UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA - *CAMPUS* DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL COVALENTE DE XILANASES: SELEÇÃO DE DERIVADOS ATIVOS E ESTABILIZADOS

CAIO CASALE ARAGON

TESE DE DOUTORADO

ARARAQUARA
2013

CAIO CASALE ARAGON

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL COVALENTE DE XILANASES: SELEÇÃO DE DERIVADOS ATIVOS E ESTABILIZADOS

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

ARARAQUARA
2013

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Caio Casale Aragon
Filiação: Flávio Ferrari Aragon e Teresinha de Lourdes Casale Aragon
Nascimento: 02/04/1981 - Ilha Solteira/SP - Brasil

Formação acadêmica/titulação

2009 Doutorado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, Sao Paulo, Brasil
Período sanduíche no *Instituto de Catalisis y Petroleoquímica – Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (Supervisores: José Manuel Guisán e César Mateo)
Título: Imobilização multipontual covalente de xilanases: seleção de derivados ativos e estabilizados
Orientador: Rubens Monti
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2006 - 2008 Mestrado em Alimentos e Nutrição.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, Sao Paulo, Brasil
Título: Glicerol Quinase de Levedura de Panificação
Orientadora: Maristela de Freitas Sanches Peres
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2000 - 2005 Graduação em Nutrição.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brasil

---

Formação complementar

2004 - 2005 Estágio extracurricular. Iniciação científica.
Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP, FCA, Botucatu, São Paulo, Brasil
Orientador: Rogério Lopes Vieites
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2004 - 2004 Extensão universitária em Avaliação Nutricional - Ind. Aeronáutica Neiva.
Empresa de alimentação GR S.A., Botucatu, São Paulo, Brasil

2003 - 2003 Extensão universitária em Trabalho de Levantamento de Dados.
Same Tecnologia e Informação Ltda, SAME, Botucatu, São Paulo, Brasil

---

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

2009 - 2013 Vínculo: Bolsista , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2006 - 2008 Vínculo: Bolsista, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

---

Atividades

2006 - 2013 Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara; Instituto de Química de Araraquara, São Paulo, Brasil
Linhas de pesquisa: Imobilização multipontual de enzimas em suportes sólidos, Produção e caracterização de enzimas microbianas.

2005 - 2005 Estágio, Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, Brasil
Estágio: Centro de Saúde Escola; Atividades em Grupo; Consulta Nutricional Individualizada.

2005 - 2005 Estágio, Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, Brasil
Estágio: HCFMB; Avaliação Nutricional e Adequação de Dietas

2. Duratex S/A

Atividades

2005 - 2005 Estágio, Unidade de Alimentação e Nutrição, Botucatu, São Paulo, Brasil
Estágio: Administração dos Serviços de Alimentação

Linhas de pesquisa

1. Imobilização de enzimas em suportes sólidos
2. Produção e caracterização de enzimas microbianas

Áreas de atuação

1. Enzimologia
2. Imobilização de Enzimas
3. Microbiologia
4. Ciência de Alimentos

Produção

Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação

1. Aragon, C. C., Mateo, C., Ruiz-Matute, A. I., Corzo, N., Fernandez-Lorente, G., Sevillano, L., Díaz, M., Monti, R., Santamaría, R. I., Guisán, J. M. Production of xylo-oligosaccharides by immobilized-stabilized derivatives of endo-xylanase from *Streptomyces halstedii*. Process Biochemistry, 2013.

2. Benedetti, A. C. E. P., Costa, E. D., Aragon, C. C., Santos, A. F., Goulart, A. J., Attili-Angelis, D., Monti, R. Low-cost carbon sources for the production of a thermostable xylanase by *Aspergillus niger*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2013.

Artigos completos publicados em periódicos

1. Lima, L. N., Aragon, C. C., Mateo, C., Palomo, J. M., Giordano, R. L.C., Tardioli, P. W., Guisan, J. M., Fernandez-Lorente, G. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. Process Biochemistry, v. 48, p. 118-123, 2013.

2. Silva, A. S., Aragon, C. C., Santana, E. H. W., Destro, M. T., Alegro, L. C. A. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos no brasil: uma revisão. UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde, v. 13, p. 59-67, 2011.

3. Aragon, C. C., Ferreira-Dias, S., Gattás, E. A. L., Peres, M. F. S. Characterization of glycerol kinase from baker's yeast: Response surface modeling of the enzymatic reaction. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic., v. 52-53, p. 113-120, 2008.

4. Pansani, M. C., Aragon, C. C., Vieites, R. L. Efeito da proporção soja:água e do aquecimento sobre rendimento, qualidade proteica e sensorial do tofu orgânico. Higiene Alimentar, v. 22, p. 81-87, 2008.

5. Vieites, R. L., Evangelista, R. M., Aragon, C. C., Pansani, M. C., Rall, V. L. M. Processamento, qualidade nutricional e microbiológica do okara orgânico. Higiene Alimentar, v. 21, p. 107-114, 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. Vieites, R. L., Aragon, C. C., Evangelista, R. M., Moraes, M. R. Efeito da proporção soja:água e do aquecimento sobre a qualidade nutricional, sensorial e microbiológica do tofu orgânico In: Seminario latinoamericano y del caribe de ciencia y tecnologia de los alimentos, 2006, Havana, Cuba: CICTA, v. 1, p. 298-302.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Aragon, C. C.; Santos, A. F.; Goulart, A. J.; Mateo, C.; Guisán, J. M.; Monti, R. Production of xylooligosaccharides by xylanase of Aspergillus niger immobilized on glyoxyl-agarose. In: XLI Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

2. Santos, A. F., Aragon, C. C., Bezerra, T. M., Goulart, A. J., Vinueza, J. C. G., Monti, R. Imobilização de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* em pó de sabugo de milho e aplicação em reator enzimático para produção de xarope de açúcar invertido. In: 9° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2011, Campinas, SP, Brasil.

3. Aragon, C. C., Santos, A. F., Vinueza, J. C. G., Loureiro, R. M., Goulart, A. J., Monti, R. Characterization and Immobilization of xylanase produced by *A. niger* using corn-cob as carbon source. In: IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2010, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

4. Aragon, C. C., Costa, E. D., Benedetti, A. C. E. P., Vinueza, J. C. G., Silveira, C. B., Santos, A. F., Monti, R. Xylanase production by thermophilic fungus (FCUP1) using corn-cob: immobilization on amino and glutaraldehyde agarose. In: XXXVIII Annual meeting of the Brazilian society for Biotechemistry and Molecular Biology, 2009, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

5. Aragon, C. C., Camargo, L. A., Gattás, E.A.L., Peres, M.F.S. Characterization of glycerol kinase from baker´s yeast. In: 8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, 2007, Oviedo, Espanha.

6. Aragon, C. C., Camargo, L. A., Gattás, E. A. L., Peres, M. F. S. Colorimetric Assay of glycerol kinase from basker´s yeast. In: XXXVI Annual meeting of the Brazilian society for Biochemistry and Molecular Biology and 10 th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts, 2007, Salvador, BA, Brasil.

7. Aragon, C. C., Pansani, M. C., Vieites, R. L. Efeito da proporção soja:água e do aquecimento sobre rendimento, qualidade proteica e sensorial do okara orgânico. In: Simpósio Latinoamericano de Ciência dos Alimentos, 2005, Campinas, SP, Brasil.

8. Pansani, M. C., Aragon, C. C., Vieites, R. L. Efeito da proporção soja:água e do aquecimento sobre rendimento, qualidade proteica e sensorial do tofu orgânico. In: Simpósio Latinoamericano de Ciência dos Alimentos, 2005, Campinas, SP, Brasil.

CAIO CASALE ARAGON

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 15 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rubens Monti (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara

Profª Drª Daniela Alonso Bocchini Martins
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Drª Maristela de Freitas Sanches Perez
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

Profª Drª Eleonora Cano Carmona
Instituto de Biociências - UNESP, Rio Claro

Prof. Dr. Marco Filice
Instituto de Catalisi y Petroquimica, Consejo Superior de Investigaciónes Cientificas – CSIC, Madri - Espanha

Dedico

aos meus pais, Flavinho e Teca, por tudo:
carinho
confiança
incentivo
consideração
amor
segurança
dedicação
valores
amizade
admiração

Enfim...
por tudo!

Agradeço

a Deus, pela vida. Pela sua constante presença no meu dia a dia.

ao Prof. Dr. Rubens Monti, pela orientação e pelo carinho com que me acolheu durante a elaboração desta pesquisa. Seus ensinamentos, certamente, nortearão meus futuros projetos.

ao amigo Rubens Monti, pelo exemplo de paciência, disciplina e honestidade. Obrigado pelos conselhos e pela confiança em mim depositada!

ao Dr. José Manuel Guisán, principal responsável por fazer 2011 render-me muito mais que 365 dias. Obrigado pela indispensável orientação e pelas inesquecíveis discussões durante nossos almoços!

ao Dr. César Mateo González, grande amigo, pelo valioso auxílio na elaboração deste trabalho. Seu conhecimento e sua disponibilidade em socorrer-me foram fundamentais. Obrigado pelo carinho!

ao Prof. Dr. Luís Henrique S. Guimarães e à Prof.ª Dr.ª Daniela A. Bocchini Martins, pelas oportunas contribuições no meu exame de qualificação.

à Prof.ª Dr.ª Sandra Helena da Cruz, pela doação da cepa de *A. versicolor*.

ao Dr. Marco Filice, pela inestimável ajuda durante a elaboração deste trabalho.

ao pessoal do laboratório, Andréa, Julian, Vinícius, Júlio, Dani, Ana Lúcia, Antônio, Juliana, Ana, e Taís. Aprendi com cada um de vocês!

ao pessoal do ICP (CSIC), José, César, Palomo, Marco, Marzia, Beni, Glória, Mari Carmen, Romerito, William, Andréa, Jana, Javi, Godoy, Rocio, Sonia, Maria, Anca, Diane, Lionete, Carlos, Rodrigo, Yanovska e Américo. Vocês contribuíram para que eu me sentisse “em casa”. Muchas gracias!

aos professores, funcionários e pós-graduandos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química (UNESP – Araraquara), pela amizade. Obrigado aos que colaboraram!

ao Fernando, Ederlan e Bernardinho, amigos de república, pelos papos sérios (e outros nem tanto!) e, claro, pelos momentos de descontração nos incontáveis churrascos.

à minha família, pelo apoio que sempre me deu e pelo amor que tem por mim. Vocês são meu porto seguro!

à minha amada Pri, companheira de todas as horas, pelo carinho e pela dedicação. Obrigado por me compreender tão bem!

à FAPESP (processo 2008/09332-8), pela bolsa de doutorado.

à CAPES (processo 3756-10-6), pela bolsa de doutorado-sanduíche – PDEE.

Enzima

Existe uma enzima
dentro de mim.
Sendo enzima
quebra e constrói
e sua ausência
em meu peito dói.

A baixo pH
poderá se desnaturar
não quero que isto
aconteça.
Nesse sentido
hei de trabalhar.

Minha enzima
me enche de poesia.
Tece laços energéticos,
ataca pontos estratégicos,
me ilumina, me fermenta.
Com ela eu rio,
de tristezas esqueço.
Sinto que voo, cresço.

Ela não requer
energia de ativação,
o meu coração basta
para iniciar a reação.

Não tem porção metálica.
Não precisa de cofator.
Ela foi feita sob medida
à base de muito amor.

É eterna, não se acaba,
é única
e é rara.
E me é muito cara.

É. Existe uma enzima
dentro de mim
e eu amo
essa enzima.

Regine Limaverde
(poeta e cientista)

RESUMO

As xilanases são glicosidases que catalisam a hidrólise das ligações 1,4-β-xilosídicas da xilana e que possuem potencial biotecnológico em vários processos industriais, como na clarificação de sucos e vinhos, na fabricação de pães, na filtração da cerveja e no tratamento das polpas celulósicas. Recentemente, recebem atenção pela produção dos xilooligossacarídeos como ingredientes prebióticos. Embora possuam diversas vantagens sobre os métodos químicos, as enzimas são, geralmente, limitadas para uso industrial. A imobilização em suportes sólidos melhora a estabilidade dos biocatalisadores e o controle operacional, promovendo a recuperação do produto sem a contaminação pela enzima. Assim, os objetivos deste trabalho foram: produzir e caracterizar a xilanase de *Aspergillus niger*; imobilizar covalentemente, em suportes sólidos, a xilanase de *A. niger* e quatro outras, provenientes de diferentes fontes (*Aspergillus versicolor*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Streptomyces halstedii*); caracterizar os derivados obtidos; analisar o produto de hidrólise da xilana pelos derivados. A xilanase de *A. niger* mostrou ótima estabilidade até 55°C, com meia-vida de 15 minutos a 60°C, e sua produção foi induzida por pequenas concentrações de xilose. O fungo secretou pelo menos duas isoformas com atividade xilanolítica. A xilanase I foi purificada em uma única etapa, por adsorção em suporte ativado com quelatos, assim como a enzima de *S. halstedii*, contendo cauda de histidina. A xilanase de *T. longibrachiatum* (comercial) foi parcialmente purificada com suportes iônicos, e as de *T. lanuginosus* (comercial) e *A. versicolor* já apresentavam alto grau de pureza. As enzimas foram imobilizadas em agarose ativada com diferentes grupos reativos, com fatores de estabilização entre 12 (*T. lanuginosus*) e 600 (*A. versicolor*), em glioxil-agarose. De modo geral, os derivados exibiram aumento da temperatura ótima de atividade, capacidade de reutilização e diferentes perfis de hidrólise, sendo que o derivado com a enzima de *T. lanuginosus* foi o único que não produziu xilose ao final do processo. As enzimas estudadas foram imobilizadas e estabilizadas com êxito, gerando novos biocatalisadores para a eficiente e sustentável síntese de xilooligossacarídeos.

Palavras-chave: Xilanases. Imobilização de enzimas. Estabilização térmica. Produção de xilooligossacarídeos.

ABSTRACT

Xylanases are glycosidases that catalyze the hydrolytic cleavage of β-1,4-linked polymers of D-xylose and they have biotechnological potential in various industrial processes such as in the clarification of juices and wines, in the manufacturing of breads, in beer filtration and in the treatment of cellulose pulps. Recently, attention is given to the production of xylo-oligosaccharides as prebiotic ingredients. While enzymes have several advantages over chemical methods, they are generally limited for industrial use. Immobilization on solid supports improves the stability of the biocatalyst and the operational control, and promotes the easy recovery of the product without contamination by the enzyme. The objectives of this study were: to produce and characterize xylanases from *Aspergillus niger*; to immobilize the xylanase of *Aspergillus niger* and four others from different sources (*Aspergillus versicolor*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* and *Streptomyces halstedii*) covalently on solid supports; to characterize the derivatives obtained; to analyze the products profile of xylan hydrolysis by the derivatives. The xylanase of *A. niger* showed excellent stability up to 55°C, with a half-life of 15 minutes at 60°C, and its production was induced by low concentrations of xylose. The fungus produced at least two isoforms with xylanolytic activity. Xylanase I was purified in one step by adsorption on support activated with chelates, as well as the histidine-tagged enzyme of *S. halstedii*. The xylanase of *T. longibrachiatum* (commercial) was partially purified with ionic supports, and those from *T. lanuginosus* (commercial) and *A. versicolor* already showed high degree of purity. The xylanases were then immobilized on agarose activated with different reactive groups, and presented stabilization factors between 12 (*T. lanuginosus*) and 600 (*A. versicolor*) on glyoxyl-agarose. In general, the derivatives exhibited an increase of the optimum temperature of activity, reusability and different profiles of hydrolysis, whereas the derivative with the enzyme of *T. lanuginosus* was the unique that produced no xylose at the end of the process. The enzymes here studied were successfully immobilized and stabilized, resulting in new catalysts suitable for the efficient and sustainable production of xylo-oligosaccharides.

Keywords: Xylanases. Enzyme immobilization. Thermal stabilization. Xylo-oligosaccharides production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana	22
Figura 2 –	Vendas mundiais das principais enzimas por diversos setores da indústria	30
Figura 3 –	Eventos moleculares que levam à perda da estrutura e da função de uma proteína	31
Figura 4 –	Métodos reversíveis de imobilização enzimática	33
Figura 5 –	Métodos irreversíveis de imobilização enzimática	33
Figura 6 –	Estrutura química básica da agarose, formada por repetidas unidades de agarobiose	33
Figura 7 –	Desprotonação dos grupos ε-amino das lisinas, após incubação em pH 10,0	34
Figura 8 –	Ilustração de uma enzima hipotética imobilizada em glioxil-agarose	35
Figura 9 –	Representação do suporte glioxil-agarose, contendo grupos aldeídos alifáticos	46
Figura 10 –	Representação do suporte glutaraldeído-agarose	47
Figura 11 –	Preparação dos suportes glioxil-agarose heterofuncionais	48
Figura 12 –	Representação do suporte IDA-quelato agarose	49
Figura 13 –	Suporte comercial de sepharose ativada com brometo de cianogênio (CNBr), contendo éster de cianato e imido carbonato	49
Figura 14 –	Esquema ilustrando a imobilização covalente multipontual da xilanase de *Aspergillus versicolor*, em suporte glioxil-agarose, e seu uso em um reator de leito empacotado, para produção contínua de xilooligossacarídeos	55
Figura 15 –	Microscopia óptica (400x) do conidióforo do fungo *Aspergillus niger*	56
Figura 16 –	SDS-PAGE do extrato bruto de *Aspergillus niger*	57
Figura 17 –	Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico envolvendo a xilanase e a β-xilosidase	59
Figura 18 –	Efeito do pH na atividade xilanolítica do filtrado de *A. niger*	61
Figura 19 –	Efeito da temperatura na atividade xilanolítica do filtrado de *A. niger*	62
Figura 20 –	Gráfico de Michaelis-Menten da enzima xilanase de *Aspergillus niger*	63
Figura 21 –	Cálculo de K_m e V_{max} da enzima xilanase de *A. niger* por diferentes métodos	63
Figura 22 –	Estabilidade térmica da xilanase de *Aspergillus niger*, após uma hora de incubação, nas diferentes temperaturas	64
Figura 23 –	Inativação térmica, a 55°C, da enzima xilanase de *Aspergillus niger*	65
Figura 24 –	Inativação térmica, a 60°C, da enzima xilanase de *Aspergillus niger*	65
Figura 25 –	Estabilidade da xilanase de *A. niger* em pH 10,0	66
Figura 26 –	SDS-PAGE da purificação da endo-1,4-β-xilanase em IDA-Cu	68
Figura 27 –	Curso de imobilização da xilanase I de *Aspergillus niger* em glioxil-agarose 10 CL	69
Figura 28 –	Curso de imobilização da xilanase II de *Aspergillus niger* em glioxil-agarose 10 CL	70
Figura 29 –	Inativação térmica dos derivados CNBr-agarose de xilanases produzidas por *Aspergillus niger*	70

Figura 30 – Inativação térmica dos derivados Glioxil-agarose de xilanases produzidas por *Aspergillus niger* 71
Figura 31 – Imobilização *versus* estabilização 72
Figura 32 – Inativação térmica dos derivados submetidos a diferentes tempos de incubação em pH 10,0, após imobilização da xilanase I em glioxil-agarose 10 CL 72
Figura 33 – Inativação térmica dos derivados xilanase I-glioxil-agarose 10 CL produzidos com diferentes graus de ativação 73
Figura 34 – Inativação térmica dos derivados xilanase I-glioxil-agarose obtidos agaroses 4 e 10 CL 74
Figura 35 – Inativação térmica dos derivados de xilanase I em glioxil-agarose e CNBr-sepharose, em diferentes valores de pH 75
Figura 36 – Inativação térmica dos derivados de xilanase I em glioxil-agarose e CNBr-sepharose, em diferentes valores de pH 75
Figura 37 – Influência da temperatura na atividade enzimática da xilanase I, imobilizada em glioxil-agarose e em sepharose ativada com CNBr 76
Figura 38 – Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana pelo derivado xil I-glioxil-agarose de *A. niger*, em diferentes tempos, a 37°C 77
Figura 39 – Curso de hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v) pelo derivado xil I-glioxil-agarose 10 CL, em diferentes temperaturas 77
Figura 40 – Cromatograma HPAEC-PAD da hidrólise de xilana *beechwood* pelo derivado xil I-glioxil-agarose 78
Figura 41 – Curso de hidrólise de xilanas *beechwood* e *birchwood* pelo derivado xilanase glioxil-agarose 79
Figura 42 – Curso de imobilização da xilanase de *A. versicolor* em glioxil-agarose 6 CL 82
Figura 43 – SDS-PAGE da xilanase de *A. versicolor* 83
Figura 44 – Inativação térmica dos derivados e da enzima solúvel de *A. versicolor* 84
Figura 45 – Inativação térmica dos derivados xil I-glioxil-agarose com diferentes tempos de incubação em pH 10,0, após 1 hora de imobilização e antes da redução com boroidreto de sódio 85
Figura 46 – Influência da temperatura na atividade enzimática da enzima solúvel e do derivado xil I-glioxil-agarose 86
Figura 47 – Curso de hidrólise da xilana birchwood 4% (m/v) pelo derivado xil I-glioxil-agarose, em diferentes valores de pH, a 25°C 87
Figura 48 – Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana birchwood 4% (m/v) pelo derivado xil I-glioxil-agarose, em reator de leito empacotado 88
Figura 49 – Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana birchwood 4% (m/v) pela enzima solúvel e pelo derivado xil I-glioxil-agarose 89
Figura 50 – Reúso do derivado xil I-glioxil-agarose por 10 ciclos de hidrólise consecutivos de 1 hora de duração 89
Figura 51 – SDS-PAGE do extrato de xilanase comercial produzido por *Trichoderma longibrachiatum* 91

