inclusão – agregados insolúveis de proteínas mal enoveladas – que requerem etapas adicionais de solubilização e renaturação, reduzindo o rendimento de enzima ativa. Chen et al. (2020) relataram que até 60% da xilanase recombinante expressa em *Escherichia coli* pode estar em corpos de inclusão sob condições de alta indução, exigindo otimização do processo para minimizar esse efeito (Jhamb., 2012).

A produção de xilanase recombinante em *Escherichia coli* enfrenta desafios relacionados à contaminação celular, especialmente pela ação de

proteases endógenas que podem ser produzidas durante o cultivo, como Lon e ClpP, que podem degradar até 20-30% da proteína expressa em cepas selvagens, reduzindo sua atividade (Gopal & Kumar, 2013). Esse problema é parcialmente mitigado em cepas deficientes em proteases, como *Escherichia coli* BL21 e Rosetta, que apresentam menor atividade proteolítica, melhorando a estabilidade da xilanase.

A purificação da xilanase produzida por *Escherichia coli* representa outro desafio significativo, devido à necessidade de separar a enzima-alvo de uma mistura complexa de proteínas hospedeiras, metabólitos e debris celulares. Em sistemas de expressão intracelular, a lise celular libera uma alta carga de contaminantes, exigindo técnicas robustas como centrifugação e filtração para clarificar o extrato inicial (Elgharbi, 2023). A centrifugação, embora eficaz na sedimentação de partículas maiores, pode ser insuficiente para remover proteínas solúveis indesejadas, enquanto a filtração por membranas enfrenta problemas de entupimento (fouling) e perda de enzima por adsorção. Um ponto de atenção é que grande parte da molécula de interesse pode ser perdida durante a filtração inicial devido à interação com membranas de polietersulfona, um material comum em processos industriais (Simantujak, 2022).

3.3 Processos de clarificação

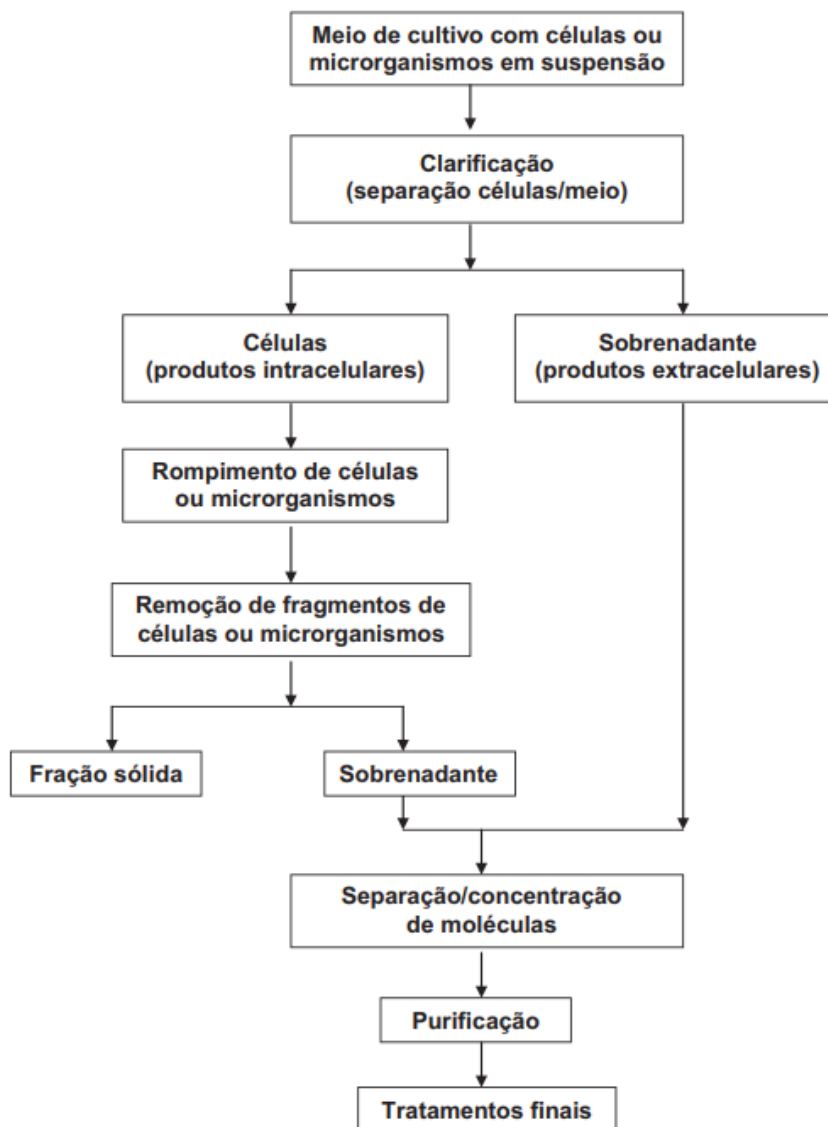
Os processos de clarificação referem-se às etapas iniciais do downstream em bioprocessos, destinadas à remoção de sólidos em suspensão, debris celulares, partículas coloidais e outras impurezas de uma suspensão biológica após a fermentação ou lise celular. O objetivo principal é obter um sobrenadante límpido, rico na biomolécula de interesse, neste caso, a xilanase produzida por *Escherichia coli*, para facilitar as etapas subsequentes de purificação. A clarificação é considerada uma operação unitária crítica em biotecnologia, pois atua como o primeiro filtro contra contaminantes que podem comprometer a eficiência de técnicas sequentes como a cromatografia (Simanjuntak, 2022).

Na produção de enzimas recombinantes, como a xilanase, a clarificação trata uma mistura complexa composta por células intactas, fragmentos celulares, proteínas hospedeiras, lipídios, ácidos nucleicos e metabólitos secundários, que são liberados. A eficiência desse processo é avaliada por parâmetros como turbidez, teor

de sólidos totais e recuperação da enzima-alvo, sendo essencial para minimizar perdas e garantir a viabilidade econômica do bioprocesso (Schmidell et al., 2001).

Estima-se que uma clarificação mal otimizada pode aumentar os custos de purificação em até 40%, devido à necessidade de etapas adicionais para remover contaminantes residuais. Na figura 3 está ilustrado as etapas de um processo genérico de purificação de biomoléculas, que antecede as etapas finais de obtenção da molécula alvo. No caso de *Escherichia coli*, as endotoxinas são uma preocupação particular, exigindo uma clarificação inicial robusta para atender a padrões de qualidade, especialmente em aplicações alimentícias ou biomédicas (Rosano et al., 2019).