Figura 52 – Estabilidade da xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* em pH 10,0 92
Figura 53 – Curso de imobilização da xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* em glioxil-agarose 10 CL 92
Figura 54 – Inativação térmica da xilanase de *T. longibrachiatum* imobilizada em glioxil-agarose, em pH 8,5 e em pH 10,0 93
Figura 55 – Inativação térmica da xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* imobilizada em CNBr-sepharose e em glioxil-agarose 10 CL 94
Figura 56 – Cromatograma HPAEC-PAD do produto de hidrólise de xilana pelo derivado de xilanase de *T. longibrachiatum* glioxil-agarose 95
Figura 57 – SDS-PAGE da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* 95
Figura 58 – Estabilidade da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* em pH 10,0, a 25°C 96
Figura 59 – Curso de imobilização da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* em glioxil-agarose 10 CL, com uso de 10 ml de extrato diluído para 1 g de gel 96
Figura 60 – Curso de imobilização da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* em glioxil-agarose 10 CL, com uso de 3 ml de extrato diluído para 1 g de gel 97
Figura 61 – Inativação térmica da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em glioxil-agarose 97
Figura 62 – Inativação térmica da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em CNBr-sepharose e em glioxil-agarose 98
Figura 63 – Cromatograma HPAEC-PAD do produto de hidrólise de xilana pelo derivado de xilanase de *T. lanuginosus* em glioxil-agarose 99
Figura 64 – SDS-PAGE da endoxilanase de *Streptomyces halstedii* 100
Figura 65 – Estabilidade da xilanase de *Streptomyces halstedii*, em pH 10,0, em diferentes temperaturas 101
Figura 66 – Inativação térmica da xilanase de *Streptomyces halstedii* imobilizada em glioxil-agarose 10 CL e em CNBr-sepharose 101
Figura 67 – Influência da temperatura na atividade enzimática da xilanase de *Streptomyces halstedii* imobilizada em glioxil-agarose 10 CL e em CNBr-sepharose 102
Figura 68 – Inativação térmica, em diferentes valores de pH, da xilanase imobilizada em glioxil-agarose 10 CL 102
Figura 69 – Curso de hidrólise de xilana *beechwood* 1 % (m/v) pela xilanase imobilizada em glioxil-agarose, em diferentes temperaturas 103
Figura 70 – Ciclos consecutivos de hidrólise de xilana *beechwood* 1 % (m/v) pela xilanase imobilizada em glioxil-agarose 103
Figura 71 – Cromatograma HPAEC-PAD do produto de hidrólise de xilana pelo derivado de xilanase de *Streptomyces halstedii* em glioxil-agarose 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais trabalhos de imobilização de xilanases reportados na literatura	37
Tabela 2 –	Efeito do tratamento do extrato bruto com caulim, na atividade da xilanase de *A. niger*	57
Tabela 3 –	Efeito da liofilização do extrato bruto e do extrato tratado com caulim, na atividade da xilanase de *Aspergillus niger*	58
Tabela 4 –	Atividade xilanolítica em filtrado de cultura do fungo *A. niger*, em diferentes fontes de carbono	58
Tabela 5 –	Atividade de xilanase em filtrado do *A. niger* crescido com quatro diferentes fontes de carbono	60
Tabela 6 –	Valores de concentração de substrato e velocidade inicial de xilanase presente no extrato de *A. niger*, filtrado em caulim	63
Tabela 7 –	Valores de K_m e V_{max} aparentes do filtrado de *A. niger*, obtidos por diferentes métodos	64
Tabela 8 –	Efeito da adição de íons na atividade da xilanase de *A. niger*	67
Tabela 9 –	Rendimento e atividade recuperada do extrato bruto de xilanase imobilizado em diferentes suportes	67
Tabela 10 –	Valores de proteína e atividade após purificação da endo-1,4-β-xilanase de *Aspergillus niger* com IDA-Cu agarose	68
Tabela 11	Formação de XOS, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), em diferentes temperaturas, pelo derivado xil I-glioxil-agarose	79
Tabela 12 –	Formação de XOS, após hidrólise das xilanas *beechwood* 4% (m/v) e *birchwood* 4% (m/v), pelo derivado xil I-glioxil-agarose	80
Tabela 13 –	Formação de XOS, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), em diferentes valores de pH, pelo derivado xil I-glioxil-agarose	80
Tabela 14 –	Formação de XOS, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), pelos derivados glioxil-agarose obtidos com as enzimas xilanase I e xilanase II	81
Tabela 15 –	Rendimento de imobilização e atividade recuperada da xilanase de *A. versicolor*, imobilizada em agarose com diferentes ativações	82
Tabela 16 –	Percentual de atividade e proteína do extrato xilanolítico de *Trichoderma longibrachiatum* que se adsorveu aos suportes SP-sepharose e Q-sepharose	90
Tabela 17 –	Valores de proteína e atividade após purificação parcial da endo-1,4-β-xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* com Q-sepharose e SP-sepharose	90
Tabela 18 –	Formação de xilooligossacarídeos, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), pelo derivado de xilanase de *T. longibrachiatum* em glioxil-agarose	94
Tabela 19 –	Formação de xilooligossacarídeos, após hidrólise de xilana beechwood 4% (m/v), pelo derivado de xilanase de *T. lanuginosus* em glioxil-agarose	99
Tabela 20 –	Formação de xilooligossacarídeos, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), pelo derivado de xilanase de *S. halstedii* em glioxil-agarose	104

Tabela 21 – Atividade recuperada, rendimento de imobilização e fator de estabilização obtidos após imobilização das cinco xilanases 105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR = açúcar(es) redutor(es)
CL = entrecruzado(a) (*cross-linked*)
CM = carboximetil
CNBr = brometo de cianogênio
DEAE = dietil-aminoetil
DNS = ácido dinitrossalicílico
DP = grau de polimerização (*degree of polimerization*)
EA = energia de ativação
EDA = etilenodiamina
HPAEC-PAD = cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (*high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection*)
IDA = ácido iminodiacético
K_m = constante de Michaelis
MANAE = monoamino-N-aminoetil
PEI = polietilenoimina
TLC = cromatografia em camada delgada (*thin layer chromatography*)
U = unidade enzimática
V_0 = velocidade inicial
V_{max} = velocidade máxima
XOS = xilooligossacarídeo(s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 Xilana 21
1.2 Xilanases 21
1.3 Principais aplicações das xilanases 23
1.4 Xilooligossacarídeos como ingredientes prebióticos 24
1.5 Fontes e produção de xilanases 25
1.6 Estabilidade de xilanases 27
1.7 Uso das enzimas em indústrias 29
1.8 Imobilização de enzimas 32

2 OBJETIVOS 39

2.1 Objetivo geral 39
2.2 Objetivos específicos 39

3 MATERIAL E MÉTODOS 40

3.1 Material 40
3.2 Fontes de xilanase 40
3.3 Produção de xilanase de *Aspergillus niger* 40
3.4 Produção de xilanase de *Aspergillus versicolor* 41
3.5 Produção de xilanase de *Streptomyces halstedii JM8* 41
3.6 Purificacão da enzima recombinante de *Streptomyces halstedii JM8* 42
3.7 Dosagem de proteína 42
3.8 Atividade xilanolítica 43
3.9 Efeito da adição de íons sobre a atividade da xilanase de *Aspergillus niger* 43
3.10 Estabilidade frente a diferentes valores de pH 43
3.11 Determinação do pH ótimo 44
3.12 Determinação da temperatura ótima 44
3.13 Estabilidade térmica 44
3.14 Inativação térmica 44
3.15 Determinação de K_m e V_{max} aparentes 45
3.16 Preparo dos suportes de imobilização 45
3.16.1 Glioxil-agarose 45
3.16.2 Monoaminoetil-N-aminoetil agarose (MANAE-agarose) 46
3.16.3 Glutaraldeído-agarose 46
3.16.4 Polietilenoimina-agarose (PEI-agarose) 47
3.16.5 Suportes heterofuncionais 47
3.16.6 Quelato-agarose (IDA-Cu^{+2} agarose) 48
3.16.7 CNBr-sepharose 49
3.17 Imobilização de xilanases 49
3.17.1 Xilanase de *Aspergillus niger* 50
3.17.2 Xilanase de *Aspergillus versicolor* 51
3.17.3 Xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* 51
3.17.4 Xilanase de *Thermomyces lanuginosus* 52
3.17.5 Xilanase de *Streptomyces halstedii* 52

3.18 SDS-PAGE **52**
3.19 Hidrólise de xilana pelos derivados **52**
3.20 Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) **53**
3.21 Cromatografia em camada delgada (TLC) **54**
3.22 Reúso dos derivados **54**
3.23 Produção de XOS em reator de leito empacotado **54**
3.24 Análise dos dados **55**

4 RESULTADOS **56**

4.1 Xilanase de *Aspergillus niger* **56**
4.1.1 Identificação do fungo 56
4.1.2 Clarificação e concentração do extrato enzimático 56
4.1.3 Produção de xilanase por *Aspergillus niger* em diferentes fontes de carbono 58
4.1.4 Caracterização da xilanase produzida por *Aspergillus niger* 61
4.1.4.1 Determinação do pH ótimo 61
4.1.4.2 Determinação da temperatura ótima 61
4.1.4.3 Determinação de K_m e V_{max} aparentes 62
4.1.4.4 Estabilidade térmica 64
4.1.4.5 Inativação térmica 64
4.1.4.6 Estabilidade ao pH 66
4.1.5 Efeito da adição de íons na atividade xilanolítica 66
4.1.6 Purificação 67
4.1.7 Estudos de imobilização 68
4.1.8 Estabilidade do derivado xil I-glioxil-agarose ao pH 74
4.1.9 Temperatura ótima do derivado xil-glioxil-agarose 75
4.1.10 Hidrólise de xilana pelo derivado xil I-glioxil-agarose 76
4.2 Xilanase de *Aspergillus versicolor* **81**
4.2.1 Produção da xilanase 81
4.2.2 Imobilização da xilanase 81
4.2.3. Estudo da estabilidade térmica 83
4.2.4 Melhora da estabilidade do derivado xil I-glioxil-agarose 85
4.2.5 Influência da temperatura na atividade enzimática 86
4.2.6 Influência do pH na hidrólise da xilana 86
4.2.7 Produção de XOS em reator de leito empacotado 87
4.2.8 Reúso do derivado 89
4.3 Xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* **90**
4.4 Xilanase de *Thermomyces lanuginosus* **95**
4.5 Xilanase de *Streptomyces halstedii* **99**
4.5.1 Purificação da endoxilanase recombinante 99
4.5.2 Imobilização 100
4.5.3 Hidrólise de xilana pelo derivado xil-glioxil-agarose 103
4.6 Síntese dos resultados de imobilização **105**

5 CONCLUSÃO **106**

REFERÊNCIAS **108**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Xilana

A xilana é um dos principais polissacarídeos estruturais de células vegetais e o segundo mais abundante polissacarídeo na natureza (PRADE, 1995). Além disso, é a principal constituinte da hemicelulose, um complexo polimérico que inclui, também, a xiloglucana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), a glucomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), a galactoglucomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose) e a arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e arabinose) (SHALLOM; SHOHAM, 2003). Todas, juntamente com a celulose (1,4-β-glucana) e a lignina (um complexo polifenólico), formam quase toda a parede celular vegetal (KULKARNI et al., 1999).

A xilana localiza-se, sobretudo, na parede celular secundária, formando uma interface entre a lignina e os outros polissacarídeos. Existem evidências de que a xilana e os resíduos fenólicos de lignina estejam unidos por ligações covalentes, sendo que ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals unem este polissacarídeo à cadeia de celulose (FERREIRA FILHO, 1994). Na natureza, a xilana é completamente hidrolisada a monossacarídeos por ação conjunta de diversas enzimas. A heterogeneidade na estrutura da xilana é responsável pela diversidade das enzimas xilanolíticas (Figura 1). O sistema de degradação da xilana inclui, em especial, β-1,4-xilanases e β-xilosidases, além de outras, como α-D-glucuronidases, α-L-arabinofuranosidase, acetil-xilana esterase, ácido ferúlico esterases e ácido p-cumárico esterases (BEG et al., 2001; PRADE, 1995). As xilanases atuam nas ligações β-1,4 internas das cadeias de xilana, para formarem xilooligossacarídeos (XOS) de diversos tamanhos como produto final (BRODEL et al., 1990; SHALLOM; SHOHAM, 2003).

1.2 Xilanases

As xilanases são glicosidases que catalisam a hidrólise das ligações 1,4-β-xilosídicas da xilana. Primeiramente descrita em 1955, a xilanase foi reconhecida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961, quando se atribuiu a ela o número de classificação EC 3.2.1.8 e o nome endo-1,4-β-xilanase; no entanto, possui alguns sinônimos, como endoxilanase, 1,4-β-D-xilana xilanohidrolase, endo-1,4-β-D-xilanase, β-1,4-xilanase e

β-xilanase (COLLINS et al., 2005). Juntamente com as β-xilosidases, ela faz parte de um vasto grupo de enzimas envolvidas na produção de xilose, uma fonte primária de carbono para o metabolismo celular de diversos organismos (BIELY et al.,1995; PRADE, 1995; INTERNATIONAL..., 2012).

De modo geral, as xilanases microbianas são glicoproteínas monoméricas, com massa molecular que varia de 8 a 145 kDa (KULKARNI et al., 1999).

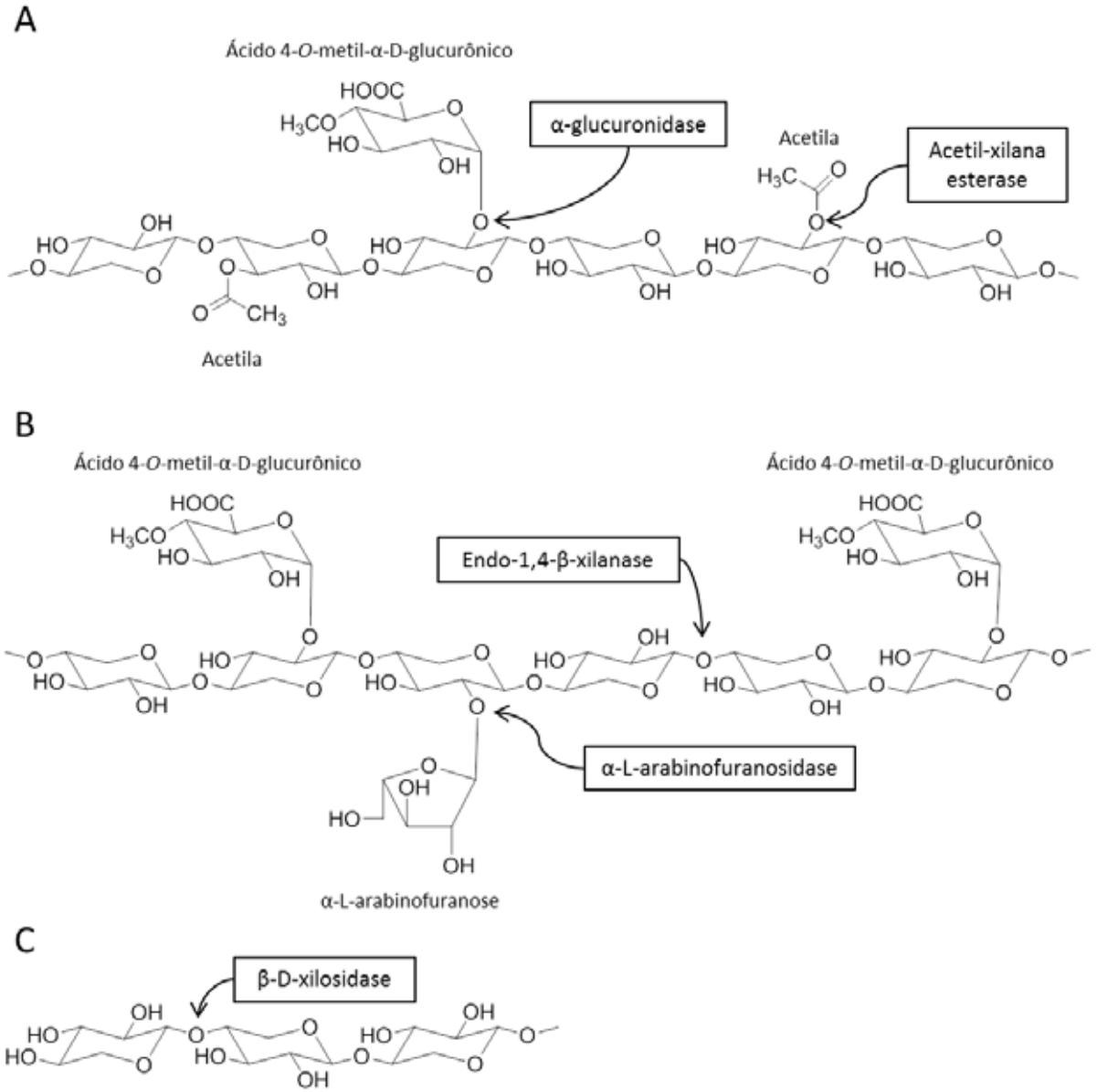

Figura 1 – Principais enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. Estrutura da *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana de madeira dura (A) e da arabino-4-*O*-metilglucuronoxilana de madeira mole (B). Hidrólise realizada pela β-xilosidase (C).

1.3 Principais aplicações das xilanases

As enzimas xilanolíticas de diversos microrganismos têm sido bastante estudadas na última década, sobretudo devido ao seu potencial biotecnológico em vários processos industriais. Na indústria de alimentos, podem ser utilizadas na clarificação de sucos e vinhos (BIELY et al.,1995); na fabricação de pães, visando a aumentar o volume e melhorar a textura da casca e miolo; e na etapa de filtração da cerveja, rompendo sólidos em suspensão (MUTSAERS, 1991).

A adição da xilanase termoestável de *Chaetomium* sp., na produção de pão, aumentou o volume em 20-24,5%, em relação ao controle, e diminuiu em 8,9-24,2% a rigidez do produto (JIANG et al., 2010). Qiu et al. (2010) utilizaram, na indústria de bebidas, a xilanase de *Streptomyces megasporus* expressa em *Pichia pastoris*, observando redução da taxa de filtração e da viscosidade em 36,33% e 35,51%, respectivamente.

Adicionadas à ração para aves e suínos, as xilanases aumentam a digestibilidade. Há, também, o interesse em utilizá-las para produção de xilose, xilobiose e xilooligômeros, que podem ser empregados como insumos para obtenção de xilitol ou ácido lático, por via fermentativa (WONG et al., 1988; PESSOA JUNIOR et al., 1997).

Na indústria, o sistema xilanolítico pode ser empregado de duas maneiras: a) livre de celulases; b) associado a polissacaridases. Como exemplo da primeira, tem-se o uso da β-xilanase na biopolpação, em indústrias de papel e celulose, e no processamento de fibras vegetais. Nesse caso, um sistema xilanolítico puro, ou seja, com ausência de celulases, torna tais processos mais eficientes, uma vez que a celulose é preservada (BIELY, 1995). A ação da xilanase, no tratamento das polpas celulósicas, auxilia a remoção da lignina que resta após cozimento e que lhes confere cor. Com esse tratamento adicional, a quantidade de produtos químicos alvejantes utilizados, como o cloro, pode ser diminuída, aumentando a qualidade do papel e reduzindo impactos ambientais (WONG, 1986; PURKARTHOFER et al., 1993). Como exemplo, ao ser aplicada no branqueamento, a xilanase de *Thermomyces lanuginosus* causou diminuição de 18,6% do número *kappa* (que define o grau de deslignificação) e aumento de 2,63% no brilho da polpa (BOKHARI et al., 2010). Ko et al. (2010) verificaram um aumento de 4,4% no brilho, utilizando xilanase de *Paenibacillus campinasensis*.

Demais usos dessas enzimas são citados na revisão de Beg et al. (2001): a) elas melhoram a eficiência de conversão alimentar e ganho de peso em frangos, devido à

redução da viscosidade intestinal causada pela incorporação de xilanases na dieta desses animais; b) auxiliam no tratamento de detritos agrícolas e industriais e resíduos hemicelulósicos, pela hidrólise da xilana; c) induzem a glicosilação e a acetilação graxa de fitoesteróis em células vegetais; d) melhoram a digestibilidade de forragens para ruminantes, além de facilitarem a compostagem; e) participam da produção de alquil glicosídeo, um promissor surfactante, por meio de processo de transglicosilação direta da xilana; f) aromatizam mostos, vinhos e sucos de frutas; g) junto com outras enzimas (manase, ligninase, glucanase, glicosidase, etc.), podem ser usadas para a geração de combustíveis biológicos, como etanol e xilitol, a partir de biomassa lignocelulósica; h) em conjunto com enzimas pectinolíticas, possuem potencial de aplicação na desengomagem de fibras, como linho, sisal, juta e rami.

Uma das possibilidades de produção de XOS para as diversas aplicações industriais é com o uso de resíduos agroindustriais. Teng et al. (2011) utilizaram fragmentos de diversos tamanhos de sabugo de milho e, após tratamento de explosão a vapor a 196°C, por cinco minutos, obtiveram uma solução contendo 22,8% de hemicelulose, que foi hidrolisada pela xilanase de *Paecilomyces themophila*. O resultado foi uma produção máxima de 28,6 g de xilooligossacarídeos por 100 g de xilana contida no sabugo de milho, com mais de 90% de xilobiose e xilotriose.

1.4 Xilooligossacarídeos como ingredientes prebióticos

Além das diferentes aplicações citadas, as xilanases vêm recebendo importante destaque na produção de XOS como potenciais ingredientes prebióticos. Embora não possuam aprovação para uso alimentício em grande parte dos países, os XOS são consumidos há pelo menos duas décadas na Ásia, sobretudo no Japão. Os prebióticos são alimentos funcionais, definidos como ingredientes seletivamente fermentescíveis, que permitem alterações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro (GIBSON et al., 2004). Por exemplo, as bifidobactérias intestinais são conhecidas por estimular o sistema imune, produzir vitamina B, inibir o crescimento de patógenos, reduzir os níveis sanguíneos de amônia e colesterol e auxiliar na restauração da flora normal, após terapia com antibióticos (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Diversos estudos são citados na revisão de Aachary e Prapulla (2011), e parece ainda haver certa controvérsia quanto ao uso de cada xilooligossacarídeo por diferentes microrganismos probióticos, assim como o mecanismo envolvido. No entanto, é consenso que os XOS favorecem o crescimento seletivo de bifidobactérias e somente de algumas espécies de *Lactobacillus* sp. A xilobiose, para fins alimentícios, é considerada um oligossacarídeo (VAZQUEZ et al., 2000).

Recentemente, Gullón et al. (2011) extraíram XOS, por auto-hidrólise, a partir de resíduos industriais sólidos contendo, principalmente, casca de cevada. Após a obtenção de misturas com diferentes médias de massas moleculares, essas preparações foram avaliadas, *in vitro*, pela fermentação de amostras inoculadas com microbiota fecal humana. A formação de produtos metabólicos (succinato, lactato, formiato, acetato, propionato e butirato) confirmou o potencial prebiótico dos concentrados.

A vantagem dos xilooligossacarídeos, se comparados com os fruto-oligossacarídeos (FOS), é que os XOS são mais estáveis em uma larga faixa de pH (2,5-8,0) e de temperatura (acima de 100°C). Além disso, possuem odor aceitável, não causam cáries e são de baixo valor calórico, o que permite seu uso em dietas visando à redução de peso corpóreo (VAZQUEZ et al., 2000).

Assim, os XOS poderiam ser adicionados a produtos alimentícios, como leite de soja, refrigerantes, produtos lácteos, bolos, balas, biscoitos, geleias ou, ainda, em preparações especiais para idosos ou crianças (AACHARY; PRAPULLA, 2011). O enriquecimento de iogurte com XOS em diferentes proporções foi estudado em análises físico-químicas e sensoriais (MUMTAZ et al., 2008). Os resultados mostraram que a adição de até 3,5% de XOS não influencia o sabor e a aceitabilidade do produto.

1.5 Fontes e produção de xilanases

As enzimas xilanolíticas, além de hidrolisarem a xilana, no processo de germinação de algumas sementes, são importantes na quebra da parede celular de vegetais, juntamente com demais enzimas que hidrolisam polissacarídeos. Elas podem ser encontradas em vegetais superiores, algas marinhas, protozoários, crustáceos, insetos, entre outros. Dentre as fontes microbianas, os fungos filamentosos são de maior interesse, por secretarem, no meio de cultura, a xilanase em níveis muito superiores àquelas provenientes de leveduras e

bactérias. Além disso, em bactérias, a maior parte das xilanases está restrita às frações intracelular e periplasmática e não sofre modificações, como a glicosilação (POLIZELI et al., 2005).

As xilanases são, geralmente, induzidas em meios contendo xilana ou resíduos ricos em xilana, mas também são descritas induções em L-sorbose, diversos xilooligossacarídeos, xilose e resíduos lignocelulósicos (BEG et al., 2001). Embora as xilanases possam ser produzidas industrialmente, em meios sólidos, a maior parte é obtida por cultivo submerso (POLIZELI et al., 2005).

Uma variedade de produtos vem sendo utilizada como fonte de carbono alternativa para a produção de xilanases por fungos, tais como o bagaço de cana-de-açúcar (MILAGRES et al., 2004; SILVA et al., 2005; SANDRIM et al., 2005; BOCCHINI et al., 2005), sabugo de milho (JIANG et al., 2010), grama (BOCCHINI et al., 2005; SILVA et al., 2005), farelo de trigo (CARMONA et al., 1998; GAWANDE; KAMAT, 1998; SILVA et al., 2005; GOULART et al., 2005; CHAPLA et al., 2010), resíduo de árvores (SILVA et al., 2005; MILAGRES et al., 2005), fibra de palmeira (LAKSHMI et al., 2009), água de maceração de milho (FANG et al., 2010), palha de arroz (KO et al., 2010), resíduo de laranja (SILVA et al., 2005; ALEXANDRINO et al., 2007), hemicelulose do grão de arroz (HARADA et al., 2008) e cevada (MANDALARI et al., 2008).

Silva et al. (2005) estudaram a produção de xilanase e carboximetilcelulase por *Thermoascus aurantiacus*, em fermentação semissólida, usando diferentes tipos de resíduos agrícolas (farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, sabugo de milho, palha de milho, grama verde, grama seca e serragem) como substrato, sem enriquecimento do meio. Os autores observaram que o fungo usado possuía maior atividade xilanolítica que celulolítica e que os maiores níveis de enzimas foram produzidos em sabugo e palha de milho e gramas verde e seca. A máxima atividade da xilanase foi em pH 5,0-5,5 e a 75°C.

Silva et al. (2005) estudaram a produção de enzimas hidrolíticas por nove cepas de cogumelos *Lentinula edodes,* cultivados em resíduos de madeira. A atividade da xilanase variou de 12958,3 a 16101,8 $U.kg^{-1}$ de substrato seco e houve boa correlação positiva entre o crescimento fúngico e a produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas.

A metodologia de superfície-resposta também vem sendo muito empregada para a otimização da produção de enzimas xilanolíticas (BOCCHINI et al.,2002; FARINAS et al., 2010; HE et al., 2010; SU et al., 2011).

Técnicas de cromatografia em coluna, sobretudo por troca iônica e exclusão molecular, são utilizadas nos protocolos de purificação da xilanase, embora outros métodos, como a cromatografia por interação hidrofóbica, sejam também reportados. Em muitos casos, o sobrenadante das culturas é inicialmente concentrado por meio de técnicas precipitantes ou de ultrafiltração (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

As xilanases comerciais são produzidas, por exemplo, no Japão, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Dinamarca, Canadá e Estados Unidos (POLIZELI et al., 2005). As cepas mais citadas para a produção industrial de xilanases incluem *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus, Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis* e *Streptomyces lividans* (BEG et al., 2001). Além dessas fontes, utilizam-se, também, *Aspergillus niger* e *Humicola insolens*. Entre os fungos mesófilos, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são preeminentes na produção de xilanase (POLIZELI et al., 2005).

1.6 Estabilidade de xilanases

Recentemente, pesquisas com o isolamento de microrganismos termófilos e extremófilos têm recebido especial atenção, uma vez que eles produzem enzimas mais estáveis, melhorando técnica e economicamente os processos industriais na hidrólise da xilana. De modo geral, as xilanases demonstram uma máxima atividade entre 40°C e 80°C, e pH entre 4,0 e 7,0 (KULKARNI et al., 1999; POLIZELI et al., 2005). Diversos estudos de purificação e caracterização da xilanase apresentaram valores ótimos de atividade em pH e temperaturas dentro dessa faixa (KANDA et al., 1985; MONTI et al., 1991; KESKAR, 1992; ALMEIDA et al., 1995; CARDOSO; FERREIRA FILHO, 2003; MEDEIROS et al., 2003; CARMONA et al., 2005; SANDRIM et al., 2005; MILAGRES et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2006; HARADA et al., 2008; WAKIYAMA et al., 2008; SHAH; GUPTA, 2008).

No entanto, têm sido reportadas xilanases estáveis e ativas em valores extremos de pH (2,0 a 11,0) e temperatura (5 a 105°C) (COLLINS et al., 2005). As xilanases de fungos costumam ser menos termoestáveis que as de bactérias, embora diversos fungos mesófilos produzam enzimas termoestáveis, como o *Ceratocystis paradoxa*, cuja xilanase é estável a 80°C, por uma hora (DEKKER; RICHARDS, 1975).

Os principais fungos termofílicos estudados incluem *Chaetomium thermophile, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Humicola grisea, Melanocarpus albomyces,*

Paecylomyces variotii, Talaromyces byssochlamydoides, Talaromyces emersonii, Thermomyces lanuginosus e *Thermoascus aurantiacus*. As xilanases desses fungos possuem temperaturas ótimas entre 60°C e 80°C, sendo muito estáveis nessa faixa. As enzimas mostraram atividade máxima em pH ácido (4,5-6,5) (POLIZELI et al., 2005).

Goulart et al. (2005) purificaram parcialmente e caracterizaram a xilanase de *Rhizopus stolonifer.* Foram obtidos dois valores de pH (6,0 e 9,0) em que a atividade da enzima foi máxima, sugerindo a presença de mais de uma xilanase na fração purificada. A enzima apresentou, também, uma temperatura ótima entre 40°C e 60°C. Tavares et al. (1997) estudaram uma linhagem alcalófila e termofílica de *Bacillus sp*, por possuir alta produção de xilanase livre de celulase. A enzima apresentou pH ótimo de 6,0 (com cerca de 70% da atividade em pH 9,0), temperatura ótima de 60°C e estabilidade em pH 5,0-10,0 e a 50°C. Sharma et al. (2010) produziram duas xilanases do fungo termofílico *Malbranchea flava,* com massa molecular de 25,2 e de 30 kDa. As enzimas obtidas foram mais ativas em pH 9,0 e a 60°C, com meia-vida de quatro horas a essa temperatura. Essas xilanases são importantes e desejáveis em diversos processos industriais que requerem altas temperaturas, como o branqueamento da polpa *kraft*.

Wakiyama et al. (2010) purificaram uma endo-1,4-β-xilanase extracelular, com atividade específica de 566 U mg^{-1}, do filtrado da cultura do fungo filamentoso *Aspergillus japonicus*, crescido em xilana (*oat spelt*). A enzima apresentou uma massa molecular aparente de 25,1 kDa e máxima atividade em pH 5,0 e a 60°C. A proteína demonstrou uma identidade de 69% com a xilanase produzida por *Aspergillus niger*.

Jiang et al. (2010) isolaram uma nova xilanase termofílica de *Chaetomium* sp., que apresentou atividade de 131 $U.ml^{-1}$ quando crescido em meio contendo 3,5% de sabugo de milho, a 37°C, por seis dias. A massa molecular estimada foi de 25,1 kDa, e a máxima atividade ocorreu em pH 7,5 e a 65°C.

Diversos estudos com xilanases vêm sendo feitos no campo da engenharia genética, visando a uma maior produção de enzimas mais estáveis. Qiu et al. (2010) realizaram uma expressão gênica de xilanase de *Streptomyces megasporus* em *Pichia pastoris*. A enzima apresentou máxima atividade em pH 5,5 e a 70°C, com boa estabilidade a 60-70°C e em pH 4,0-11,0. Os produtos de hidrólise foram, principalmente, xilose e xilobiose.

Kim et al. (2010) clonaram o gene de uma xilanase de *Streptomyces thermocarboxydus*, obtendo a enzima com massa molecular de 43,96 kDa e máxima atividade em pH 6,0 e a 55°C.

O gene responsável pela produção de xilanase por *Paecilomyces thermophila* foi isolado e expresso em *Escherichia coli* BL21. A enzima purificada foi mais ativa em pH 7,0 e a 75°C (ZHANG et al., 2010).

Um gene híbrido de xilanase foi expresso em *Pichia pastoris* por Jun et al. (2009). A enzima obtida possuiu massa molecular de 26 kDa e não apresentou atividade de celulases. A atividade ótima foi em pH 6,0 e a 65°C, sendo estável a 60°C, retendo 85% da atividade, por meia hora, nessa temperatura. O principal produto da hidrólise pela enzima foi xilotriose.

Uma xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* reteve 10% de sua atividade após 10 minutos a 100°C, mantendo-se estável na faixa de pH entre 6,0 e 10,0 (GAFFNEY et al., 2009).

Squina et al. (2009) realizaram expressão heteróloga de xilanase de *Aspergillus clavatus* em *Aspergillus awamori*. O produto de hidrólise consistiu, basicamente, de xilobiose, xilotriose e xilotetraose, sendo de particular interesse para a produção de xilooligossacarídeos, visando a benefícios para a microflora intestinal humana.

Bokhari et al. (2010) produziram uma xilanase de *Thermomyces lanuginosus* selvagem e uma variação mutante, em diferentes substratos. Maiores níveis de xilanase foram obtidos em meio contendo sabugo de milho e água de maceração de milho. Entre os substratos solúveis, a xilose foi a melhor indutora e, na presença de glicose, houve produção de 26 U de xilanase por grama de glicose pela cepa selvagem e 224 U pela mutante.

1.7 Uso das enzimas em indústrias

Em 2004, a demanda global por enzimas industriais foi de 2,5 bilhões de dólares, com um crescimento anual de 5-10%. EUA, Europa e Japão são responsáveis por mais de 90% das vendas mundiais, conforme ilustrado na Figura 2 (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008).

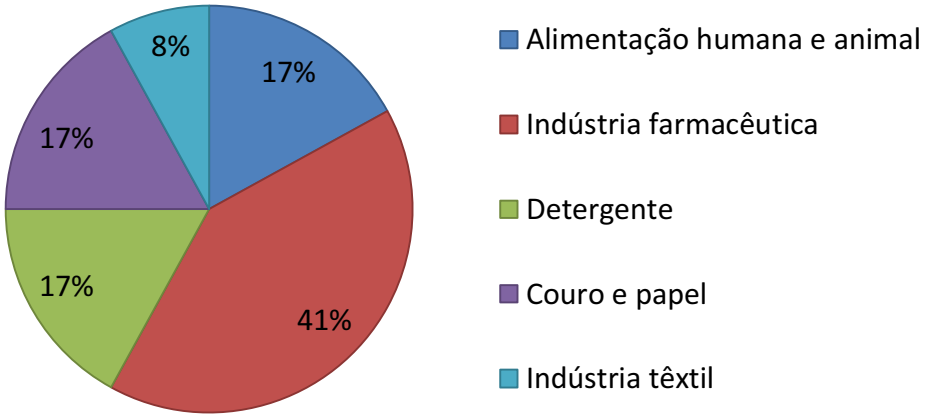

Figura 2 – Vendas mundiais das principais enzimas por diversos setores da indústria. Fonte: Iyer; Ananthanarayan, 2008 (adaptado e traduzido).

Comparados com os processos químicos convencionais, esses biocatalisadores operam em condições mais suaves, produzindo menor quantidade de resíduos tóxicos, de emissões e de subprodutos. Em virtude de sua seletividade, as enzimas diminuem a necessidade de purificação do produto, reduzindo-se, assim, a demanda de energia e o impacto ambiental (GAVRILESCU; CHISTI, 2005). No caso da produção de XOS, há, ainda, a conveniência de se minimizar a produção do monossacarídeo, além de ser desnecessário o uso de equipamentos especiais (AACHARY; PRAPULLA, 2011).

Embora possuam diversas vantagens, as enzimas são solúveis e, geralmente, muito instáveis fora de estreitas faixas de temperatura e pH; sofrem inibição por substratos e produtos e, muitas vezes, não possuem seletividade quando se objetiva a catálise em condições experimentais não convencionais.

As reações, nas indústrias, são, às vezes, realizadas sob diversas condições, como altas temperatura e pressão, pH extremo e ambientes não aquosos. Aumento da temperatura, alterações de pH ou uso de solventes orgânicos podem apresentar vantagens devido à redução do risco de contaminação, à diminuição da viscosidade e ao aumento da solubilidade do substrato e da taxa de transferência de massa. Essas condições podem, também, aumentar a velocidade de formação do produto e/ou diminuir subprodutos indesejáveis (LISZKA et al., 2012).

Pelos diversos fatores citados, em diversos processos, o uso de altas temperaturas em reações enzimáticas é de fundamental importância nas indústrias farmacêuticas e

alimentícias (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008). No entanto, as condições extremas de reação tornam-se, muitas vezes, inadequadas para as enzimas, que podem se desnaturar.

Desnaturação é o desdobramento da estrutura terciária da enzima em um polipeptídeo desordenado no qual os resíduos-chave não se encontram mais alinhados e nem próximos o suficiente para participar das interações funcionais ou estruturais de estabilização (Figura 3). Após o desdobramento de sua estrutura tridimensional, a proteína está sujeita a diversas alterações químicas, levando à perda irreversível de atividade, ou seja, tornando-se inativa (FÁGÁIN, 1995).

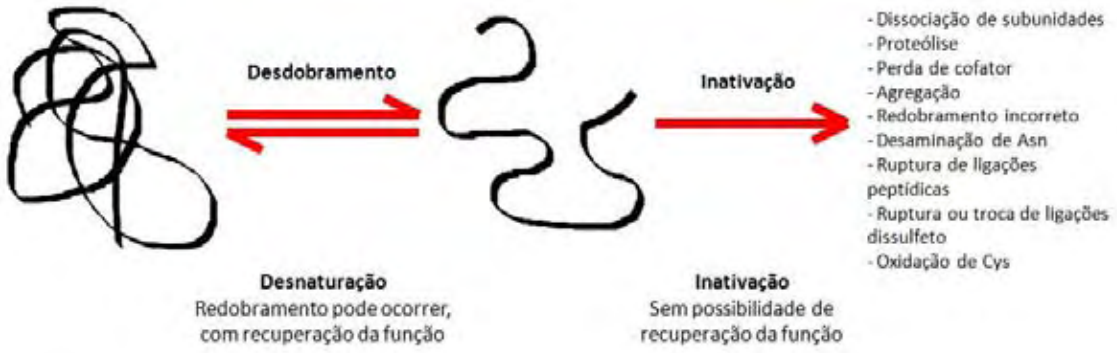

Figura 3 – Eventos moleculares que levam à perda da estrutura e da função de uma proteína. Diferença entre desnaturação e inativação. Fonte: Fágáin, 1995 (adaptado e traduzido).