Figura 3: Etapas de um processo genérico de purificação de biomoléculas.



Fonte: Pessoa Jr., 2020.

3.3.1 Sedimentação

A sedimentação é um método físico baseado na separação de partículas sólidas por ação da gravidade ou força centrífuga, sendo uma técnica de baixo custo e alta escalabilidade. Em sua forma mais simples, a sedimentação gravitacional permite que partículas mais densas se depositem no fundo de um recipiente ao longo do tempo, enquanto o sobrenadante clarificado é coletado. No entanto, em

bioprocessos industriais, a sedimentação é frequentemente acelerada por centrifugação, que aplica forças de até 10.000 G para separar sólidos em minutos, em vez de horas (Pessoa Jr.,2020).

3.3.2. Clarificação química

A clarificação química envolve o uso de agentes químicos, como floculantes e coagulantes, para promover a agregação de partículas em suspensão, facilitando sua remoção por sedimentação ou filtração. Floculantes, como sais inorgânicos (ex.: cloreto de polialumínio – PAC, sulfato de alumínio) ou polímeros orgânicos (ex.: quitosana, poliacrilamida), induzem a formação de flocos maiores ao neutralizar cargas superficiais ou criar pontes entre partículas, enquanto coagulantes desestabilizam colóides por compressão da dupla camada elétrica (Pessoa Jr.,2020).

Na produção de xilanase, a clarificação química pode ser particularmente útil para tratar extratos celulares complexos de *Escherichia coli*, onde debris finos e proteínas hospedeiras dificultam a separação física pura. A adição de quitosana ao caldo fermentativo de *Escherichia coli* pode aumentar a claridade do sobrenadante, melhorando a recuperação da atividade de xilanase em comparação com a sedimentação simples. Outro exemplo é o uso de polieletrólitos catiônicos, como o cloreto de polialumínio (PAC), que, em baixas concentrações, reduz significativamente a turbidez de extratos bacterianos em curto tempo, embora dosagens excessivas possam precipitar a enzima. A clarificação química pode ser combinada com centrifugação ou filtração para maior eficácia, mas requer otimização para evitar a introdução de contaminantes químicos ou a desnaturação da xilanase (Pessoa Jr.,2020).

Outras técnicas químicas incluem ajuste de pH ou adição de sais (ex.: sulfato de amônio) para precipitação seletiva de impurezas, embora sejam menos comuns na clarificação inicial devido ao custo e à complexidade adicional. A escolha do agente químico depende do pH ótimo da enzima, da carga superficial das partículas e da compatibilidade com etapas posteriores de purificação (Pessoa Jr.,2020).

3.4 Separação por filtração e centrifugação

A separação por filtração e centrifugação constituem etapas fundamentais no downstream de bioprocessos. Essas técnicas são amplamente empregadas após a clarificação inicial para isolar a biomolécula de interesse do sobrenadante, removendo partículas residuais, proteínas hospedeiras e outros contaminantes (Sharma et al., 2021). A filtração baseia-se na passagem seletiva de fluidos através de membranas porosas, enquanto a centrifugação utiliza força centrífuga para acelerar a sedimentação de partículas. Ambas as abordagens são complementares, e sua eficiência depende de princípios físicos, equipamentos específicos e variáveis operacionais como velocidade, tamanho do poro e uso de flocculantes (Sharma et al., 2021).

3.4.1 Filtração

A filtração separa componentes sólidos de um fluido por meio de um meio filtrante poroso, como membranas ou tecidos, utilizando diferença de pressão para impulsionar o fluxo. É amplamente aplicada na biotecnologia devido às baixas temperaturas, baixo consumo energético e ausência de agentes químicos, evitando a desnaturação de bioprodutos (Charcosset, 2006). Na produção de xilanase, a filtração remove debris celulares e proteínas hospedeiras de extratos de *Escherichia coli*, clarificando o caldo fermentativo e garantindo a pureza da enzima.

A filtração pode ser classificada em dois modelos principais: convencional e tangencial (fluxo cruzado). A filtração convencional é usada para clarificação, retendo partículas de 1 mm a 1 µm a pressões inferiores a 0,5 atm, formando uma torta porosa que reduz o fluxo à medida que se acumula (Ghosh, 2006; Doran, 2013). A filtração tangencial, com fluxo paralelo à membrana, minimiza a formação de torta, sendo ideal para microfiltração e ultrafiltração, com pressões de 0,5 a 10 atm e retenção de partículas de 10 µm a 0,001 µm (Doran, 2013). A microfiltração remove bactérias e proteínas, enquanto a ultrafiltração concentra macromoléculas, como enzimas, e é usada em indústrias farmacêuticas, alimentícias e de tratamento de água (Anis et al., 2019; Al Aani et al., 2020).

As membranas, feitas de materiais como polissulfona, cerâmica ou acetato de celulose, devem ser resistentes a variações de pH, temperatura e

pressão, além de garantirem alta vazão e seletividade (Doran, 2013). Elas podem ser simétricas (poros uniformes), assimétricas (poros crescentes) ou compostas. Membranas assimétricas, com uma camada ultrafina (0,1 a 1 μm), oferecem maior permeabilidade e facilitam a limpeza, enquanto membranas simétricas tendem a entupir mais facilmente (Doran, 2013).

A cinética da filtração é descrita pela Lei de Darcy, que modela o fluxo do permeado, conforme equação abaixo:

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p}{R\mu_0} \quad (1)$$

$$J = \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} \quad (2)$$

Onde J é o fluxo do permeado (m/s), A é a área da membrana (m²), V é o volume filtrado (m³), t é o tempo (s), ΔP é a diferença de pressão (Pa), μ_0 é a viscosidade do fluido (kg/m³·s), e R é a resistência total (m⁻²), composta pela resistência da torta (R₁) e do meio filtrante (R₂) demonstrados conforme equação a seguir (Harrison et al., 2015):

$$R = R_1 + R_2 \quad (3)$$

$$R_1 = \frac{\mu \alpha C_s V}{A^2} \quad (4)$$

$$R_2 = \frac{\mu R_M}{A} \quad (5)$$

Aqui, α é a resistência específica da torta (m/kg), C_s é a concentração de sólidos (kg/m³), e R_m é a resistência específica da membrana (m⁻¹).