A estabilidade de uma enzima é afetada por muitos fatores, como temperatura, pH, estresse oxidativo, solventes, ligação de íons metálicos ou cofatores, presença de surfactantes, etc. É comprovado que, salvo exceções, as enzimas com alta estabilidade térmica também se tornam mais resistentes a outros fatores desnaturantes (EIJSINK et al., 2005).

A termoestabilidade é resultado de pequenas diferenças em sequências específicas de aminoácidos, que conferem uma conformação mais rígida e um maior número de resíduos hidrofóbicos (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008).

O estudo de métodos que forneçam às enzimas a capacidade de catalisar reações em condições não usuais é de grande interesse para o desenvolvimento dos processos industriais (LISZKA et al., 2012). Com esse intuito, há três linhas de pesquisa: 1) triagem e isolamento de enzimas de termófilos; 2) produção de enzimas estáveis em organismos mesófilos geneticamente modificados; 3) estabilização por métodos de engenharia proteica

(evolução dirigida), modificação química, uso de aditivos ou por imobilização (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008).

Os microrganismos termofílicos têm, geralmente, pequeno genoma referente ao ambiente, o que limita o número de enzimas a serem produzidas por engenharia genética. Além disso, a expressão de uma dessas proteínas, em um hospedeiro diferente pode ter a estabilidade e a atividade diminuídas (LISZKA et al., 2012).

Assim, a imobilização em suportes sólidos talvez seja a estratégia preferida e mais utilizada para melhorar a estabilidade de biocatalisadores, o controle operacional, a fácil recuperação do produto (sem a contaminação do catalisador) e a flexibilidade para desenhar novos reatores. Com a imobilização, a estabilidade térmica resulta, sobretudo, do enrijecimento molecular causado pela ligação da enzima ao suporte sólido e pela criação de um microambiente protegido (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008). Consequentemente, a estabilização da estrutura tridimensional da proteína oferece uma proteção contra o desdobramento causado por agentes desnaturantes, como a temperatura, o pH e a presença de dissolventes orgânicos.

1.8 Imobilização de enzimas

Para aplicações práticas, a imobilização de microrganismos ou enzimas em materiais sólidos oferece muitas vantagens, entre as quais o reúso da enzima, a fácil separação do produto e o aumento da estabilidade enzimática (BEG et al., 2001). O termo “enzimas imobilizadas” refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em determinada região de espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizadas repetida e continuamente (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006).

O suporte ideal para imobilização deve: possuir hidrofilicidade e resistência física à compressão; ser de fácil derivação; ser biocompatível; oferecer resistência ao ataque microbiano; apresentar baixo custo. As enzimas podem ser ligadas a um suporte (orgânico ou inorgânico) por interações que vão desde uma adsorção física ou ligações iônicas reversíveis até as estáveis ligações covalentes. Os métodos de imobilização enzimática podem ser classificados em reversíveis (Figura 4) e irreversíveis (Figura 5) (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006).

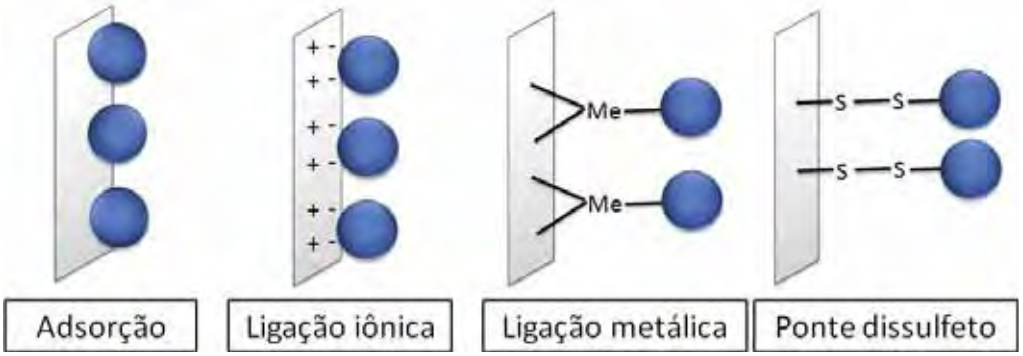

Figura 4 – Métodos reversíveis de imobilização enzimática.

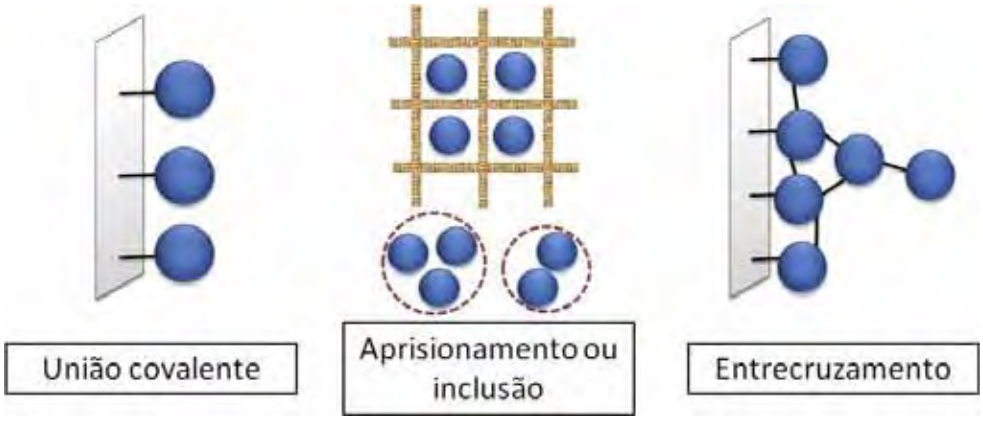

Figura 5 – Métodos irreversíveis de imobilização enzimática.

Uma matriz muito utilizada é a agarose, um polímero natural extraído do ágar de algas vermelhas (Figura 6). Suas fibras são constituídas, basicamente, de unidades repetidas de agarobiose (D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose), cujas hidroxilas serão transformadas, por meio de reações químicas, em grupos ativos, onde se ligarão as enzimas a serem imobilizadas (GUISÁN et al., 1997).

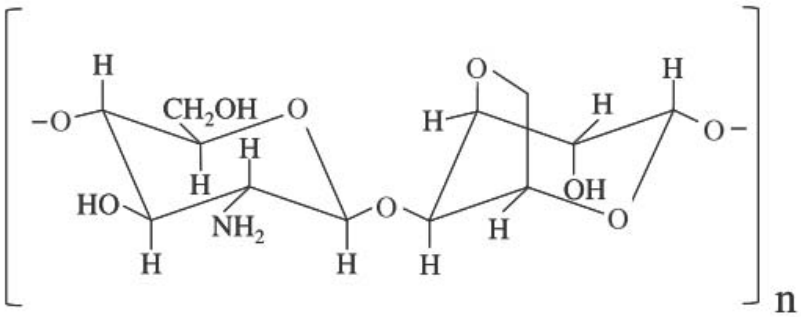

Figura 6 – Estrutura química básica da agarose, formada por repetidas unidades de agarobiose. Fonte: Sassolas et al., 2012.

Além de ser atóxica e possuir alta porosidade, a agarose apresenta outras vantagens: caráter hidrofílico, facilidade de manuseio, ausência de grupos com cargas (o que previne a adsorção não específica do substrato e do produto) e disponibilidade comercial. No entanto, uma limitação do uso da agarose e demais suportes porosos é o alto custo, o que pode ser compensado com o emprego de métodos reversíveis de imobilização, permitindo a regeneração da matriz e sua reutilização (GUISÁN et al., 1997; BRENA; BATISTA-VIERA, 2006).

Dentre os suportes preparados a partir do gel de agarose, está o glioxil-agarose, obtido pela transformação dos grupamentos hidroxilas da agarose em grupos gliceril, sendo logo levados a glioxil (GUISÁN et al., 1997).

Esse suporte (pequenos grupos aldeídos alifáticos) orienta a imobilização da enzima por meio de sua área de superfície que contém maior densidade de grupamentos amino, incluindo-se o amino-terminal da molécula e os grupamentos ε-amino das cadeias laterais das lisinas. Em condições amenas de pH, durante o processo de imobilização, são estabelecidas, preferencialmente, as ligações com os grupos amino-terminal, enquanto que condições de altos valores de pH (10,0-10,2) possibilitam que os grupamentos amino das lisinas estejam reativos (Figura 7) e se estabeleçam ligações entre esses resíduos de aminoácidos e o suporte (GUISÁN et al., 1997).

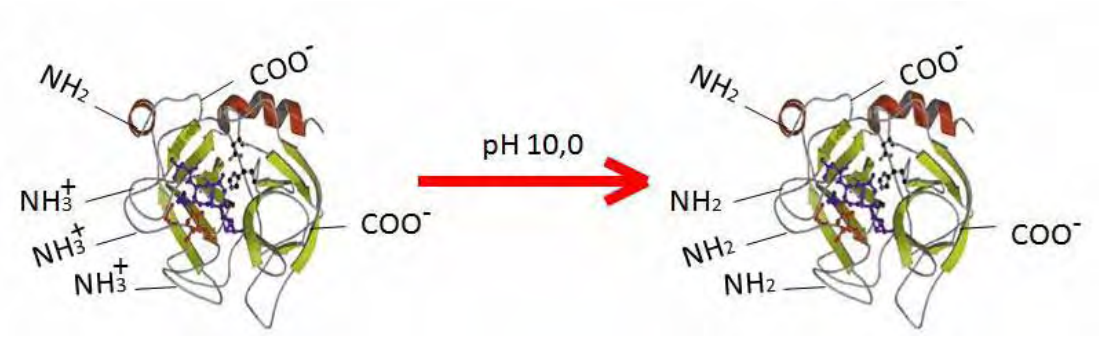

Figura 7 – Desprotonação dos grupos ε-amino das lisinas, após incubação em pH 10,0. Em pH 8,0-9,0, apenas o grupamento amino-terminal encontra-se reativo.

Suportes de glioxil são descritos como um sistema bastante adequado para imobilização por ligação covalente multipontual (Figura 8). Dezenas de outras enzimas têm sido imobilizadas e bem estabilizadas nesse tipo de suporte, como penicilina G acilase de *Escherichia coli* e *Kluyvera citrophila*, tripsina, quimiotripsina, alcalase, carboxipeptidase A,

ferredoxina-NADP redutase, esterase, termolisina, D-aminoácido oxidase, catalases, lipases de diferentes fontes, uroquinase, L-aminoacilase, e quitosanase (MATEO et al., 2005).

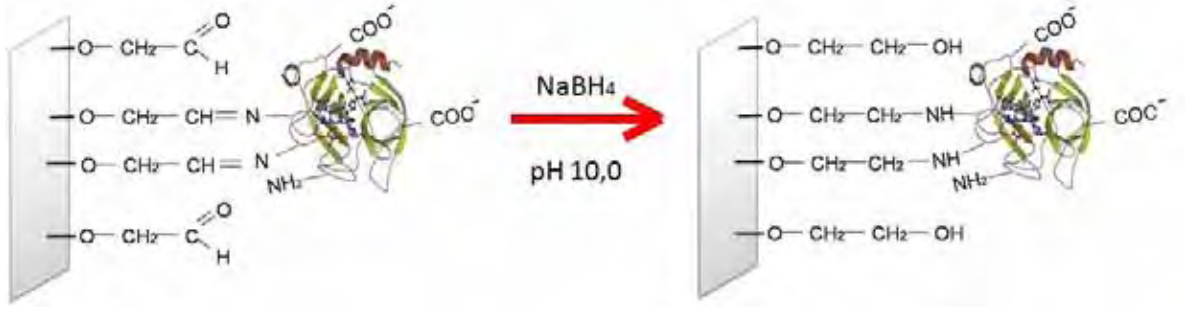

Figura 8 – Ilustração de uma enzima hipotética, imobilizada em glioxil-agarose. A redução com boroidreto de sódio torna irreversíveis as ligações imino formadas entre enzima e suporte.

No caso de a enzima a ser imobilizada possuir baixa quantidade de lisina em sua superfície, pode-se aminar a proteína, previamente ao processo de imobilização. Tardioli et al. (2010) modificaram os grupos carboxílicos de uma glicoamilase com uso de cabodiimida e etilenodiamina, e a enzima aminada imobilizou-se rapidamente em suporte glioxil-agarose, originando derivados 500 vezes mais estáveis que a enzima solúvel.

Os suportes ativados com grupos epóxidos possuem as seguintes vantagens: são fornecidos já em suas formas ativadas; são estáveis durante armazenamento; permitem imobilização em longos períodos; reagem com diferentes grupos das enzimas — amino, tiol, fenol, imidazol — e em condições suaves (pH 7,0, por exemplo), promovendo muito poucas modificações químicas na proteína. Entre os diversos suportes que podem ser ativados com esses grupos, destacam-se o Eupergit C, o Eupergit 250 e o Sepabeads. Por meio desses suportes, é possível obterem-se suportes heterofuncionais, ou seja, contendo dois tipos de grupos funcionais reativos: a) um que seja capaz de promover uma adsorção física da proteína (por exemplo, por troca iônica ou por adsorção metal-quelato); b) os grupos epóxidos, capazes de formar ligações covalentes com as enzimas (MATEO et al., 2007). Também com a finalidade de se imobilizarem enzimas em duas etapas, a agarose pode ser ativada com epicloridrina, em condições alcalinas, para a obtenção de suportes glioxil heterofuncionais (MATEO et al., 2010).

Mais recentemente, foi proposto o direcionamento da imobilização por uma região específica da proteína, com modificação genética de sua superfície. Grazú et al. (2010) introduziram resíduos de cisteína em seis diferentes regiões ricas em lisina de uma penicilina

G-acilase de *E. coli*. Um dos derivados obtidos preservou mais de 90% da atividade inicial, foi 30 vezes mais estável que a enzima solúvel e apresentou melhora na enantiosseletividade na hidrólise de ésteres quirais.

Em se tratando de imobilização de xilanases, os estudos são poucos até então, quando comparados aos de demais enzimas. No entanto, a partir da última década, diversos métodos vêm sendo estudados com o intuito de se aumentarem a estabilidade e a possibilidade de reutilizações da enzima (Tabela 1). Ainda assim, nota-se que baixos fatores de estabilização foram obtidos, o que demonstra tratar-se de uma área a ser explorada em busca de melhores catalisadores para as possíveis aplicações industriais da xilanase.

Tabela 1 – Principais trabalhos de imobilização de xilanases reportados na literatura

Fonte de xilanase	Suporte	AR [a] (%)	RI [b] (%)	FE [c]	Ciclos de reúso[d]	Referências
Armillaria gemina	Nanopartículas de óxido de silício ativadas com glutaraldeído	117	69,2	4	17 (92%)	Dhiman et al., 2012
Aspergillus niger	Eudragit L-100	55	93	<4	nd	Sardar et al., 2000
Aspergillus niger	Quitosana com dialdeído de amido	61	nd	3	nd	Chen et al., 2010
Aspergillus niger	Esferas de alginato com glutaraldeído	90	95	2,35	5 (>85%)	Pal; Khanum, 2011
***Aspergillus niveus* (expressa em *Aspergillus nidulans*)**	Glioxil-agarose	83	100	8,5	nd	Damásio et al., 2011
***Aspergillus* sp. linhagem 44**	Eudragit S-100	80	100	2,5	3 (100%)	Gawande; Kamat, 1998
***Aspergillus* sp. linhagem 5**	Eudragit S-100	70	99	2	nd	Gawande; Kamat, 1998
Aspergillus tamarii	Duolite A147 pré-tratado com glutaraldeído	54	nd	1,3	8 (73%)	Gouda; Abdel-Naby, 2002
Aspergillus terreus	Esferas de vidro poroso ativado com 3-aminopropil-trietoxisilano	100	nd	nd	nd	Rogalski et al., 1985
Bacillus pumilus	Q-Sefarose	45	16	nd	7 (70%)	Kapoor; Kuhad, 2007
Bacillus pumilus	Esferas HP-20	42	18	nd	7 (70%)	Kapoor; Kuhad 2007
Bacillus pumilus	*Pellets* de óxido de alumínio ativado com glutaraldeído	62	84	1,2	10 (60%)	Nagar et al., 2012
Neocallimastix patriciarum	Corpos oleosos de semente vegetal	nd	nd	nd	4 (100%)	Liu et al., 1997
***Neocallimastix patriciarum* (expressa em *E. coli*)**	Corpos oleosos artificiais	nd	nd	nd	8 (60%)	Hung et al., 2008
NS50014 (Novozymes)	Epóxi-quitosana	64	100	1,3	nd	Manrich et al., 2010
NS50014 (Novozymes)	Glioxil-agarose	67	60	0,9	nd	Manrich et al., 2010
NS50014 (Novozymes)	Glioxil-agarose (enzima aminada)	nd	100	40	nd	Manrich et al., 2010
Pectinex Ultra SP-L (Novo Nordisk)	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	41	42	nd	nd	Shah; Gupta, 2008
Pholiota adiposa	Nanopartículas de óxido de silício ativadas com glutaraldeído	144	66	nd	17 (97%)	Dhiman et al., 2012
Pulpzyme HC (Novo-Nordisk)	Membranas de acetato de celulose	nd	nd	nd	7 (<50%)	Sarbu et al., 2006

Tabela 1 – Principais trabalhos de imobilização de xilanases reportados na literatura (continuação)

Fonte de xilanase	Suporte	AR [a] (%)	RI [b] (%)	FE [c]	Ciclos de reúso[d]	Referências
Streptomyces olivaceoviridis	Eudragit S-100	92	nd	1,6	4 (81%)	Ai et al., 2005
Talaromyces thermophilus	Gelatina com glutaraldeído	99	99	1,5	13 (94%)	Maalej-Achouri et al., 2009
Thermomyces lanuginosus	Eudragit S-100	75	100	2	6 (62%)	Edward et al., 2002
Thermomyces lanuginosus	Ouro nanoporoso	78	nd	nd	10 (60%)	Yan et al., 2012
***Thermotoga maritima* (recombinante)**	Eupergit C 250L com metal-quelato	95	76	nd	nd	Li et al., 2007
***Thermotoga maritima* (XynB)**	Eupergit C com Ni-quelato	nd	nd	nd	10 (92,5%)	Tan et al., 2008
***Thermotoga* sp.**	Esferas de vidro poroso	nd	nd	nd	nd	Simpson et al., 1991
Trichoderma reesei	Membranas de polissulfona com grupos acrilato	nd	nd	nd	nd	Cano et al., 2006
Trichoderma reesei	Eudragit L-100	59	nd	nd	nd	Xu et al., 2011
Trichoderma viride	Hidrogel de quitosana-xantana	92	nd	nd	nd	Dumitriu; Chornet, 1997
Trichoderma viride	Suporte polimérico curado com UV	nd	nd	nd	32 (75%)	Akdemir et al., 2011

[a]Atividade recuperada: razão entre a atividade do derivado obtido e a atividade enzimática oferecida ao suporte; [b]Rendimento de imobilização: porcentagem da enzima oferecida que se ligou ao suporte; [c]Fator de estabilização: razão entre os tempos de meia-vida do derivado e do controle, em determinada temperatura; [d]Valores de reúso entre parênteses representam a atividade residual observada ao final dos ciclos realizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi imobilizar e estabilizar xilanases microbianas, por método covalente multipontual.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- produzir, caracterizar e purificar a enzima xilanase de *Aspergillus niger*;

- produzir a xilanase de *Aspergillus versicolor*;

- purificar parcialmente a xilanase comercial de *Trichoderma longibrachiatum;*

- imobilizar covalentemente e de forma multipontual, em suportes sólidos, as xilanases de *Aspergillus niger, Aspergillus versicolor*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Streptomyces halstedii*;

- caracterizar os derivados, de acordo com os parâmetros de atividade e estabilidade térmica;

- analisar os produtos de hidrólise das xilanas *beechwood* ou *birchwood*, obtidos pelos melhores derivados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Para este estudo, foram utilizadas enzimas xilanases obtidas de diferentes fontes, quatro fúngicas e uma bacteriana.

3.2 Fontes de xilanase

O fungo *Aspergillus niger* foi isolado no laboratório de Enzimologia (Departamento de Alimentos e Nutrição – FCFAr – UNESP de Araraquara), de um fruto de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) em decomposição. Duas xilanases comerciais, produzidas por *Trichoderma longibrachiatum* e *Thermomyces lanuginosus*, foram obtidas da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Uma cepa do fungo *Aspergillus versicolor* foi gentilmente cedida pela Prof.ª Dr.ª Sandra Helena da Cruz (ESALQ, Universidade de São Paulo). A xilanase recombinante de *Streptomyces halstedii*, expressa em *Streptomyces lividans*, foi produzida e fornecida pelo grupo do Dr. Ramón Santamaría, do *Consejo Superior de Investigaciónes Científicas* (CSIC), de Salamanca, Espanha.

3.3 Produção de xilanase de *Aspergillus niger*

As culturas foram mantidas a 37°C, em tubos de ensaio contendo meio inclinado de 2% (m/v) de ágar e 4% (m/v) de farinha de aveia (Quaker®). Após quatro dias de crescimento, o microrganismo foi guardado em geladeira (4°C). Em seguida, aos tubos de cultura foram adicionados 10 ml de água estéril; um volume de 2 ml da suspensão (aproximadamente 5 x 10^7 células.ml^{-1}) foi então transferido para um erlenmeyer contendo 50 ml de meio líquido com pó de sabugo de milho. Em determinados momentos, utilizaram-se também, como fonte de carbono, xilana (*oat spelt*), glicose, xilose, avicel, carboximetilcelulose ou papel.

O meio líquido utilizado foi o descrito por Benedetti (2009), composto por 0,1% (m/v) de $CaCO_3$, 0,5% (m/v) de NaCl, 0,1% (m/v) de NH_4Cl, 0,5% (m/v) de água de maceração de milho e 1% (m/v) de fonte de carbono, em pH 6,0. Após a esterilização — a 120°C, por 15

minutos —, o meio foi inoculado e incubado a 37°C, com agitação constante a 140 rpm, em uma mesa incubadora de movimento linear.

Após 18 horas, os micélios resultantes das culturas foram colhidos, por filtração, em funil de separação com papel de filtro e auxílio de uma bomba de vácuo. O filtrado (meio de cultura livre de células) foi usado como preparação de enzimas extracelulares.

O extrato bruto, produzido por *A. niger*, foi deixado em contato com caulim a 4% (m/v), por 30 minutos e a 4°C, quando foi filtrado, sob vácuo, para obtenção de um extrato mais puro. Em seguida, o extrato foi liofilizado.

3.4 Produção de xilanase de *Aspergillus versicolor*

As culturas de *Aspergillus versicolor* cresceram em um meio contendo 2% (m/v) de ágar, 2% (m/v) de sacarose, 2% (v/v) de sais de Vogel (Vogel, 1956) e 0,006% (v/v) de uma solução de biotina a 5% (m/v) em etanol a 50% (v/v), a 25°C, por cinco dias, de acordo com Andrade (2002).

A cada tubo de cultura, foram adicionados 10 ml de água estéril; 2 ml dessa suspensão (contendo aproximadamente 5 x 10^7 esporos.ml^{-1}) foram inoculados em 50 ml de meio líquido de Vogel (Vogel, 1956) contendo 1% (m/v) de xilana (*oat spelt*). Em seguida, o meio foi incubado a 25°C, com agitação a 140 rpm, por três dias. O extrato bruto foi filtrado em papel e centrifugado a 7400*g*, a 4°C, por 20 minutos.

3.5 Produção de xilanase de *Streptomyces halstedii JM8*

A cepa de *S. halstedii* JM8, aqui utilizada, foi originalmente isolada de resíduos agrícolas, verificando-se a produção de uma xilanase extracelular de 45 kDa (Xys1 L), contendo um domínio catalítico e um de ligação à celulose. As proteases extracelulares do tipo serínica clivam a xilanase na região carbóxi-terminal, liberando o domínio catalítico (Xys1S, de 33,7 kDa), que exibe a mesma atividade sobre a xilana que a proteína completa (RUIZ-ARRIBAS et al., 1995). Um códon que codifica o primeiro de uma sequência de resíduos de glicina foi substituído por outro de terminação, causando a remoção de uma região rica em glicina, localizada no grupo carboxílico terminal da Xys1S, originando uma proteína de 32,6 kDa (RUIZ-ARRIBAS et al., 1998). Esta proteína foi, então, modificada com

cauda de seis resíduos de histidina, na região carbóxi-terminal. *Streptomyces lividans* JI66 foi utilizado como hospedeiro para a produção de xilanase, realizada em meio YES, contendo 1% (m/v) de extrato de levedura, 10,3% (m/v) de sacarose, e 5 $mmol.l^{-1}$ de cloreto de magnésio, em pH 7,2, suplementado com 1% (m/v) de xilose e 10 $\mu g.ml^{-1}$ de neomicina. O cultivo foi feito em frascos de 500 ml contendo 150 ml de meio, a 28°C, com agitação de 200 rpm. O sobrenadante, obtido após seis dias de crescimento, foi utilizado como fonte da enzima xilanase (DÍAZ et al., 2004).

3.6 Purificacão da enzima recombinante de *Streptomyces halstedii JM8*

Para a purificação da enzima, a agarose 6 CL foi ativada com IDA-Ni, contendo 10 µmol de grupos quelatos por ml de gel agarose, de acordo com método proposto por Armisén et al. (1999). O extrato bruto de xilanase foi diluído dez vezes, em tampão fosfato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, contendo 150 $mmol.l^{-1}$ de NaCl e 20 $mmol.l^{-1}$ de imidazol, em pH 7,0. O NaCl foi adicionado para prevenir interações iônicas entre as proteínas não recombinantes e o suporte, e o imidazol, para minimizar a adsorção dessas proteínas ao suporte. Assim, 50 ml dessa solução (contendo 0,8 mg de proteína por ml) foram adicionados a 1 ml de suporte, a 25°C, sob constante e suave agitação. Depois de a enzima ser completamente adsorvida ao suporte (aproximadamente uma hora), o derivado foi recuperado por filtração e lavado com 50 ml de tampão fosfato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 7,0, contendo imidazol 50 $mmol.l^{-1}$ e NaCl 150 $mmol.l^{-1}$. Finalmente, a dessorção da xilanase foi realizada com incubação do suporte em 50 ml de tampão fosfato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 7,0, contendo 100 $mmol.l^{-1}$ de imidazol e 150 $mmol.l^{-1}$ de NaCl, por 30 minutos.

3.7 Dosagem de proteína

As proteínas foram quantificadas de acordo com método desenvolvido por Lowry (1951), modificado por Hartree (1972). Nos estudos de imobilização das enzimas, utilizou-se o método de Bradford (1976). Em ambos os casos, usou-se soroalbumina bovina como padrão.

3.8 Atividade xilanolítica

A atividade da xilanase foi medida com base no aparecimento de açúcares redutores (xilooligossacarídeos), após a hidrólise de xilana *birchwood* ou *beechwood* (Sigma-Aldrich), de acordo com metodologia de Miller (1959).

Uma mistura de 4% (m/v) de xilana *birchwood* ou *beechwood*, em tampão acetato de sódio 100 $mmol.l^{-1}$ e em pH 5,0, foi agitada por duas horas, a 25°C, e centrifugada por 30 minutos, a 5000*g*. Após liofilização da parte solúvel, assumiu-se que 50% de ambos os substratos se solubilizaram, nestas condições. A fração solúvel foi diluída cinco vezes no mesmo tampão e utilizada como substrato para a determinação da atividade enzimática.

A um volume de 0,9 ml de substrato adicionou-se 0,1 ml de solução enzimática, convenientemente diluída. A reação foi conduzida a 25°C, com agitação constante, durante dez minutos, quando se acrescentou 1 ml do reagente alcalino DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), para detecção do produto. Após fervura por cinco minutos, fez-se a leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm. A curva de calibração, com uso de xilose, permitiu a obtenção de um coeficiente de extinção molar igual a 240 $mol^{-1}.l.cm^{-1}$. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de açúcar redutor (AR) por minuto. Obteve-se a atividade específica pela razão das unidades totais de enzima (U) por miligramas de proteínas.

3.9 Efeito da adição de íons sobre a atividade da xilanase de *Aspergillus niger*

Para a verificação do efeito de íons sobre a atividade da xilanase, o extrato concentrado foi diluído em tampão acetato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 5,0, contendo os diferentes sais — AgCl, $CuCl_2$, NH_4Cl, $ZnSO_4$, KCl, $FeCl_3$, $BaCl_2$, $MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$ e $HgCl_2$ — nas concentrações de 1 $mmol.l^{-1}$ e 5 $mmol.l^{-1}$ O controle não sofreu adição de nenhum íon. A atividade foi medida como descrito no item 3.8.

3.10 Estabilidade frente a diferentes valores de pH

Os extratos de xilanase e os derivados foram incubados em diferentes valores de pH (3,0-9,0). Em determinados tempos, retiraram-se amostras para o ensaio de atividade

enzimática. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio 100 mmol.l^{-1} (pH 4,0-5,0), fosfato de sódio 100 mmol.l^{-1} (pH 6,0-8,0), bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1} (pH 9,0-10,0) e borato de sódio 100 mmol.l^{-1} (pH 11,0).

3.11 Determinação do pH ótimo

A determinação do pH ótimo da enzima livre e dos derivados foi realizada em diferentes valores de pH. Para esse fim, utilizaram-se tampões acetato de sódio 100 mmol.l^{-1} (pH 4,0-5,0), fosfato de sódio 100 mmol.l^{-1} (pH 6,0-8,0), bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1} (pH 9,0-10,0) e borato de sódio 100 mmol.l^{-1} (pH 11,0). A atividade foi medida como descrito no item 3.8.

3.12 Determinação da temperatura ótima

As enzimas solúveis e os derivados foram submetidos à reação em diversas temperaturas, em tampão acetato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 5,0. A atividade foi medida como descrito no item 3.8. O valor da energia de ativação (EA) foi calculado pela regressão linear da curva obtida no gráfico de Arrhenius.

3.13 Estabilidade térmica

A xilanase de *Aspergillus niger* foi incubada por uma hora, em tampão acetato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 5,0, em temperaturas entre 25 e 90°C, sendo, em seguida, submetida ao ensaio enzimático, conforme descrito no item 3.8.

3.14 Inativação térmica

As enzimas livres e os derivados foram incubados em diferentes valores de pH e de temperatura, em solução tampão acetato de sódio 100 mmol.l^{-1}, fosfato de sódio 100 mmol.l^{-1} ou, ainda, bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}. Em determinados tempos, uma amostra foi retirada, e a atividade, verificada, conforme descrito no item 3.8. A atividade residual foi calculada pela razão entre a atividade em um dado tempo e a atividade no início

da incubação. O fator de estabilização foi definido pela razão entre o tempo de meia-vida do derivado em questão e o do controle.

3.15 Determinação de K_m e V_{max} aparentes

A xilanase de *Aspergillus niger* foi ensaiada em concentrações de xilana *birchwood* de 1 a 20 $mg.ml^{-1}$ de tampão acetato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 5,0. Os valores de K_m e V_{max} foram estimados após a elaboração de gráficos de Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf.

3.16 Preparo dos suportes de imobilização

Os suportes carboximetil-sepharose *fast flow* (CM-sepharose), dietilaminoetil-sepharose *fast flow* (DEAE-sepharose), Q-sepharose *fast flow*, Sulfopropil-sepharose *fast flow* (SP-sepharose) e sepharose 4 CL ativada com brometo de cianogênio (CNBr-sepharose) foram adquiridos da GE Healthcare Life Sciences® (Uppsala, Suécia).

3.16.1 Glioxil-agarose

As agaroses (4, 6 ou 10 CL) foram ativadas com diferentes concentrações de grupos aldeídos por grama de suporte, de acordo com metodologia descrita por Guisán (1988).

Suspenderam-se 105 g de agarose em água, até um volume final de 180 ml (0,7 g de agarose equivale a 1 ml do gel). Sob suave homogeneização, adicionaram-se 50 ml de uma solução de NaOH 1,7 $mol.l^{-1}$ com 1,425 g de boroidreto de sódio. Em um banho de gelo, foram acrescentados, gota a gota, 36 ml de glicidol. A mistura foi levemente agitada em temperatura ambiente, por 18 horas, e o gel, lavado excessivamente com água destilada. Os grupos gliceril formados foram oxidados com o uso de determinadas quantidades de periodato de sódio, de acordo com o grau de ativação desejado (Figura 9). Após duas horas, o gel foi lavado com água destilada, filtrado em vácuo e armazenado a 4°C.

A quantidade de periodato de sódio não consumida na reação foi verificada por meio de titulação com iodeto de potássio. Amostras do sobrenadante foram retiradas periodicamente e acrescentadas a 0,7 ml de iodeto de potássio 10% (em água) e 0,7 ml de

solução de bicarbonato de sódio saturado. Após 10 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 450 nm, e comparadas com um branco. O número de grupos gliceril formados na reação de eterificação é estequiométrico ao periodato consumido, correspondendo, portanto, à quantidade de grupos glioxil reativos.

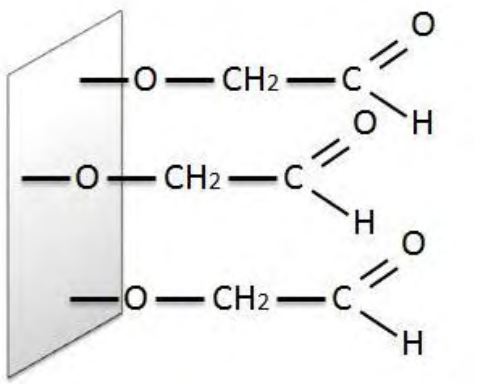

Figura 9 – Representação do suporte glioxil-agarose, contendo grupos aldeídos alifáticos.

3.16.2 Monoaminoetil-N-aminoetil agarose (MANAE-agarose)

O suporte MANAE-agarose foi preparado de acordo com Fernandez-Lafuente et al. (1993). Em 35 g do suporte glioxil-agarose, adicionaram-se 200 ml de uma solução de etilenodiamina (EDA) 2 $mol.l^{-1}$, em pH 10,0. Após duas horas de suave agitação, adicionou-se boroidreto de sódio, obtendo-se uma concentração final de 10 $mg.ml^{-1}$. Após duas horas de agitação, o suporte MANAE foi lavado, sucessivamente, com tampão acetato de sódio 100 $mmol.l^{-1}$, em pH 4,0, tampão borato de sódio 100 $mmol.l^{-1}$, em pH 9,0, e água destilada.

3.16.3 Glutaraldeído-agarose

O suporte glutaraldeído-agarose foi preparado pela ativação dos grupos amino-primários do suporte MANAE-agarose, de acordo com Fernandez-Lafuente et al. (1993), com pequenas modificações. Uma quantidade de 20 g de MANAE-agarose foi suspensa em 22,4 ml de tampão fosfato de sódio 200 $mmol.l^{-1}$, em pH 7,0. Posteriormente, 33,6 ml de uma solução de glutaraldeído a 25% foram adicionados, mantendo-se a mistura em suave agitação, por 16 horas, à temperatura ambiente. Por fim, o suporte foi lavado com água destilada, sob vácuo.

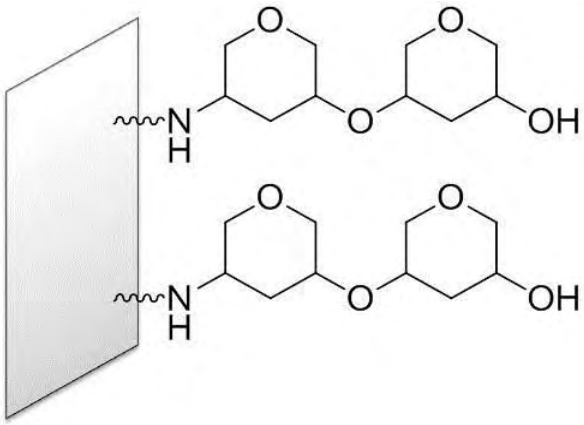

Figura 10 – Representação do suporte glutaraldeído-agarose.

3.16.4 Polietilenoimina-agarose (PEI-agarose)

O suporte polietilenoimina-agarose foi preparado de acordo com método de Mateo et al. (2000). Um volume de 90 ml de polietilenoimina (600 kDa) a 10% (m/v), em pH 10,5, foi adicionado a 7 g do suporte glioxil-agarose, sob suave agitação, por três horas. Em seguida, adicionou-se boroidreto de sódio até se obter uma concentração final de 10 $mg.ml^{-1}$. Dessa forma, os grupos que não reagiram com a PEI foram reduzidos sob suave agitação, por duas horas. O gel foi filtrado e lavado com tampão acetato de sódio 100 $mmol.l^{-1}$, em pH 4,0, tampão borato de sódio 100 $mmol.l^{-1}$, em pH 9,0, e, finalmente, com água destilada.

3.16.5 Suportes heterofuncionais

Os suportes foram preparados de acordo com os métodos descritos por Mateo et al. (2010), conforme se observa na Figura 11. Nesse caso, a imobilização se dá em duas etapas: a) adsorção física ou química, em pH 7,0; b) união covalente multipontual, em pH 10,0.

Para ativação com grupos epóxidos, 10 g de agarose 10 CL foram adicionados em 44 ml de água, 16 ml de acetona, 3,28 g de hidróxido de sódio, 0,2 g de boroidreto de sódio e 11 ml de epicloridrina. Nessas condições, parte dos grupos epóxidos se abrem (aproximadamente 60%), originando dióis. A suspensão foi agitada suavemente, por 16 horas, e lavada com excesso de água, sendo essa a base para obtenção dos seguintes suportes:

- IDA-glioxil: adicionou-se ácido iminodiacético 0,5 mol.l^{-1}, em pH 11,0, por 24 horas, a 25°C.

- Boronato-glioxil: fez-se a reação com ácido p-aminofenilborônico 5% dissolvido em dioxano 20%, em pH 11,0, por 24 horas, a 25°C.

- Amino-glioxil: adicionou-se trietilamina a 1 mol.l^{-1} em solução de acetona 50% em água, em pH 12,0, por 24 horas, a 25°C.

Finalmente, todos os suportes foram oxidados com periodato de sódio, como descrito por Guisán (1988), e lavados com água.

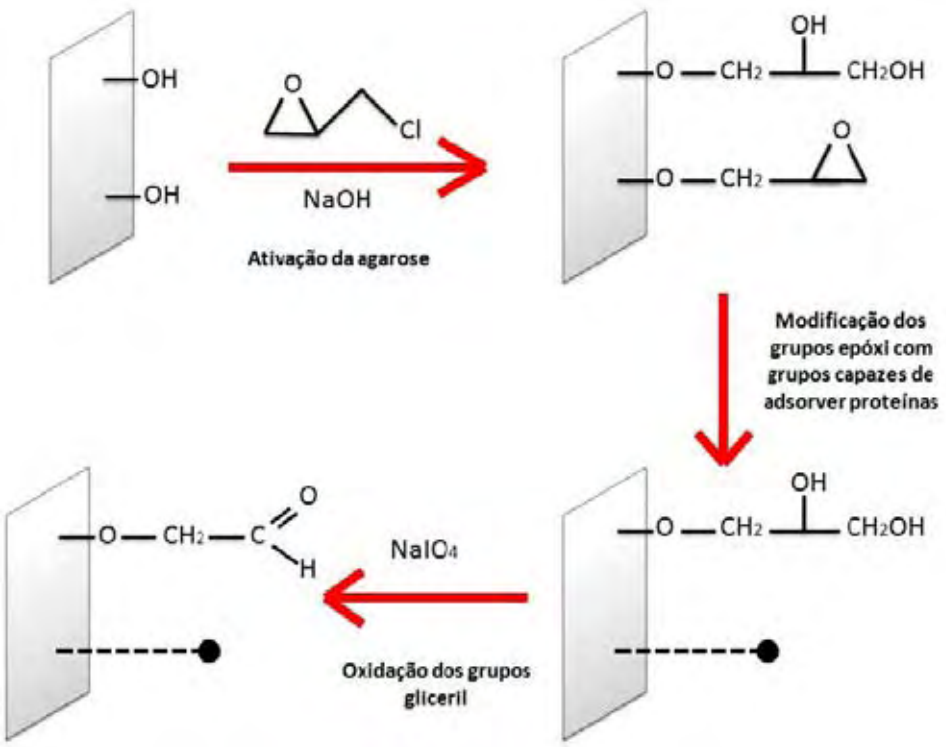

Figura 11 – Preparação dos suportes glioxil-agarose heterofuncionais. Fonte: Mateo et al., 2010 (adaptado e traduzido).