Rearranjando as variáveis a equação geral da velocidade de filtração se torna:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta\rho}{\frac{\mu\alpha C_s v}{A^2} + \frac{\mu R_M}{A}} \quad (6)$$

Para o cálculo da resistência específica da torta e da resistência meio filtrante, é possível obter as duas variáveis através de uma análise linear entre o tempo total da filtração sob o volume. Permitindo uma análise completa de todo o perfil de filtração (Harrisson et al 2015).

$$\frac{t}{V} = \frac{K_P V}{2} + B \quad (7)$$

$$\frac{K_P}{2} = \frac{1 \mu \alpha c_s}{2A^2(-\Delta\rho)} \quad (8)$$

$$B = \frac{\mu R_M}{A(-\Delta\rho)} \quad (9)$$

O principal desafio da filtração é o fouling (entupimento), causado pela formação de torta, que reduz a permeabilidade e a vida útil da membrana (Anis et al., 2019; Al Aani et al., 2020). Estratégias para minimizar o fouling incluem a adição de floculantes, como sais metálicos ou polímeros, que promovem a formação de conglomerados maiores, facilitando a filtração (Wang et al., 2016). A limpeza química das membranas e o uso de filtração tangencial também ajudam a manter a eficiência. Na produção de xilanase, a otimização da pressão e do tamanho dos poros é crucial para maximizar a recuperação da enzima sem comprometer sua atividade.

3.4.2 Centrifugação

A centrifugação é um método de separação baseado na diferença de densidade entre partículas e o fluido em que estão suspensas, acelerando a sedimentação por meio de uma força centrífuga gerada pela rotação de um equipamento (Stevens & Jaykus, 2004). Diferentemente da filtração, que se baseia no tamanho das partículas, a centrifugação explora a densidade para separar componentes, sendo ideal para clarificar suspensões microbianas, como na remoção de células de *Escherichia coli* em processos biotecnológicos (Datar & Rosén, 1987).

Na sedimentação natural, partículas com densidade maior que o fluido sedimentam sob a ação da gravidade devido a duas forças opostas: a força de flutuação, resultante da diferença de densidade entre a partícula e o fluido, e a força de atrito, causada pelo movimento da partícula no fluido (Datar & Rosén, 1987). Quando essas forças se equilibram, a partícula atinge uma velocidade constante, conhecida como velocidade de sedimentação (Datar & Rosén, 1987). Na centrifugação, a força gravitacional é substituída pela força centrífuga, que amplifica a sedimentação, reduzindo significativamente o tempo de separação (Pessoa Jr., 2005).

A cinética da sedimentação é descrita por equações que consideram partículas esféricas em um fluido com comportamento laminar ($Re < 1$). A velocidade de sedimentação sob gravidade (V_G) é dada por (Pessoa Jr. & Vaham, 2005):

$$V_G = \left(\frac{d^2}{18\mu}\right)(\rho_s - \rho)g \quad (10)$$

Onde:

V_G é a velocidade de sedimentação (m/s); d é o diâmetro da partícula (m); μ é a viscosidade do fluido (kg/m·s); ρ_s é a densidade da partícula (kg/m³); ρ é a densidade do fluido (kg/m³) e g é a aceleração da gravidade (9,8 m/s²).

Na centrifugação, a força gravitacional é substituída pela força centrífuga, e a velocidade de sedimentação centrífuga (V_c) é expressa por (Pessoa Jr, 2005):

$$V_c = \frac{d (\rho_s - \rho) W^2 r}{18\mu} \quad (11)$$

Onde:

W é a velocidade angular (rad/s) e r é a distância radial do centro da centrífuga à partícula (m).

Já a força centrífuga é quantificada pela razão entre a aceleração centrífuga e a gravidade (F_c) (Pessoa Jr. & Vaham, 2005):

$$F_c = \frac{W^2 r}{g} \quad (12)$$

Essa razão pode atingir valores de 5.000 a 17.000 vezes a gravidade, dependendo do equipamento, permitindo a separação eficiente de partículas pequenas, como células microbianas (Beveridge, 2000).

Na produção de xilanase, a centrifugação é usada para clarificar o meio de cultivo, separando células de *Escherichia coli* do meio líquido. A alta força centrífuga permite remover partículas finas que dificultariam a filtração, garantindo um sobrenadante claro para etapas subsequentes, como microfiltração ou ultrafiltração (Pessoa Jr., 2005). A escolha da centrífuga e das condições operacionais, como velocidade de rotação e vazão, é crítica para maximizar a eficiência sem comprometer a integridade das células ou do produto.

Os principais desafios da centrifugação incluem o custo energético, devido à alta rotação necessária, e a limitação de escala, especialmente em centrífugas de operação em batelada (Beveridge, 2000). Além disso, suspensões com alta concentração de sólidos (acima de 250 g/L) podem exigir centrífugas específicas ou pré-tratamentos, como floculação, para melhorar a sedimentação (Pessoa Jr. & Vaham, 2005). A otimização envolve ajustar a velocidade angular, o tempo de residência e a geometria da centrífuga para alcançar a vazão desejada,

minimizando a formação de sedimentos compactados que dificultem a recuperação do clarificado (Pessoa Jr., 2005).

De acordo com Purificação de Produtos Biotecnológicos (Pessoa Jr., 2005), a eficiência da centrifugação pode ser aprimorada pelo uso de agentes floculantes, que aumentam o tamanho efetivo das partículas, facilitando a sedimentação. Além disso, o controle da temperatura é essencial em processos biotecnológicos, pois a rotação pode gerar calor, potencialmente desnaturando enzimas como a xilanase. Centrífugas refrigeradas são recomendadas para manter a estabilidade do produto.

3.5 Floculantes

A floculação promove a agregação de partículas em suspensão por meio de agentes químicos chamados floculantes, aumentando o tamanho e a densidade dos agregados para facilitar sua remoção por sedimentação, centrifugação ou filtração. Na produção de xilanase, a floculação é crucial para clarificar caldos fermentativos de *Escherichia coli*, que contêm partículas finas e coloides que dificultam a separação (Harrison et al., 2015; Lee et al., 2014). Os floculantes agem reduzindo forças repulsivas eletrostáticas e promovendo interações atrativas, formando flocos maiores e mais densos (Roush & Lu, 2008).

Este processo é amplamente aplicado em bioprocessos e no tratamento de efluentes industriais, como os das indústrias têxtil, de papel e celulose, devido à sua eficiência, baixo custo e impacto ambiental reduzido. A escolha do floculante e a otimização de parâmetros como pH, força iônica, dose e agitação são fundamentais para maximizar a eficiência sem comprometer a estabilidade da xilanase.

Os floculantes são classificados em três categorias principais: inorgânicos, orgânicos e de origem microbiana, cada um com propriedades distintas que influenciam sua aplicação (Lee et al., 2014).

3.5.1 Floculantes orgânicos

Os floculantes orgânicos são polímeros naturais ou sintéticos que promovem agregação por pontes intermoleculares. Eles podem ser aniônicos, catiônicos (chamados polieletrólitos) ou não iônicos, dependendo da presença de

cargas (Lee et al., 2014). Exemplos incluem quitosana, um polissacarídeo catiônico derivado da quitina, e poliacrilamida (PAM), um polímero sintético versátil. A eficiência dos polieletrólitos depende da massa molar, densidade de carga, dose, concentração de biomassa, força iônica, pH e agitação. Polímeros de alto peso molecular são ideais para formar pontes entre partículas, enquanto alta densidade de carga favorece a neutralização de cargas celulares, aumentando a eficiência da floculação (Lee et al., 2014).

3.5.2 Floculantes inorgânicos

Os floculantes inorgânicos são sais metálicos que induzem coagulação por neutralização de cargas superficiais das partículas. Exemplos comuns incluem sais de alumínio (como sulfato de alumínio) e ferro (como cloreto férrico). Esses cátions metálicos neutralizam as cargas negativas na superfície das células, promovendo a formação de conglomerados (Lee et al., 2014). Os sais de alumínio são geralmente mais eficazes que os de ferro ou zinco devido ao menor raio iônico, que resulta em maior densidade de carga superficial. No entanto, é necessária uma alta concentração desses floculantes em soluções com alta força iônica para coagular as células presentes no meio (Lee et al., 2014).

3.5.3 Floculantes de origem microbiana

Floculantes microbianos, como biofloculantes produzidos por bactérias ou fungos, são alternativas sustentáveis com alta biocompatibilidade. Contudo, sua produção em larga escala é limitada por custos elevados, restringindo sua aplicação industrial (Lee et al., 2014).

3.5.4 Mecanismos de ação

Os floculantes operam por dois mecanismos principais: neutralização de carga (ou neutralização patch) e formação de pontes poliméricas, que dependem da natureza química do floculante e das propriedades das partículas no caldo fermentativo (Roush & Lu, 2008).

3.5.4.1 Neutralização de carga

Partículas em suspensão, como células de *Escherichia coli*, possuem cargas negativas devido a grupos químicos na superfície, gerando repulsão eletrostática que impede a agregação (Ng & Ting, 2017). Na neutralização patch, polímeros catiônicos adsorvem na superfície das partículas de forma plana, criando regiões de carga oposta. Essas regiões positivas atraem partículas com cargas negativas, promovendo a heterocoagulação e reduzindo a repulsão interpartículas (Roush & Lu, 2008). Este mecanismo é comum em floculantes inorgânicos e polieletrólitos catiônicos, como quitosana, especialmente eficazes para bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, que apresentam potencial zeta negativo em pH neutro (Ng & Ting, 2017; Halder et al., 2015).

3.5.4.2 Formação de pontes

Na formação de pontes, cadeias poliméricas adsorvem em mais de uma partícula, conectando-as. Grupos reativos do polímero se ligam à superfície de uma partícula, enquanto porções estendidas se conectam a outra, formando agregados partícula-polímero-partícula (Roush & Lu, 2008). Este mecanismo é predominante em polímeros orgânicos de alto peso molecular, como quitosana e PAM, que promovem flocos maiores e mais densos por interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals (Lee et al., 2014).

3.5.5 Impacto na separação

A floculação melhora a eficiência de processos de separação, como centrifugação e filtração, ao aumentar o tamanho e a densidade das partículas, reduzindo a turbidez do caldo fermentativo (Lee et al., 2014).

Na centrifugação, os floculantes aumentam o diâmetro (d) e a densidade (ρ) das partículas, acelerando a sedimentação conforme a equação da velocidade de sedimentação centrífuga (Harrison et al., 2015):

$$V_c = \frac{[d^2 (\rho_s - \rho) \omega^2 r]}{18\mu} \quad (17)$$

Flocos maiores sedimentam mais rapidamente, reduzindo o tempo de processamento e aumentando a vazão do clarificado. A floculação é particularmente útil em caldos de *Escherichia coli*, onde debris celulares e coloides finos dificultam a separação (Harrison et al., 2015).

Na filtração, partículas maiores reduzem o entupimento (fouling) das membranas, melhorando o fluxo de permeado. No entanto, flocos excessivamente grandes podem obstruir os poros, comprometendo a eficiência da microfiltração (Karim et al., 2008). Para *Escherichia coli*, floculantes catiônicos são ideais devido ao potencial zeta negativo da bactéria em pH neutro, promovendo aglomeração eficaz sem obstrução significativa (Ng & Ting, 2017; Halder et al., 2015).

A microfiltração depende do tamanho e da distribuição das partículas. Partículas maiores geralmente melhoram o desempenho, mas flocos muito grandes podem causar obstrução, reduzindo a eficiência (Karim et al., 2008). A escolha do floculante deve considerar o potencial zeta das partículas para otimizar a formação de flocos. Em *Escherichia coli*, polieletrólitos catiônicos neutralizam as cargas negativas da superfície, facilitando a filtração (Ng & Ting, 2017).

3.5.6 Impacto na pureza e atividade enzimática

Os floculantes podem afetar a pureza e a atividade de enzimas devido a interações com sua estrutura terciária, estabilizada por interações fracas, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (Harrison et al., 2015). Mudanças no pH, temperatura ou interações iônicas com polieletrólitos podem alterar a conformação da enzima, afetando sua interação com o substrato (Achazi et al., 2021). Polieletrólitos catiônicos ou aniônicos podem formar complexos com proteínas dispersas no meio, potencialmente causando desnaturação parcial ou redobramento. Ball et al. (2002) demonstraram a formação de complexos entre polieletrólitos lineares e albumina de soro bovino (BSA) por calorimetria de titulação isotérmica.

Na produção de xilanase, a escolha do flocculante deve minimizar impactos na atividade enzimática. Flocculantes orgânicos, como quitosana, são preferidos por sua biocompatibilidade, enquanto flocculantes inorgânicos podem introduzir íons metálicos que exigem purificação adicional, especialmente em aplicações que requerem baixa toxicidade (Lee et al., 2014).

4 Metodologia proposta

A metodologia descrita nesta seção foi elaborada com base nos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia (DEBB) da UNESP, que estabelecem diretrizes para cultivo, transformação e análise de microrganismos recombinantes como *Escherichia coli*. Esses procedimentos foram complementados com detalhes técnicos e condições experimentais extraídos de artigos científicos publicados, garantindo alinhamento com as práticas atuais de produção e purificação de xilanase. As subseções a seguir detalham o planejamento proposto para a produção do caldo de cultivo, determinação da atividade enzimática, monitoramento do crescimento celular e testes de clarificação e separação.