3.16.6 Quelato-agarose (IDA-Cu^{+2} agarose)

Uma solução de 10 ml do suporte epóxido-agarose foi adicionada a 10 ml de tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1} contendo 0,9 g de ácido iminodiacético, com pH ajustado a 11,0, como descrito por Armisén et al. (1999). Após 12 horas de suave agitação, a 25°C, o suporte foi lavado com água destilada e, em seguida, incubado com uma solução de 5 mg.ml^{-1} de sulfato de cobre, por 30 minutos, e lavado, novamente, com água destilada (Figura 12).

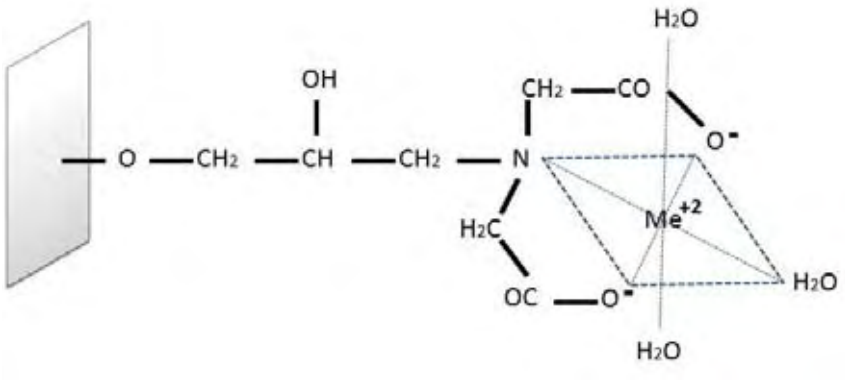

Figura 12 – Representação do suporte IDA-quelato agarose.

3.16.7 CNBr-sepharose

Um grama de gel de sepharose ativada com CNBr (Figura 13) foi misturado em 100 ml de água, em pH 2,0-3,0. A suspensão foi agitada por 30 minutos e secada a vácuo. O gel foi utilizado como controle, uma vez que a imobilização das enzimas ao suporte ocorre, em suaves condições, de modo a formar majoritariamente ligações unipontuais. Assim, espera-se que esse derivado apresente uma estabilidade próxima à da enzima solúvel.

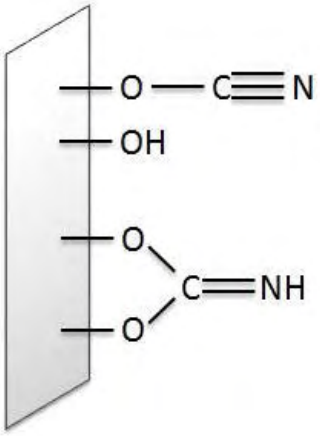

Figura 13 – Suporte comercial de sepharose ativada com brometo de cianogênio (CNBr), contendo éster de cianato e imido carbonato. Fonte: Sigma-Aldrich (adaptado).

3.17 Imobilização de xilanases

Os derivados foram preparados com baixas cargas enzimáticas, para que os estudos de atividade e estabilidade fossem realizados na ausência de limitações difusionais.

Durante o processo de imobilização, amostras do sobrenadante, da suspensão e do controle foram periodicamente retiradas, medindo-se a atividade enzimática. O processo foi considerado completo quando não mais se observou atividade no sobrenadante. A imobilização foi realizada com suave agitação e a 25°C, exceto quando mencionada outra temperatura.

O rendimento de imobilização foi definido como a relação entre as atividades no sobrenadante e no branco da enzima solúvel, de acordo com a fórmula:

$$Rendimento\ de\ imobilização\ (\%) = \frac{A - B}{A}\ x\ 100,$$

em que A é a atividade enzimática da solução utilizada para a imobilização (branco), e B é a atividade verificada no sobrenadante, representando a enzima que não se ligou ao suporte.

A atividade recuperada foi calculada pela razão entre a atividade da suspensão final, após o processo de imobilização, e a atividade inicial da enzima oferecida.

$$Atividade\ recuperada\ (\%) = \frac{C}{A}\ x\ 100,$$

em que A é a atividade enzimática da solução utilizada para a imobilização (branco), e C é a atividade do derivado obtido após imobilização.

3.17.1 Xilanase de *Aspergillus niger*

Uma quantidade máxima de 2 mg de enzima pura foi solubilizada em 10 ml de tampão fosfato de sódio (5 mmol.l^{-1} — para imobilização em PEI-agarose, CM-sepharose, DEAE-sepharose, amino-glioxil e IDA-glioxil; 50 mmol.l^{-1} — para imobilização em boronato-glioxil; 100 mmol.l^{-1} — para imobilização em IDA-Cu^{2+}-agarose), em pH 7,0; 1 g de suporte foi adicionado a cada uma dessas soluções.

A imobilização em sepharose ativada com CNBr também foi feita com 2 mg de enzima, diluídos em tampão fosfato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 7,0, a 4°C. Após 15 minutos, o derivado foi filtrado e suspenso em uma solução de etanolamina 1 mol.l^{-1}, em pH 8,0, por duas horas, para bloqueio de qualquer grupo reativo remanescente.

Quando o suporte utilizado foi o glioxil-agarose, a imobilização foi realizada com a diluição da enzima (2 mg) em tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 10,0. Ao final do processo, fez-se a redução com 1 mg de boroidreto de sódio por ml de suspensão, por 30 minutos. O derivado foi lavado com água destilada.

3.17.2 Xilanase de *Aspergillus versicolor*

A imobilização em glioxil-agarose foi feita com a diluição de 0,3 mg de proteína do extrato bruto em 10 ml de tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 10,0, a 25°C. A solução enzimática foi adicionada a 1 g de suporte, e a suspensão, mantida em suave agitação. Ao fim da imobilização, o derivado foi reduzido com 1 mg de boroidreto de sódio por ml de suspensão, por 30 minutos, e lavado com água destilada.

As mesmas condições, mas usando-se tampão fosfato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 7,0, foram utilizadas para a imobilização em suporte glutaraldeído-agarose. A imobilização em MANAE-agarose e em PEI-agarose foi realizada com a mesma quantidade de enzima, diluída em tampão fosfato de sódio 5 mmol.l^{-1}, em pH 7,0, a 25°C. Após a imobilização, os derivados foram lavados com água destilada.

3.17.3 Xilanase de *Trichoderma longibrachiatum*

Para a purificação parcial, prévia à etapa de imobilização, foram utilizados os suportes comerciais Q-sepharose e Sulfopropil-sepharose (SP-sepharose). A enzima foi diluída em tampão fosfato de sódio 5 mmol.l^{-1}, em pH 8,0 (Q-sepharose) ou em pH 6,0 (SP-sepharose).

Para imobilização em glioxil-agarose, uma quantidade de 0,25 mg da enzima parcialmente purificada foi diluída em 10 ml de tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 10,0. Essa solução foi adicionada a 1 g de suporte. Ao final da imobilização, o derivado foi reduzido com boroidreto de sódio (1 mg.ml^{-1} de suspensão), sob agitação suave, por 30 minutos e, em seguida, lavado com água destilada.

Em um único momento, testou-se a imobilização em glioxil-agarose em pH 8,5. O tampão utilizado foi o fosfato de sódio 100 mmol.l^{-1}. Nesse caso, manteve-se a imobilização *overnight* e, após filtração, o derivado foi ressuspenso em tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 10,0, por duas horas, quando se fez a redução com boroidreto de sódio.

A imobilização em CNBr-sepharose foi realizada conforme descrito no item 3.17.1, utilizando-se 0,25 mg de enzima parcialmente purificada.

3.17.4 Xilanase de *Thermomyces lanuginosus*

A imobilização da xilanase de *T. lanuginosus* em 1 g de glioxil-agarose foi feita com diluição de 0,1 mg de enzima em tampão bicarbonato de sódio 100 $mmol.l^{-1}$, em pH 10,0. Ao final do processo, o derivado foi reduzido com boroidreto de sódio (1 $mg.ml^{-1}$ de suspensão).

Da mesma forma descrita no item 3.17.1, realizou-se a imobilização em sepharose ativada com CNBr, utilizando-se 0,1 mg de enzima.

3.17.5 Xilanase de *Streptomyces halstedii*

A imobilização em glioxil-agarose foi obtida com a diluição de 0,2 mg de xilanase em 10 ml de tampão bicarbonato de sódio 100 $mmol.l^{-1}$, em pH 10,0. A solução foi adicionada a 1 g de suporte, e a suspensão, suavemente agitada.

A imobilização em CNBr-sepharose foi realizada conforme descrito no item 3.17.1.

3.18 SDS-PAGE

As amostras de enzimas livres e imobilizadas foram submetidas à eletroforese, em condições desnaturantes, em gel de poliacrilamida a 12%, de acordo com o método de Laemmli (1970). Nas situações em que a amostra foi uma enzima imobilizada em glioxil-agarose, o derivado foi utilizado previamente ao processo de redução com boroidreto de sódio. O padrão de massa molecular (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) consistiu em fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). Os géis foram corados com *coomassie brilliant blue* ou com prata, de acordo com Heukeshoven e Dernick (1985).

3.19 Hidrólise de xilana pelos derivados

A hidrólise da fração solúvel de xilana *beechwood* ou *birchwood* 4% (m/v), em tampão acetato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 5,0, foi realizada pela reação de 300 mg de derivado (contendo de 0,03 a 0,6 mg de proteína) com 15 ml da solução de substrato. A cada

intervalo de tempo, uma amostra foi retirada, determinando-se a quantidade formada de açúcares redutores (Miller, 1959). O máximo aparecimento de açúcares redutores, ou seja, quando sua concentração se manteve constante, foi considerado como 100% de liberação. Em alguns momentos, a hidrólise ocorreu em diferentes valores de pH — em tampão fosfato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$ (pH 6,0-8,0) ou bicarbonato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$ (pH 9,0-10,0) — e em diferentes temperaturas. Os produtos foram analisados por cromatografia de troca iônica de alto desempenho ou em camada delgada de sílica gel.

3.20 Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

Os xilooligossacarídeos foram analisados por HPAEC-PAD, usando-se um sistema Dionex ICS2500, que consistiu em uma bomba de gradiente GP50 e um detector eletroquímico ED50 com eletrodo de trabalho de ouro e eletrodo de referência de Ag/AgCl. O processamento dos dados foi realizado com o *software* Chromeleon, versão 6.7 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). Para o preparo dos eluentes, utilizaram-se água MilliQ, NaOH 50% (m/v) e acetato de sódio. Todos os eluentes foram desgaseificados com gás hélio, por 25 minutos.

As análises foram feitas, a 25°C, em uma coluna CarboPac PA-1 (250×4mm), com uma coluna de guarda CarboPac PA-1 (50×4mm). A separação foi realizada com fluxo de 1 $ml.min^{-1}$, de acordo com método de Gullón et al. (2010), com algumas modificações. Foram utilizados dois eluentes — NaOH 100 $mmol.l^{-1}$ (A); NaOH 100 $mmol.l^{-1}$ e acetato de sódio 500 $mmol.l^{-1}$ (B) —, com um gradiente de 0-70% do eluente B, em 0-45 minutos. Após cada corrida, a coluna foi lavada, por dez minutos, com NaOH 100 $mmol.l^{-1}$ e acetato de sódio 1 $mol.l^{-1}$, e reequilibrada, por 15 minutos, com as condições iniciais do gradiente empregado.

Antes da injeção (20 µl), as amostras e os padrões foram filtrados em uma membrana de náilon Millipore FH (0,22 µm) (Bedford, MA, EUA). Os XOS foram quantificados por calibração externa, com uso de soluções contendo padrões de xilose e de XOS (xilobiose a xilohexose), sendo os coeficientes de regressão da curva de calibração maiores que 0,99.

3.21 Cromatografia em camada delgada (TLC)

Os produtos de hidrólise das enzimas livres ou imobilizadas foram, algumas vezes, analisados por cromatografia em camada delgada, em sílica gel G-60. A fase móvel utilizada foi composta por acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (9:3:1:4 v/v), como descrito por Fontana et al. (1988). Os açúcares foram detectados com 0,2% (m/v) de orcinol em ácido sulfúrico e metanol (1:9 v/v). Xilose e xilobiose foram usadas como padrões.

3.22 Reúso dos derivados

A possibilidade de reúso do derivado obtido com a xilanase de *A. versicolor* foi verificada após reação de 0,5 g de derivado (0,15 mg de proteína) em 5 ml da porção solúvel de xilana *birchwood* 1%, em tampão acetato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 5,0, a 25°C. Para o derivado da enzima de *S. halstedii*, a reação foi feita com 0,5 g de derivado (0,1 mg de proteína) para 15 ml da solução contendo xilana *beechwood* 1%, em tampão acetato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 5,0, a 25°C.

Após cada ciclo de reação, o derivado foi lavado, por três vezes, com tampão acetato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 5,0, e o substrato foi adicionado para um novo ciclo e, assim, sucessivamente.

3.23 Produção de XOS em reator de leito empacotado

Um reator de leito empacotado (vidro borossilicato; 12 cm de comprimento; 1 cm de diâmetro), contendo 3 g de um derivado com baixa carga de xilanase (0,3 mg de proteína/g) de *Aspergillus versicolor* em glioxil-agarose, foi usado para a produção de XOS. Um volume de 25 ml da fração solúvel de xilana *birchwood* 4% (m/v), em tampão acetato de sódio 50 $mmol.l^{-1}$, em pH 5,0, foi introduzido no reator por uma bomba peristáltica. A temperatura de reação foi mantida em 55°C, com uso de um circulador de água (MLW, U2C, Berlim). Um diagrama esquemático do reator com a xilanase imobilizada é mostrado na Figura 14.

Foram testados dois métodos de produção de XOS em reator. Na operação contínua, a solução de xilana foi introduzida no reator para, em seguida, ser direcionada a outro reservatório, a um fluxo de 12 $ml.h^{-1}$. No modo de operação contínua com recirculação,

apenas um reservatório foi utilizado, sendo mantido sob agitação. A recirculação ocorreu por quatro horas, a um fluxo de 60 $ml.h^{-1}$.

As amostras foram retiradas periodicamente, e os açúcares redutores, quantificados. O perfil do produto de hidrólise foi analisado por cromatografia em camada delgada.

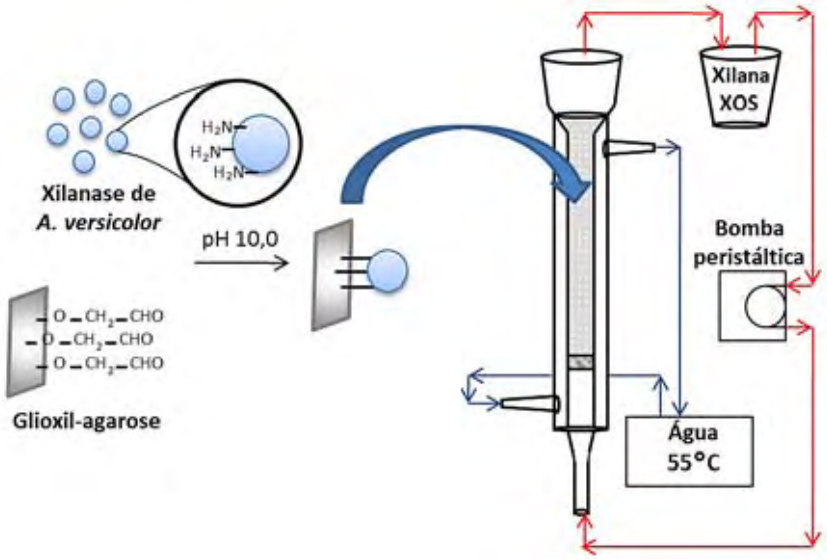

Figura 14 – Esquema ilustrando a imobilização covalente multipontual da xilanase de *Aspergillus versicolor*, em suporte glioxil-agarose, e seu uso em um reator de leito empacotado, para produção contínua de xilooligossacarídeos.

3.24 Análise dos dados

Os ensaios foram todos realizados em triplicatas, e o desvio padrão nunca ultrapassou 5%, em relação à média.

4 RESULTADOS

4.1 Xilanase de *Aspergillus niger*

4.1.1 Identificação do fungo

O fungo foi isolado de um fruto de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e identificado morfologicamente como uma cepa do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, pelo grupo da Dr.ª Derlene Attili de Angelis, do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP. A Figura 15 mostra o conidióforo desse fungo, contendo os conidiósporos.

Figura 15 – Microscopia óptica (400x) do conidióforo do fungo *Aspergillus niger.*

Em seguida, para confirmação, o fungo foi enviado ao Instituto André Tosello (Campinas, SP), para identificação molecular. O fungo apresentou 100% de similaridade com as sequências de linhagens de *Aspergillus niger* van Thiegem, depositadas nos bancos de dados Genbank e CBS. Na árvore filogenética, a amostra agrupou-se com as linhagens *Aspergillus niger* NRRL1956 e CBS55465.

4.1.2 Clarificação e concentração do extrato enzimático

Em estudos prévios, realizados com esse mesmo microrganismo, Benedetti (2009) observou que, dentre as fontes de carbono de baixo custo testadas (farelo de trigo, pó de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar), a melhor para a produção de xilanase pelo

fungo *A. niger* foi o sabugo de milho em pó. Sendo assim, optou-se por fazer, aqui, a produção da enzima com uso desse resíduo agroindustrial.

Além disso, a mesma autora verificou que a adsorção do extrato em caulim possibilitava a visualização de apenas uma banda proteica, correspondente à xilanase.

No entanto, logo após o início deste trabalho, a empresa fornecedora do caulim teve suas atividades encerradas, e o uso do produto proveniente de outras marcas não causou o mesmo efeito sobre o extrato, mantendo-o com algumas outras proteínas (Figura 16).

Como se observa na Tabela 2, há uma diminuição da quantidade de proteína no extrato tratado com caulim, ou seja, ocorre a adsorção de parte da proteína total ao minério. Porém, ao fim do processo, a atividade específica é praticamente igual à do extrato bruto. Dessa forma, optou-se por manter o tratamento com o caulim, até pelo fato de ser notável, ainda que visualmente, a diminuição da turvação decorrente da retirada de algumas impurezas pelo caulim.

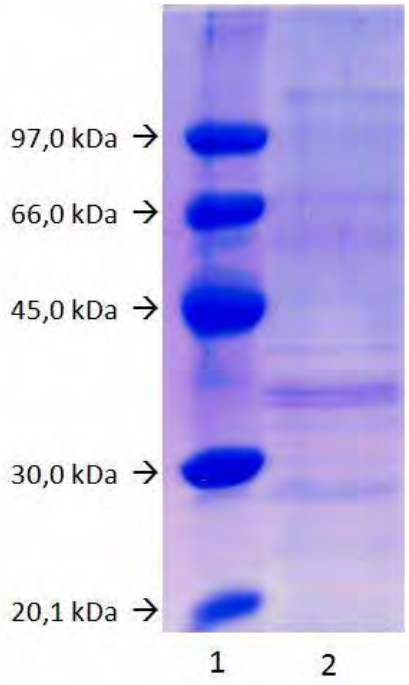

Figura 16 – SDS-PAGE do extrato bruto de *Aspergillus niger*. Raias: (1) marcador de massa molecular; (2) extrato bruto.

Tabela 2 – Efeito do tratamento do extrato bruto com caulim, na atividade da xilanase de *A. niger*

	Sem tratamento	***Tratamento com caulim***
Atividade ($U.ml^{-1}$)	0,45	0,40
Proteína ($mg.ml^{-1}$)	0,87	0,76
Atividade específica ($U.mg^{-1}$)	0,52	0,53

Em seguida, testou-se o efeito da liofilização do extrato bruto e do tratado com caulim (Tabela 3). Nota-se uma atividade específica final semelhante em ambos os casos. Preferiu-se a liofilização do extrato tratado com caulim aos demais métodos, o que permitiu o transporte e o armazenamento da enzima, por longos períodos, com menores riscos de contaminação.