4.1 Produção de caldo de cultivo com células e enzimas

A produção de xilanase seria realizada utilizando *Escherichia coli* DH5 alfa, uma cepa amplamente empregada em sistemas recombinantes.

Células armazenadas a -80°C em ultrafreezer seriam descongeladas e tornadas quimiocompetentes. Alíquotas de 100 µL receberiam 1 µL de plasmídeo (ex.: pET-28a contendo o gene da xilanase), mantidas em banho de gelo por 20 minutos, seguidas por choque térmico a 42°C por 90 segundos e resfriamento em gelo por 2 minutos. Após adição de 800 µL de meio Luria-Bertani (LB: 10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl, pH 7,0), as células seriam incubadas a 37°C e 200 rpm por 1 hora em um shaker orbital. Para seleção, 100 µL da suspensão seriam plaqueados em LB sólido com ampicilina (100 µg/mL) e incubados por 16-18 horas a 37°C.

Um pré-inóculo seria preparado em um Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL), inoculado com 10 colônias isoladas e incubado a 37°C e 200 rpm até atingir OD₆₀₀ de 0,3. Três cultivos principais em Erlenmeyers de 250 mL, cada um com 100 mL de LB e ampicilina, seriam inoculados com 1 mL do pré-inóculo e mantidos a 37°C e 200 rpm por 72 horas, com reforço diário de ampicilina (100 µg/mL).

4.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade da xilanase seria quantificada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Amostras de 10 μ L do sobrenadante seriam misturadas a 90 μ L de xilana de bétula (1% p/v em tampão fosfato 50 mM, pH 5,0) em microtubos de 2 mL, incubadas a 55°C por 5 minutos em banho-maria e resfriadas em gelo por 5 minutos. Após adição de 100 μ L de DNS, os tubos seriam agitados em vórtex, aquecidos a 100°C por 5 minutos em banho seco e diluídos com 1 mL de água destilada. A absorbância seria medida a 540 nm em espectrofotômetro, com o branco contendo água destilada no lugar da amostra. A atividade seria expressa em unidades (U/mL), definidas como a liberação de 1 μ mol de açúcares redutores por minuto, usando uma curva padrão de xilose.

4.3 Determinação do crescimento celular por densidade óptica

O crescimento celular seria monitorado retirando alíquotas de 1.000 μ L a cada 12 horas durante o cultivo, diluídas em 900 μ L de LB estéril (diluição 1:10) e transferidas para cubetas. A absorbância seria medida a 600 nm em espectrofotômetro, com LB puro como branco, para avaliar a cinética de crescimento e sua correlação com a produção de xilanase.

4.4 Testes de centrifugação

O extrato bruto seria submetido a centrifugação em uma centrífuga refrigerada a 4°C, testando três velocidades: 500, 1000 e 10.000 G, por 1, 5 e 10 minutos cada. O sobrenadante seria coletado para análise da atividade enzimática (seção 3.2) e avaliação qualitativa da turbidez, enquanto o pellet seria descartado.

4.5 Testes de filtração

O sobrenadante clarificado seria processado por microfiltração (membranas de 0,45 μ m) para remover partículas maiores, seguido por ultrafiltração (membranas de 30 kDa) em sistema de fluxo tangencial para concentrar a xilanase. O fluxo de permeado e a atividade enzimática seriam analisados em cada etapa.

4.6 Uso de flocculantes

Floculante quitosana seriam adicionados ao extrato bruto antes da centrifugação ou filtração nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 0,5%. Após agitação suave por 10 minutos, as amostras seriam processadas conforme seções 3.4 e 3.5, avaliando a recuperação da xilanase e a redução da turbidez.

5 Resultados e discussão

5.1 Produção de caldo de cultivo com células e enzimas

A transformação de *Escherichia coli* DH5 α com o plasmídeo pET-28a deve resultar em colônias viáveis em ágar LB com ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), exibindo crescimento robusto após 16-18 h a 37°C. O pré-inóculo, cultivado em LB com ampicilina até OD600 de 0,3-0,8, fornecerá células competentes para os cultivos principais. Nos cultivos em frascos agitados (250 mL, 50 mL de meio LB, 200 rpm, 37°C), a indução com IPTG (0,5-1 mM) deve promover a expressão da xilanase após 18-72 h.

Com base em Mendonça et al. (2020), o meio LB deve produzir cerca de 21.000 U L $^{-1}$ de xilanase extracelular, com concentração de proteína recombinante de 0,5-1,0 g L $^{-1}$. A substituição parcial do LB por resíduos agroindustriais, como melaço de cana (10-15 g L $^{-1}$) ou melaço com levedura de cerveja, pode elevar a atividade para 92.000-195.000 U L $^{-1}$, devido à maior disponibilidade de carbono e nitrogênio orgânico. Farliahati et al. (2010) reportaram 2.649 U mL $^{-1}$ (2.649.000 U L $^{-1}$) em meio otimizado (15 g L $^{-1}$ glucose, 10 g L $^{-1}$ (NH $_4$) $_2$ HPO $_4$, 18 g L $^{-1}$ K $_2$ HPO $_4$), sugerindo que a otimização do meio LB com fontes de nitrogênio pode alcançar 1.500.000-2.000.000 U L $^{-1}$. Rusli et al. (2009) indicaram que a xilanase de *Bacillus subtilis* expressa em *Escherichia coli* DH5 α atingiu alta atividade em meio LB com xilana (1% p/v), sugerindo que a adição de xilana como indutor pode aumentar a produção em até 20-30% em relação ao LB padrão.

A pressão seletiva com ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) deve garantir a estabilidade do plasmídeo. A atividade enzimática no sobrenadante será detectável após 12 h, com pico entre 48-72 h, conforme Mendonça et al. (2020). A concentração celular final é estimada em 0,8-1,2 g L $^{-1}$ (OD600 de 1,3-2,0) em LB, alcançando 2,5-4,59 g L $^{-1}$ em meios com melaço ou otimizados, como reportado por Farliahati et al. (2010).

5.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade da xilanase será medida pelo método DNS, utilizando xilana de aveia (1% p/v, pH 5, 55°C, 5 min), conforme descrito nos três artigos. Em LB,

espera-se uma atividade de 15.000-25.000 U L⁻¹, similar aos 21.000 U L⁻¹ de Mendonça et al. (2020). Em meios com melaço de cana, a atividade pode atingir 92.000-195.000 U L⁻¹, enquanto a otimização com (NH₄)₂HPO₄ e K₂HPO₄, como em Farliahati et al. (2010), pode resultar em 1.500.000-2.649.000 U L⁻¹. Rusli et al. (2009) demonstraram que a xilanase recombinante em *Escherichia coli* DH5α apresentou atividade máxima a 55°C e pH 5, sugerindo que a adição de xilana ao meio pode aumentar a atividade específica em 15-25%, alcançando 18.000-30.000 U L⁻¹ em LB.