Tabela 3 – Efeito da liofilização do extrato bruto e do extrato tratado com caulim, na atividade da xilanase de *Aspergillus niger*

	Sem tratamento	***Filtração com caulim***
Atividade ($U.ml^{-1}$)	1,83	1,56
Proteína ($mg.ml^{-1}$)	2,11	1,82
Atividade específica ($U.mg^{-1}$)	0,87	0,86

4.1.3 Produção de xilanase por *Aspergillus niger* em diferentes fontes de carbono

Para se estabelecer o efeito da fonte de carbono na produção de xilanase, o fungo *A. niger* foi crescido em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono e em meio sem fonte de carbono adicional, por 18 horas (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade xilanolítica em filtrado de cultura do fungo *A. niger*, em diferentes fontes de carbono

Fonte de carbono	**pH**	**Atividade ($U.ml^{-1}$)**	**Proteína ($mg.ml^{-1}$)**	**Atividade específica ($U.mg^{-1}$)**
Ausente	6,6	0	1,07	0
Xilana 1%	7,4	0,39	0,70	0,56
Glicose 1%	4,6	0,02	0,59	0,03
Xilose 1%	6,9	0,57	1,09	0,52
Xilana 1% + Glicose 0,5%	6,6	0,37	0,71	0,52
Xilana 1% + Glicose 1%	4,6	0,06	0,66	0,09
Xilana 1% + Glicose 2%	5,3	0	0,97	0
Xilana 1% + Xilose 0,5%	7,0	0,55	0,94	0,58
Xilana 1% + Xilose 1%	6,1	0,67	1,17	0,57
Xilana 1% + Xilose 2%	6,7	0,29	1,71	0,17

Os resultados apresentados mostram que a glicose atuou como repressora de síntese das xilanases nesse microrganismo. Houve 100% de inibição da produção da enzima quando foram utilizados 2% de glicose no meio de cultivo. Em presença de glicose, o pH final do meio de cultivo, por 18 horas, ficou levemente acidificado (pH 4,6).

Entre os fungos, há diferentes tipos de mecanismos de indução enzimática. Na literatura, a repressão catabólica (ou repressão por glicose) é um consenso na síntese de xilanase por *Aspergillus* sp. e representa o principal mecanismo de repressão de determinadas enzimas. Nesse caso, os carboidratos prontamente metabolizáveis, como a glicose, reprimem a síntese de enzimas relacionadas ao catabolismo de fontes alternativas de carbono, garantindo a utilização da fonte de carbono presente mais acessível. Isso ocorre por meio da proteína CREA (codificada pelo gene *creA*), que se liga a pequenas e específicas sequências no DNA, união que impede a transcrição de genes alvos (RUIJTER; VISSER, 1997).

Enquanto alguns fungos possuem a produção de xilanase reprimida por xilose (como ilustrado na Figura 17), outros não apresentam o mesmo comportamento.

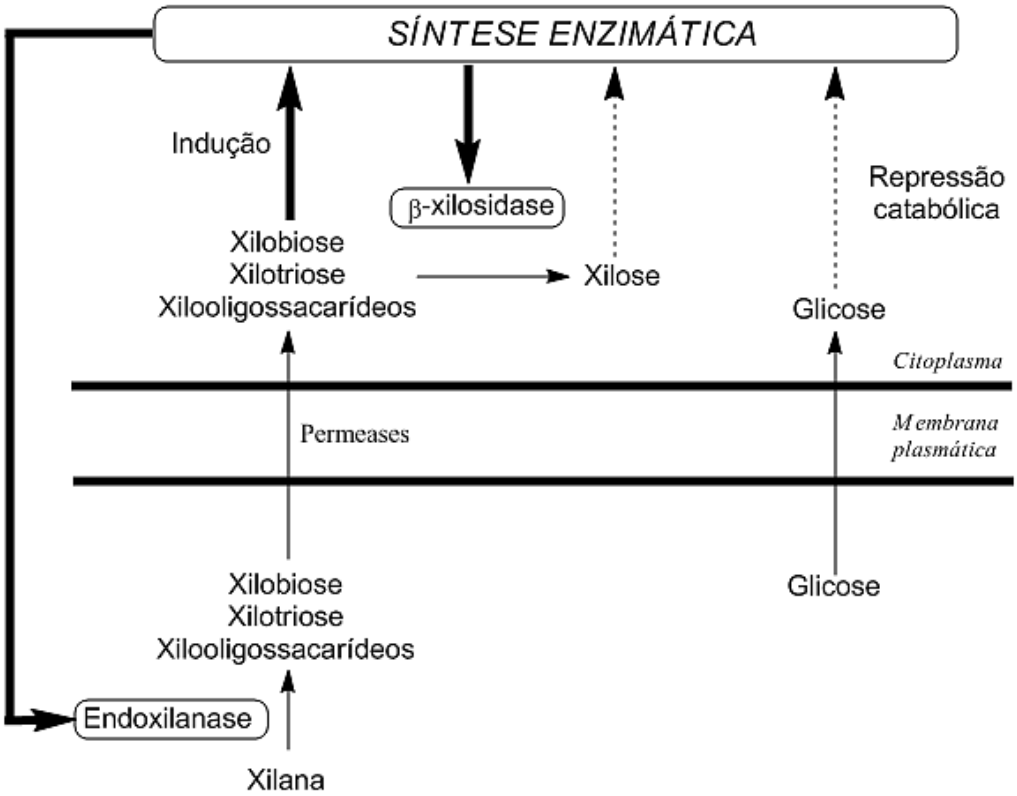

Figura 17 – Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico envolvendo a xilanase e a β-xilosidase. Fonte: Polizeli et al., 2005 (adaptado e traduzido).

De fato, a presença de baixas concentrações de xilose no cultivo não reprimiu, e até induziu, a síntese das xilanases no fungo estudado (Tabela 4). Quando se utilizou 1% desse açúcar, a atividade específica foi apenas 6% menor que a obtida no crescimento com xilana e, na presença de 1% de xilana com 0,5% ou 1% de xilose, houve um ligeiro aumento da

atividade xilanolítica. Quando se utilizaram, concomitantemente, as fontes de carbono xilana 1% e xilose 2%, já se notou uma grande inibição da atividade enzimática.

Em *Aspergillus niger*, o ativador transcricional *XlnR* controla a expressão dos genes codificadores de enzimas xilanolíticas e celulolíticas (PEIJ et al., 1998). De acordo com Vries et al. (1999), o nível de expressão de cada enzima xilanolítica é influenciado pelo balanço entre a indução por *XlnR* e a repressão por *creA*. Os mesmos autores comprovaram que o nível de expressão dos genes xilanolíticos é, de modo geral, maior em xilana que em xilose. Em *Aspergillus niger*, isso é explicado pelo fato de a xilose ser liberada gradualmente a partir da xilana, resultando em baixa concentração de xilose no meio. Nessas condições, a repressão por xilose, mediada pela proteína CREA, é baixa, e maiores níveis de expressão de genes xilanolíticos são observados. No entanto, em um meio contendo, aproximadamente, 70 $mmol.l^{-1}$ de xilose, a repressão por *creA* passa a ser significante, resultando em níveis reduzidos de expressão.

Na Tabela 5, encontram-se os valores de atividade xilanolítica no filtrado de cultura do fungo *A. niger*, crescido com demais fontes de carbono (avicel, carboximetilcelulose, papel e xilana) e em diferentes tempos (8, 24 e 36 horas).

Tabela 5 – Atividade de xilanase em filtrado do *A. niger* crescido com quatro diferentes fontes de carbono

Tempo de cultivo (horas)	Fonte de carbono	Atividade ($U.ml^{-1}$)	Proteína ($mg.ml^{-1}$)	Atividade Específica ($U.mg^{-1}$)
8	Avicel	0,01	0,63	0,02
	Carboximetilcelulose	0,01	0,57	0,02
	Papel	0	0,41	0
	Xilana	0,01	0,68	0,01
24	Avicel	0,01	0,42	0,02
	Carboximetilcelulose	0,22	0,54	0,41
	Papel	0,10	0,49	0,20
	Xilana	0,34	0,45	0,76
36	Avicel	0,04	0,43	0,09
	Carboximetilcelulose	0,14	0,58	0,24
	Papel	0,09	0,42	0,21
	Xilana	0,32	0,41	0,78

Como esperado, as atividades foram maiores quando a fonte de carbono foi a xilana, tanto em 24 quanto em 36 horas de cultivo. Quando se usou avicel, carboximetilcelulose ou papel, atividades inferiores foram obtidas, com destaque para a carboximetilcelulose, em 24

horas de cultivo (0,41 U.mg^{-1}). Não se observou atividade de avicelase em nenhum caso, e irrisórias atividades de carboximetilcelulase foram encontradas apenas quando a fonte de carbono foi a xilana, por oito horas de crescimento (0,03 U.mg^{-1}), e a carboximetilcelulose, por 24 horas (0,04U.mg^{-1}).

Com o pó de sabugo de milho como fonte de carbono, não foram detectadas atividades de beta-xilosidase, avicelase e carboximetilcelulase no extrato bruto.

4.1.4 Caracterização da xilanase produzida por Aspergillus niger

4.1.4.1 Determinação do pH ótimo

A máxima atividade da xilanase foi em pH 5,0 (Figura 18), valor semelhante aos demais determinados para xilanases microbianas (CARMONA et al., 1998; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; POLIZELI et al., 2005; MILAGRES et al., 2005; FENGXIA et al., 2008). Mais de 85% de atividade são observados na faixa de pH 4,5-6,0.

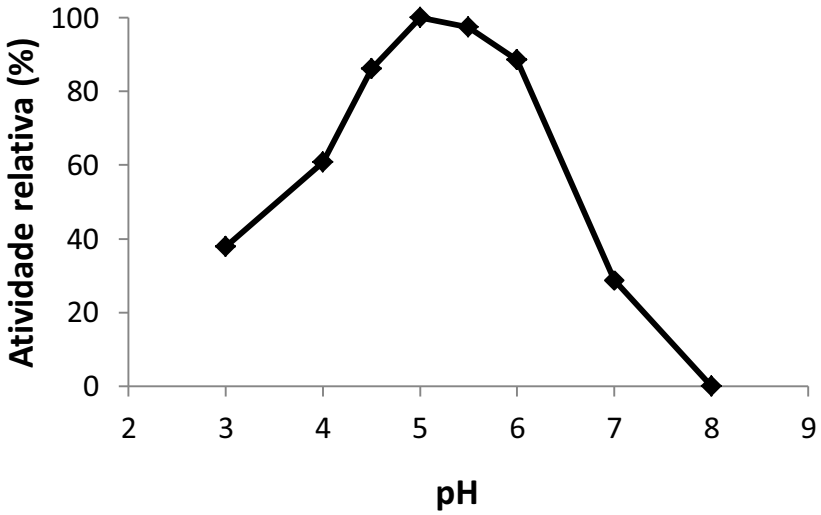

Figura 18 – Efeito do pH na atividade xilanolítica do filtrado de *A. niger*.

4.1.4.2 Determinação da temperatura ótima

A temperatura ótima da xilanase presente no extrato bruto tratado com caulim foi de 55°C (Figura 19). Esse valor foi igual ao de *Ceriporiopsis subvermispora* (MILAGRES et al., 2005) e de *Aspergillus fischeri* (CHANDRA; CHANDRA, 1996) e comparável com o de xilanases

de outros fungos termoestáveis, cujas temperaturas ótimas variam de 40°C a 60°C, tais como *Humicola grisea* var. *thermoidea* (MONTI et al., 1991; MONTI et al., 2003), *Rhyzopus stolonifer* (GOULART et al., 2005), *Aspergillus versicolor* (CARMONA et al., 1998) e *Thermomyces lanuginosus* (PUCHART et al., 1999).

O valor da energia de ativação (EA) foi de 19,05 $KJ.mol^{-1}$ (4,55 $Kcal.mol^{-1}$), ou seja, a energia necessária para a hidrólise da xilana *birchwood* foi inferior àquelas obtidas para a xilanase de *Aspergillus fischeri* (CHANDRA; CHANDRA, 1996) e para a de *Aspergillus tamarii* (GOUDA; ABDEL-NABY, 2002), que foram de 27,4 $KJ.mol^{-1}$ e 24,06 $KJ.mol^{-1}$, respectivamente.

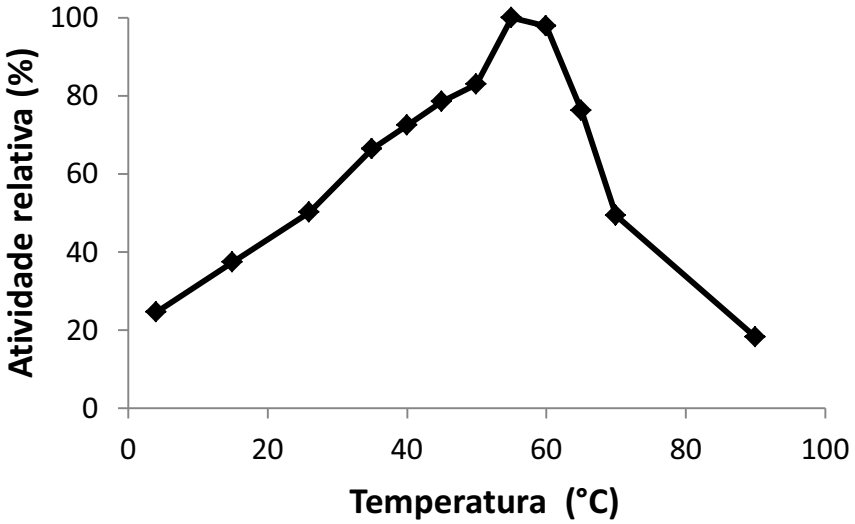

Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade xilanolítica do filtrado de *A. niger*.

4.1.4.3 Determinação de K_m e V_{max} aparentes

Na Tabela 6, encontram-se os valores de V_0 para cada concentração de substrato ([S]) utilizada. A xilanase presente no extrato clarificado apresentou uma típica cinética michaeliana (Figura 20).

Valores de K_m e V_{max} da xilanase de *A. niger* foram estimados por diferentes métodos, usando-se xilana *birchwood* como substrato (Figura 21). Em média, o K_m obtido foi de 10,41 $mg.ml^{-1}$, e a V_{max} igual a 3,32 U.mg $proteína^{-1}$ (Tabela 7).

Tabela 6 – Valores de concentração de substrato e velocidade inicial de xilanase presente no extrato de *A. niger*, filtrado em caulim

$[S]^a$ mg.ml^{-1}	$V_0{}^b$ µmols.min^{-1}.mg^{-1}	$1.[S]^{-1}$	$1.V_0^{-1}$	$V_0.[S]^{-1}$	$[S].V_0^{-1}$
1	0,2927	1	3,42	0,29	3,42
2,5	0,6553	0,4	1,53	0,26	3,81
5	1,0533	0,2	0,95	0,21	4,75
10	1,5989	0,1	0,62	0,16	6,25
20	2,2195	0,05	0,45	0,11	9,01

[a]Concentração de substrato; [b]Velocidade inicial.

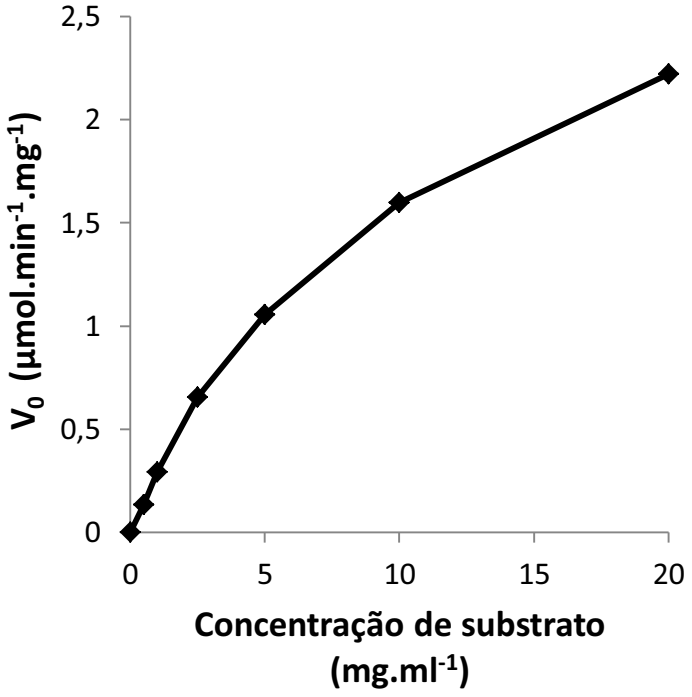

Figura 20 – Gráfico de Michaelis-Menten da enzima xilanase de *Aspergillus niger*.

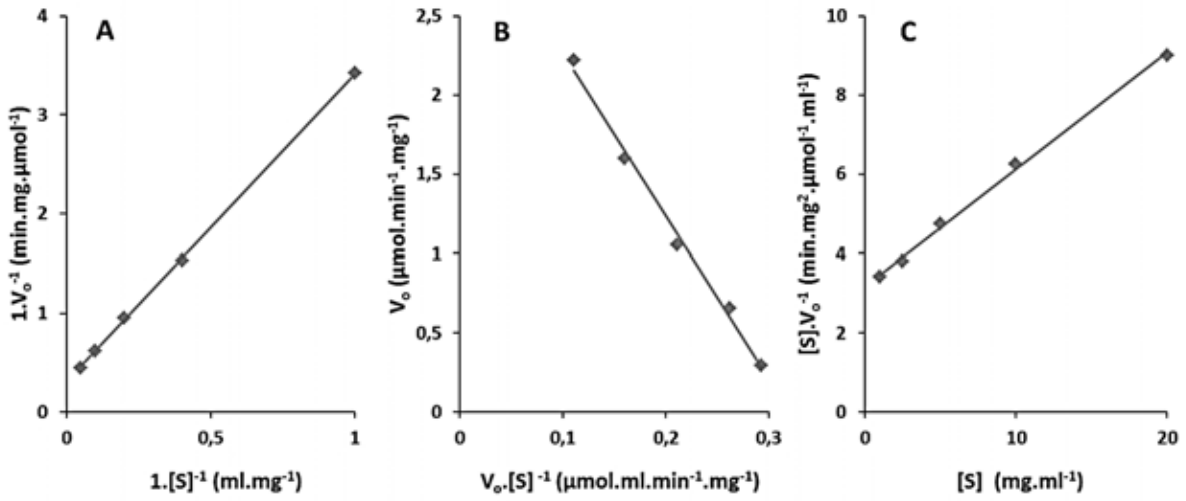

Figura 21 – Cálculo de K_m e V_{max} da enzima xilanase de *A. niger* por diferentes métodos. Gráfico de Lineweaver-Burk (A); gráfico de Eadie-Hofstee (B); gráfico de Hanes-Woolf (C). O substrato utilizado foi a xilana *birchwood*.

Tabela 7 – Valores de K_m e V_{max} aparentes do filtrado de *A. niger*, obtidos por diferentes métodos

Método	K_m ($mg.ml^{-1}$)	V_{max} ($\mu mols.min^{-1}.mg^{-1}$)
Lineweaver-Burk	10,20	3,28
Eadie-Hofstee	10,30	3,30
Hanes-Woolf	10,73	3,38

4.1.4.4 Estabilidade térmica

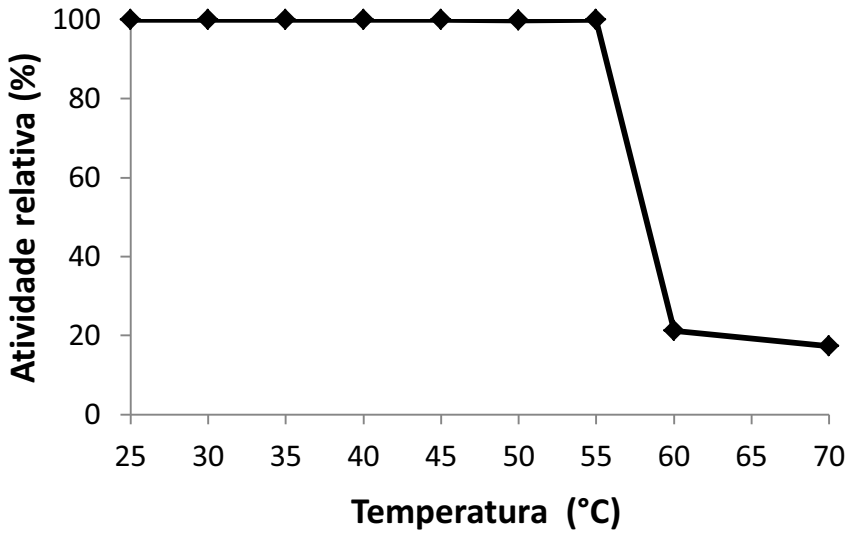

Figura 22 – Estabilidade térmica da xilanase de *Aspergillus niger*, após uma hora de incubação, nas diferentes temperaturas.

A enzima mostrou ótima estabilidade até 55°C, com preservação da atividade por, pelo menos, uma hora de incubação. Já a 60°C, a xilanase manteve 20% da atividade (Figura 22).