A curva padrão de xilose (0-1 mg mL⁻¹) deve exibir linearidade ($R^2 > 0,99$). A atividade deve aumentar com o tempo de cultivo, atingindo o máximo entre 48-72 h, com possível declínio após 72 h devido à exaustão de nutrientes, conforme Mendonça et al. (2020). Controles sem enzima minimizarão interferências de açúcares redutores residuais.

5.3 Determinação do crescimento celular por densidade óptica

O crescimento celular será monitorado por OD600, com diluições 1:10 para leituras na faixa de 0,1-1,0. Em LB, espera-se uma curva de crescimento com fase de latência (0-6 h), fase exponencial (6-24 h) e fase estacionária após 24-36 h, atingindo OD600 de 1,3-2,0 (0,8-1,2 g L⁻¹), conforme Mendonça et al. (2020). Em meios com melaço de cana, a OD600 pode alcançar 3,7-4,3 (2,5-4,0 g L⁻¹), e em meio otimizado com (NH₄)₂HPO₄ e K₂HPO₄, até 4,59 g L⁻¹, como em Farliahati et al. (2010). Rusli et al. (2009) indicaram que a suplementação com xilana (1% p/v) no meio LB aumentou a biomassa em ~10%, sugerindo OD600 de 1,4-2,2 em LB com xilana.

A produção de xilanase deve acompanhar o crescimento celular, com pico na transição da fase exponencial para estacionária. Variações entre triplicatas (<10% de desvio padrão) podem ocorrer devido à aeração, mas a padronização do inóculo (OD600 inicial de 0,3) reduzirá discrepâncias.

5.4 Testes de centrifugação

Os testes de centrifugação propostos na metodologia, realizados a 500, 1000 10.000 G por 1, 5 e 10 minutos a 4°C, visam clarificar o extrato bruto de

Escherichia coli, separando a xilanase solúvel (no sobrenadante) dos resíduos celulares (no pellet). A eficiência desse processo depende de variáveis como força centrífuga (g), tempo de sedimentação, viscosidade do caldo, tamanho das partículas e temperatura.

A 500G, estima-se que força centrífuga seria insuficiente para sedimentar partículas menores ($<1\ \mu\text{m}$), como fragmentos de membrana e agregados proteicos, resultando em um sobrenadante com turbidez residual acima do ideal. Isso comprometeria a clarificação inicial, potencialmente sobrecarregando etapas posteriores como filtração. Já a 1000 G, a maior força centrífuga sedimentaria mais partículas finas, mas poderia co-sedimentar a xilanase solúvel (20-50 kDa), especialmente se agregada ou associada a lipídios residuais, diminuindo o rendimento. A escolha de 15 minutos como tempo de centrifugação é padrão para extratos celulares, equilibrando eficiência e praticidade, enquanto a temperatura de 4°C minimiza a degradação térmica da enzima.

A eficiência da centrifugação poderia ser aprimorada por diversas estratégias como:

Ajuste do Tempo de Centrifugação: Aumentar o tempo de 15 para 20 minutos a 1000G poderia sedimentar partículas menores ($<0,5\ \mu\text{m}$), elevando a clarificação sem perdas significativas de xilanase. Tempos superiores a 25 minutos, porém, não justificariam o ganho incremental devido ao plateau na sedimentação.

Pré-tratamento do Caldo: Diluir o extrato bruto em tampão de lise (1:1 ou 1:2) reduziria a viscosidade, melhorando a sedimentação.

Centrifugação em Gradiente: Usar uma centrífuga de fluxo contínuo ou gradiente separaria debris por densidade, alcançando pureza maior no sobrenadante, embora o custo e a complexidade limitem sua viabilidade em escala laboratorial.

5.5 Testes de filtração

Os testes de filtração propostos na metodologia envolvem duas etapas sequenciais: microfiltração com membranas de $0,45\ \mu\text{m}$ e ultrafiltração com membranas de 30 kDa em sistema de fluxo tangencial, aplicadas ao sobrenadante clarificado por centrifugação. Essas técnicas visam remover partículas remanescentes e concentrar a xilanase, melhorando sua pureza e rendimento no

downstream. A eficiência da filtração depende de fatores como tamanho de poro, pressão transmembrana, fluxo de permeado, composição do caldo e grau de entupimento (fouling). Espera-se que a microfiltração reduza a turbidez do sobrenadante, removendo partículas maiores ($>0,5 \mu\text{m}$) como debris celulares e agregados proteicos, enquanto a ultrafiltração concentre a xilanase, alcançando uma pureza maior.

Na microfiltração, membranas de $0,45 \mu\text{m}$ seriam eficazes para eliminar sólidos em suspensão maiores que o poro, como fragmentos de membrana e lipídios residuais do caldo de *Escherichia coli*. A turbidez residual após essa etapa seria reduzida consideravelmente em relação ao sobrenadante centrifugado, mas partículas menores ($<0,4 \mu\text{m}$), como proteínas solúveis hospedeiras (10-70 kDa), passariam pelo filtro. O entupimento das membranas, causado pela alta viscosidade do caldo (1,5-2,0 cP) e pela concentração de sólidos (5-10 g/L pós-centrifugação), reduziria o fluxo com o tempo, exigindo pré-clarificação robusta para mitigar esse efeito.

A ultrafiltração com membranas de 30 kDa, aplicada ao permeado da microfiltração, reteria a xilanase (massa molar média de 20-50 kDa, dependendo da família GH), concentrando-a no retentado enquanto permite a passagem de contaminantes menores, como peptídeos e sais (MW < 10 kDa). A perda da xilanase no permeado poderia ocorrer devido a variações na massa molar ou interações com a membrana (ex.: adsorção hidrofóbica), enquanto o fouling reduziria o fluxo ao longo do processo, especialmente em caldos ricos em proteínas de *Escherichia coli*.

A escolha do sistema de fluxo tangencial na ultrafiltração reduziria o acúmulo de torta na superfície da membrana em 20-25% em comparação com filtração de fluxo normal, prolongando a vida útil do filtro. A análise da atividade enzimática (método DNS) no retentado confirmaria a retenção da xilanase, dependendo da eficiência da centrifugação prévia.

A eficiência da filtração poderia ser aprimorada por algumas estratégias:

Pré-clarificação Otimizada: Uma centrifugação mais rigorosa antes da microfiltração reduziria os sólidos em suspensão, diminuindo o fouling em 20-30% e mantendo o fluxo de permeado por mais tempo.

Ajuste da Pressão Transmembrana: Operar a ultrafiltração com pressão transmembrana gradiente controlaria o fouling, elevando a pureza sem perdas

significativas. Pressões superiores, porém, poderiam compactar a torta, reduzindo o rendimento.

Membranas Modificadas: Empregar membranas hidrofílicas na ultrafiltração diminuindo a adsorção da xilanase e elevando o rendimento,

5.6 Uso de flocculantes

Os testes propostos na metodologia para o uso de flocculantes envolvem a adição de quitosana (0,1%, 0,3% e 0,5%) e cloreto de polialumínio (PAC, 0,2 g/L e 0,5 g/L) ao extrato bruto de *Escherichia coli* antes da centrifugação ou filtração, com agitação suave por 10 minutos. Esses agentes visam aumentar a eficiência da separação da xilanase ao promover a agregação de partículas finas (debris celulares, proteínas hospedeiras) em flocos maiores, facilitando sua remoção. A eficiência da floculação depende de fatores como dosagem, pH do caldo, tempo de contato, carga iônica e tamanho das partículas no extrato.

A quitosana, um polissacarídeo catiônico derivado da quitina, atuaria por neutralização de carga e formação de pontes entre partículas negativamente carregadas no caldo de *Escherichia coli* (pH 7,0-7,5), como debris celulares e lipídios. A dosagem ideal deve ser capaz de gerar flocos densos que sedimentam rapidamente a 1000G ou são retidos em membranas de 0,45 µm, elevando a recuperação da xilanase. O excesso de quitosana poderia aumentar a viscosidade do caldo, dificultando a separação e reduzindo o rendimento devido à retenção da enzima nos flocos formados.

A eficiência da floculação poderia ser aprimorada por estratégias como:

Ajuste do pH: Otimizar o pH do caldo para 6,5-7,0 antes da adição de quitosana maximizaria sua carga catiônica, aumentando a formação de flocos

Tempo de Floculação Prolongado: Aumentar o tempo de agitação de 10 para 15-20 minutos permitiria a formação de flocos maiores e mais estáveis, elevando a clarificação sem impacto significativo na viscosidade.

Combinação de Flocculantes: Usar uma mistura de quitosana e outros flocculantes combinaria os mecanismos de neutralização, podendo alcançar clarificação e recuperação superior. Isso exigiria testes adicionais para equilibrar as dosagens.

6 Conclusão

A revisão bibliográfica revela que a xilanase possui um papel importante para indústrias como biocombustíveis, papel, alimentos e rações, promovendo processos mais sustentáveis. A produção por *Escherichia coli* devido ao seu rápido crescimento e manipulação genética, embora enfrente desafios como contaminação por endotoxinas e corpos de inclusão, se mostra favorável para produção em larga escala dessa enzima.

A análise teórica da produção e purificação de xilanase por *Escherichia coli* destaca a importância da integração de processos como centrifugação, microfiltração, ultrafiltração e uso de flocculantes para otimizar a clarificação, reduzindo turbidez e contaminantes e facilitando as próximas etapas de recuperação da enzima.

REFERÊNCIAS

ACHÁZI, K.; HAAG, R.; BALLAUFF, M.; DERNEDDE, J.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; MAYSINGER, D.; MULTHAUP, G. Understanding the interaction of polyelectrolyte architectures with proteins and biosystems. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 8, p. 3882-3904, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32589355/>. Acesso em: 16 abr. 2025.

AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; AHMED, A.; et al. Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 6, p. 699-706, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25328183/>. Acesso em 17 abr. 2025

AL AANI, S.; MUSTAFA, T. N.; HILAL, N. Ultrafiltration membranes for wastewater and water process engineering: a comprehensive statistical review over the past decade. **Journal of Water Process Engineering**, v. 35, 101241, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214714420301203?via%3Dihub>. Acesso em 10 abr. 2025.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20042329/>. Acesso em 02.mai 2025.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; PRATHER, K. L. J.; RODRIGUES, L. R. One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma* species. *Food Chemistry*, v. 37, n. 8, 107498, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30174095/>. Acesso em 30 abr. 2025.

ANIS, S. F.; HASHAIKEH, R.; HILAL, N. Microfiltration membrane processes: a review of research trends over the past decade. **Journal of Water Process Engineering**, v. 32, 100941, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214714419306051?via%3Dihub>. Acesso em 30. abr. 2025.

ATKINS, E. D. T. **Three dimensional structure, interactions and properties of xylans**. In: VISSER, J.; BELDMAN, G.; SOMEREN, M. A. K.; VORAGEN, A. G. J. (ed.). *Xylan and xylanases*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 21-39.

BALL, V.; WINTERHALTER, M.; SCHWINTÉ, P.; LAVALLE, P.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P. Complexation mechanism of bovine serum albumin and poly(allylamine hydrochloride). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 9, p. 2357-2364, 2002. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp012522m>. Acesso em 15 abr. 2025.

BEDFORD, M. R.; COWIESON, A. J. Exogenous enzymes and their effects on nutrient utilization in poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 76-85, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.018>.

BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 459-466, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10978767/>. Acesso em 15 abr. 2025.

BEVERIDGE, T. Large-scale centrifugation. In: WILSON, I. D. (ed.). *Encyclopedia of separation science*. Oxford: Academic Press, 2000. p. 17-40.

BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial xylanase: a review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335-342, 2016. Disponível em: <https://biotechnologyjournal.usamv.ro/pdf/2016/Art54.pdf>. Acesso em 18 abr. 2025.

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

CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 482-492, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16687233/>. Acesso em 19 abr. 2025.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>.

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, e0192996, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29481569/>. Acesso em 15 abr. 2025.

DATAR, R.; ROSÉN, C. G. Centrifugal separation in the recovery of intracellular protein from *E. coli*. **The Chemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 49-56, 1987.

DHIMAN, S. S.; GARG, G.; SHARMA, J.; MAHAJAN, R. Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 746-755, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871678410006473>. Acesso 1 mai. 2025.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. 2. ed. London: Elsevier, 2013.

FARLIAHATI, M. R.; RAMANAN, R. N.; MOHAMAD, R.; PUSPANINGSIH, N. N. T.; ARIFF, A. B. Enhanced production of xylanase by recombinant *Escherichia coli* DH5 α through optimization of medium composition using response surface methodology. *Annals of Microbiology*, v. 60, p. 279-285, 2010. Disponível em: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-010-0038-z>. Acesso em: 19 abr. 2025.

GHOSH, R. **Principles of bioseparations engineering**. Singapore: World Scientific Publishing, 2006.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, v. 32, p. 419-425, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23897421/>. Acesso em 5 abr. 2025.

GUPTA, S.; BHUSHAN, B.; HOONDAL, G. S. Isolation, purification, and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 325-334, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00974.x>.

HALDER, S.; YADAV, K. K.; SARKAR, R.; MUKHERJEE, S.; SAHA, P.; HALDAR, S.; KARMAKAR, S.; SEN, T. Alteration of zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26558175/>. Acesso em 03 abr. 2025.

HARRISON, R. G.; TODD, P.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. **Bioseparations science and engineering**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2015.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, 36, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-36>.

JHAMB, K.; SAHOO, D. K. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 135-143, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22940310/>. Acesso em 02. abr. 2025.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219-1227, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22138412/>. Acesso em 15. abr. 2025.

KARIM, M. N.; GRAHAM, H.; HAN, B.; CIBULSKAS, A. Flocculation enhanced microfiltration of *Escherichia coli* lysate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 512-519, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X08000636?via%3Di> hub. Acesso em 19 abr. 2025.

KIARIE, E.; WALSH, M. C.; NYACHOTI, C. M. Performance, digestive function, and mucosal responses to xylanase supplementation in pigs fed wheat-based diets. **Journal of Animal Science**, v. 94, suppl. 3, p. 168-171, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas2015-9736>.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10422261/>. Acesso em: 29 abr. 2025.

KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, p. 226-235, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29380253/>. Acesso em 11 abr. 2025.

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. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25190829/>. Acesso em 12 abr. 2025.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulose on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4203-4213, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19386492/>. Acesso em 15. abr. 2025.

LEE, C. S.; ROBINSON, J.; CHONG, M. F. A review on application of flocculants in wastewater treatment. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 92, n. 6, p. 489-508, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psep.2014.04.010>. Acesso em 13 abr. 2025.

LI, J.; ZHOU, P.; LIU, H.; XIONG, C.; LIN, J.; XIAO, W.; GONG, Y.; LIU, Z. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 258-265, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24457310/>. Acesso em 11 abr. 2025.

LI, X.; SHI, Y.; KONG, W.; et al. Improving the thermostability of a GH11 xylanase by directed evolution and its application in the saccharification of corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, 248, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1249-8>.

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K.-E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10862906/>. Acesso em 3 abr. 2025.

MASEY O'NEILL, H. V.; SMITH, J. A.; BEDFORD, M. R. Multicarbohydrase enzymes for non-ruminants. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 290-301, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13261>.

MENDONÇA, Elenira H. M. et al. Recombinant xylanase production by *Escherichia coli* using a non-induced expression system with different nutrient sources. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 1, p. 29-39, 2020Tradução. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43153-019-00004-x>. Acesso em 01 abr. 2025.

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**. [S.l.]: [s.n.], 2013. v. 1.

NG, W.; TING, Y. **Zeta potential of bacterial cells: effect of wash buffers**. PeerJ Preprints, n. e110v6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.110v7>. Acesso em 02. abr 2025.

NORDBERG KARLSSON, E.; SCHMITZ, E.; LINARES-PASTÉN, J. A.; ADLERCREUTZ, P. Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 21, p. 9081-9088, 2018. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6208967/>. Acesso em 07 abr. 2025

PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564-592, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22067746/>. Acesso em 07 abr. 2025.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15944805/>. Acesso em 05 abr. 2025.

RAJABI, M.; NOURISANAMI, F.; GHADIKOLAEI, K. K.; CHANGIZIAN, M.; AKBARI NOGHABI, K.; SHAHBANI ZAHIRI, H. Metagenomic psychrophilic xylanase from camel rumen investigated for bioethanol production from wheat bran using *Bacillus subtilis* AP. **Scientific Reports**, v. 12, 8152, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35581279/>. Acesso em 13 abr. 2025.

ROMANOWSKA, I.; POLAK, J.; BIELECKI, S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* xylanase for bakery applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 84, n. 12, p. 1543-1549, 2004.
ROSANO, G. L.; BRUCH, E. M.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 172, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16012837/>. Acesso em 08 mai. 2025.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26504249/>. Acesso em 01 abr. 2025.

ROUSH, D. J.; LU, Y. Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology. **Biotechnology Progress**, [S.l.], 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18410157/>. Acesso em 05 abr. 2025.

RUSLI, F. M.; MOHAMED, M. S.; MOHAMAD, R.; PUSPANINGSIH, N. N. T.; ARIFF, A. B. Kinetics of xylanase fermentation by recombinant *Escherichia coli* DH5α in shake flask culture. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 109-117, 2009. Disponível em: <https://thescpub.com/abstract/ajbbbsp.2009.109.117>. Acesso em 10 abr. 2025.

SCHMIDELL NETTO, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.
Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746-8749, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17905994/>. Acesso em 30 mar. 2025.

SHARMA, A.; THAKUR, V. V.; SHRIVASTAVA, A.; et al. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching: a review. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 40, n. 2, p. 45-53, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25036336/>. Acesso em 01. abr 2025.

SIMANJUNTAK, B.; JULIAN, H.; KRESNOWATI, M. T. A. P. Downstream process of xylanase production from oil palm empty fruit bunches: a review. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 1034, n. 1, 012046, 2022. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/1034/1/012046>. Acesso em 03 abr. 2025.

SINGH, A. K.; MANDAL, R. K.; BEDFORD, M. R.; JHA, R. Xylanase improves growth performance, enhances cecal short-chain fatty acids production, and increases the relative abundance of fiber fermenting cecal microbiota in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 277, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840121001425>. Acesso em 13 abr. 2025.

STEVENS, K. A.; JAYKUS, L. A. Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 7-24, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15116760/>. Acesso em 15 abr. 2025.

UFFEN, R. L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 19, n. 1, p. 1-6, 1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/jimb/article/19/1/1/5991624>. Acesso em 02 abr. 2025.

WALIA, A.; GULERI, S.; MEHTA, P.; et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. 3 **Biotech**, v. 7, n. 1, 11, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28391477/>. Acesso 11 abr. 2025.

WANG, H.; CHEN, Z.; MIAO, J.; LI, Y. A novel approach for mitigation of membrane fouling: concomitant use of flocculant and magnetic powder. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 318-325, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26994460/>. Acesso em 12 abr. 2025.

ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 13, p. 1470-1476, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16243524/>. Acesso em 14 abr. 2025.