4.1.4.5 Inativação térmica

A 55°C, a enzima manteve, aproximadamente, 70% da atividade, por até oito horas de incubação (Figura 23), sendo que, em 24 horas, não mais se observou atividade (dados não mostrados). Já a 60°C, houve uma rápida queda da mesma (Figura 24).

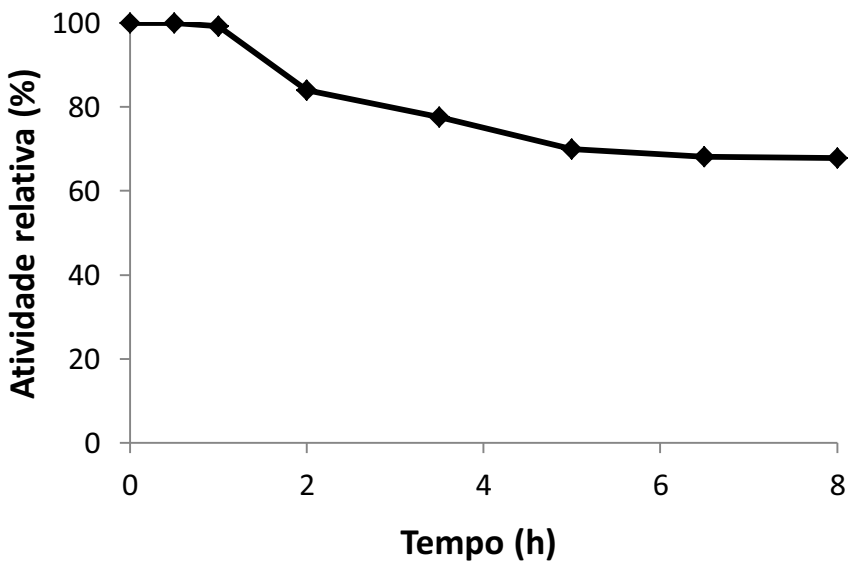

Figura 23 – Inativação térmica, a 55°C, da enzima xilanase de *Aspergillus niger*.

A meia-vida da xilanase foi de 10-15 minutos, a 60°C (Figura 24). Esse valor foi próximo ao de xilanases de *Aspergillus* sp. (GAWANDE; KAMAT, 1998) e de *Aspergillus versicolor* (CARMONA et al., 1998). Foi, porém, inferior ao de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (LUCENA NETO; FERREIRA FILHO, 2004), de 5,5 horas, ao de *Aspergillus tamarii* (GOUDA; ABDEL-NABY, 2002), de 50 minutos, e ao de *Acrophialophora nainiana* (CARDOSO; FERREIRA FILHO, 2003), de uma hora.

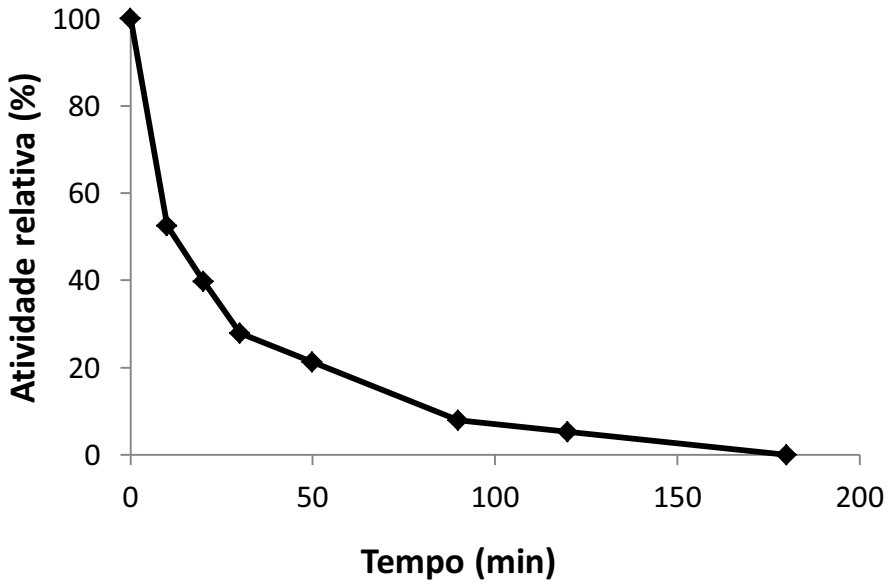

Figura 24 – Inativação térmica, a 60°C, da enzima xilanase de *Aspergillus niger*.

4.1.4.6 Estabilidade ao pH

A xilanase mostrou-se bastante estável, mormente entre os valores de pH 4,0 a 9,0, sendo que, em pH 10,0 e 11,0, ela manteve mais de 70% de atividade, mesmo após 24 horas de incubação a 25°C (dados não mostrados). Na Figura 25, observa-se a estabilidade da xilanase de *A. niger* em pH 10,0. Os dados obtidos são de grande importância quando se trata de imobilização, uma vez que os métodos mais eficientes exigem que o processo seja realizado em meio alcalino, quando os grupamentos amino das lisinas se encontram reativos, possibilitando, portanto, o estabelecimento de reações covalentes entre a proteína e o suporte.

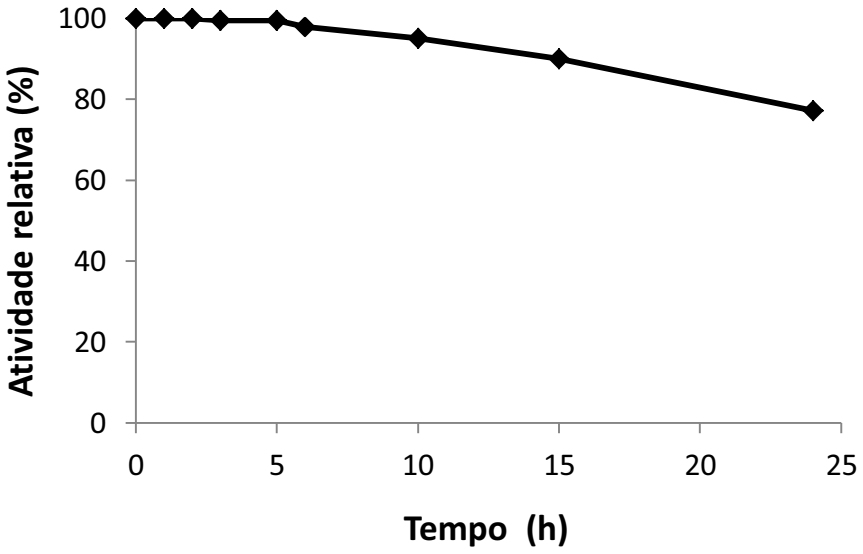

Figura 25 – Estabilidade da xilanase de *A. niger* em pH 10,0.

4.1.5 Efeito da adição de íons na atividade xilanolítica

A Tabela 8 apresenta os valores de atividade após reação contendo os diversos íons, nas concentrações de 1 $mmol.l^{-1}$ e 5 $mmol.l^{-1}$. Os efeitos inibitórios mais relevantes foram observados com a adição de 5 $mmol.l^{-1}$ dos íons Cu^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+3} e Hg^{+2}, sugerindo uma complexão desses metais, em especial com grupos imidazol, tiol ou indol dos resíduos de aminoácidos possivelmente presentes no sítio ativo da enzima. De acordo com a revisão de Bastawde (1992), diversas xilanases fúngicas e bacterianas apresentam inibição por esses íons, sendo mais comum o Hg^{+2}. Por exemplo, Carmona et al. (2005) verificaram total

inibição da xilanase II de *A. versicolor* com os íons Hg^{+2} e Cu^{+2}, embora Fe^{+3} e Zn^{+2} houvessem também inibido a atividade enzimática, em menores proporções.

Tabela 8 – Efeito da adição de íons na atividade da xilanase de *A. niger*

Íon	***1* mmol.l^{-1}**		***5* mmol.l^{-1}**	
	Atividade (U.ml^{-1})	**Ativação/Inibição (%)**	**Atividade (U.ml^{-1})**	**Ativação/Inibição (%)**
Controle	9,77	--	9,47	--
Ag^{+}	9,50	- 2,76	9,50	+ 0,32
Mg^{+2}	9,03	- 7,58	8,87	- 6,34
Cu^{+2}	8,15	-16,58	4,28	- 54,81
NH_4^{+}	10,07	+ 3,07	8,15	- 13,94
Zn^{+2}	10,38	+ 6,24	7,08	- 25,24
K^{+}	9,66	- 1,13	10,38	+ 9,61
Fe^{+3}	10,04	+ 2,76	5,60	- 40,87
Ba^{+2}	9,58	- 1,95	10,26	+ 8,34
Ca^{+2}	9,33	- 4,5	10,35	+ 9,29
Na^{+}	10,21	+ 4,5	9,02	- 4,75
Hg^{+2}	10,41	+ 6,55	4,95	- 47,73

4.1.6 Purificação

O extrato bruto, contendo a enzima xilanase e algumas outras proteínas, foi secretado no meio de cultivo pelo fungo *Aspergillus niger*, crescido com pó de sabugo de milho como fonte de carbono (Figura 26, raia 2). Inicialmente, realizaram-se experimentos com o objetivo de se purificar a enzima de interesse, por meio de *batch* em suportes com diferentes tipos de ativação (Tabela 9).

Tabela 9 – Rendimento e atividade recuperada do extrato bruto de xilanase imobilizado em diferentes suportes

Suportes	**Rendimento de imobilização (%)**	**Atividade recuperada (%)**
DEAE-sepharose	16,9	ND
PEI-agarose	0	ND
Amino-glioxil-agarose	3,4	ND
Carboximetil-sepharose	10,8	ND
IDA-glioxil-agarose	17,5	ND
IDA-Cu-agarose	50,4	71,5
Boronato-glioxil-agarose	5	ND

ND: não determinado. Os suportes foram preparados como descrito em Métodos.

Quando oferecidas 20 U.g de suporte^{-1}, cerca de 50% da enzima foram adsorvidos no suporte IDA-Cu agarose, com boa atividade recuperada. Após dessorção com 20 mmol.l^{-1} de

imidazol, verificou-se uma única proteína, de aproximadamente 35 kDa, com atividade de xilanase (Figura 26, raia 4). O fator de purificação foi de 4,14 (Tabela 10). Com os demais suportes testados, insignificantes valores de rendimento de imobilização foram obtidos.

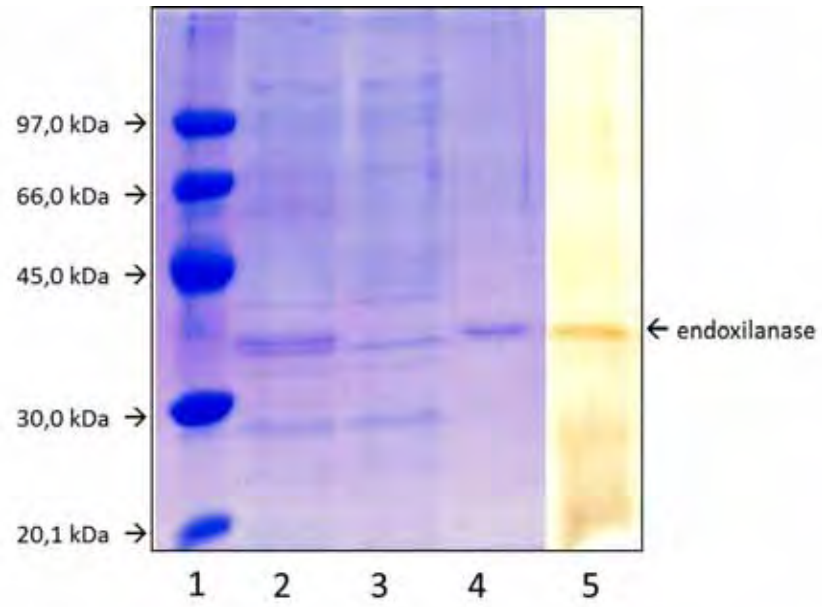

Figura 26 – SDS-PAGE da purificação da endo-1,4-β-xilanase em IDA-Cu. Raias: (1) marcador de massa molecular; (2) extrato bruto proteico de *Aspergillus niger*; (3) proteínas não adsorvidas em IDA-Cu; (4) endo-1,4-β-xilanase após dessorção de IDA-Cu com 20 mmol.l^{-1} de imidazol; (5) idem à raia 4, porém corado com nitrato de prata.

Tabela 10 – Valores de proteína e atividade após purificação da endo-1,4-β-xilanase de *Aspergillus niger* com IDA-Cu agarose

	Proteína (mg)	**Atividade (UI)**	**Atividade específica (U.mg^{-1})**	**Fator de purificação**
Extrato bruto	26	52,8	2,03	1,00
Endoxilanase	2,7	22,7	8,41	4,14

4.1.7 Estudos de imobilização

Preparou-se um suporte agarose 10 CL, ativado com 180 µmol de grupos glioxil por ml de gel. A endoxilanase purificada, aqui denominada xilanase I (xil I), foi então imobilizada em glioxil-agarose e, após duas horas, 100% da enzima ligaram-se ao suporte, preservando 80% da atividade inicialmente oferecida (Figura 27).

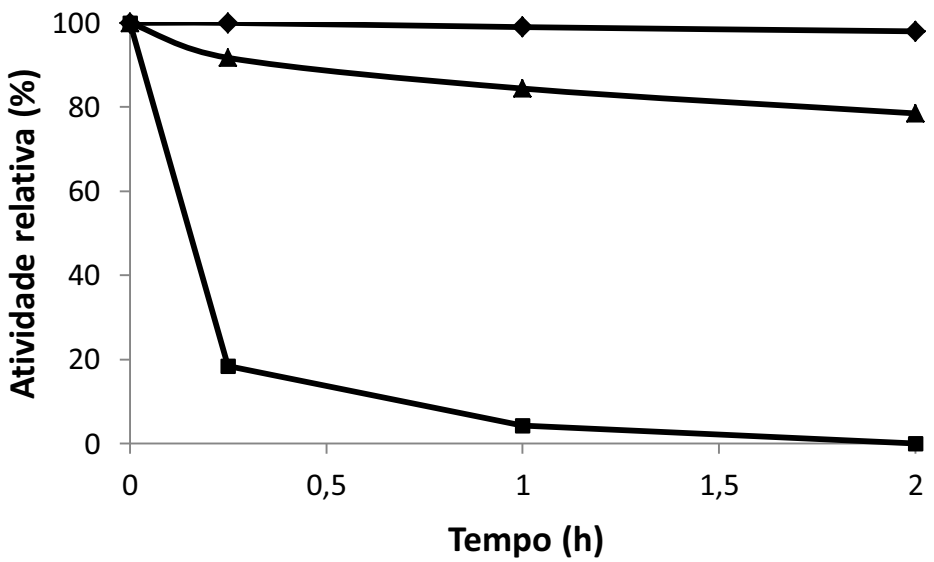

Figura 27 – Curso de imobilização da xilanase I de *Aspergillus niger* em glioxil-agarose 10 CL. (♦) controle (enzima solúvel); (■) sobrenadante; (▲) suspensão. A imobilização foi realizada em tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1} pH 10,0, a 25°C, sob suave agitação. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

O fungo *Aspergillus niger* pode expressar ao menos cinco formas majoritárias de xilanases, além de outras dez secundárias. Isso pode resultar do processamento alternativo do mRNA, de proteólises parciais e/ou de diferenças no grau de amidação e glicosilação (BIELY, 1985). Assim, a segunda fração (xilanase II), que não se adsorveu ao suporte quelato, foi também imobilizada em glioxil-agarose. No entanto, o tempo para a imobilização foi bem superior: após 48 horas, apenas 70% da enzima uniram-se ao suporte (Figura 28). Dessa forma, há, também, a possibilidade de o extrato conter outras isoenzimas, que nem mesmo em longos períodos foram capazes de se ligar ao suporte.

As duas frações de xilanase (xil I e xil II) também foram imobilizadas em suporte de sepharose ativada com CNBr. Uma imobilização muito suave é realizada nesse suporte, em pH 7,0 e a 4°C, por 15 minutos. Assim, qualquer tipo de união multipontual é evitado, e as ligações ocorrem por um único ponto, por meio do grupamento amino-terminal da proteína; desse modo, sua estrutura tridimensional não se estabiliza (MATEO et al., 2005). Esse suporte é utilizado como um controle, cujo comportamento deve representar o da enzima solúvel nativa na ausência de qualquer outro fator de interferência, como agregação, interações com superfícies hidrofóbicas de bolhas de ar, etc. Verificou-se que o derivado xil I-CNBr foi pelo menos 2,5 vezes mais estável que o derivado xil II-CNBr (Figura 29).

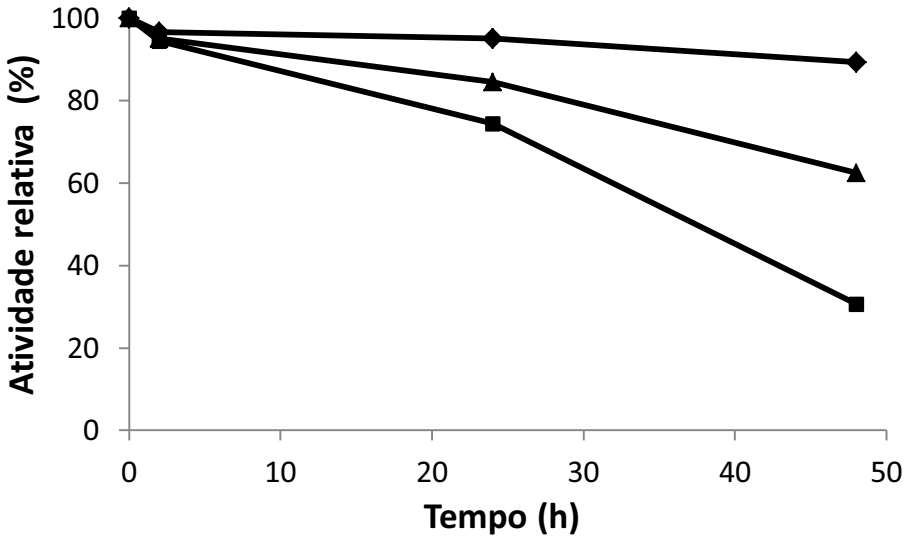

Figura 28 – Curso de imobilização da xilanase II de *Aspergillus niger* em glioxil-agarose 10 CL. (♦) controle (enzima solúvel); (■) sobrenadante; (▲) suspensão. A imobilização foi realizada em tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}, pH 10,0, a 25°C, sob suave agitação. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

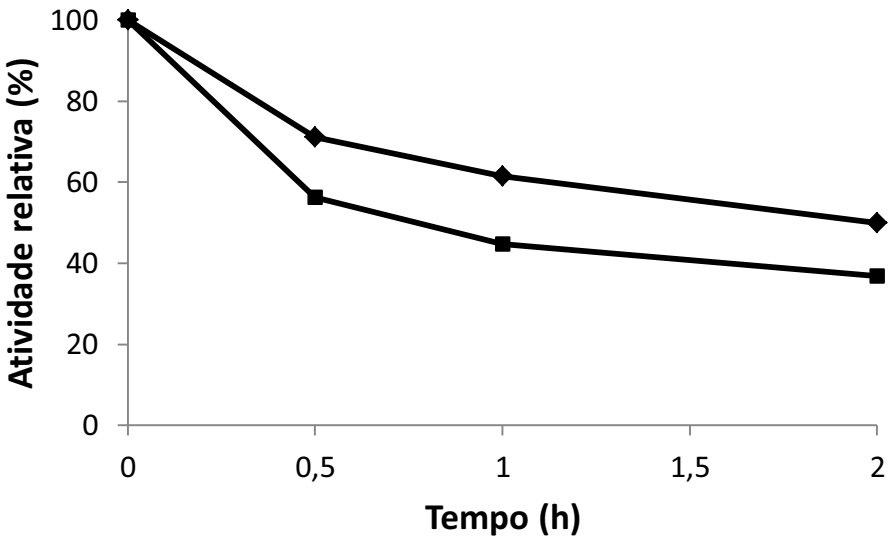

Figura 29 – Inativação térmica dos derivados CNBr-agarose de xilanases produzidas por *Aspergillus niger*. (♦) Xilanase I; (■) Xilanase II. Os experimentos foram realizados a 60°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

Para se verificar a estabilidade dos derivados glioxil de ambas as frações, os mesmos foram submetidos à inativação térmica, a 75°C. O derivado obtido com a enzima purificada (xil I) foi, aproximadamente, cinco vezes mais estável que o outro (com xil II) (Figura 30).

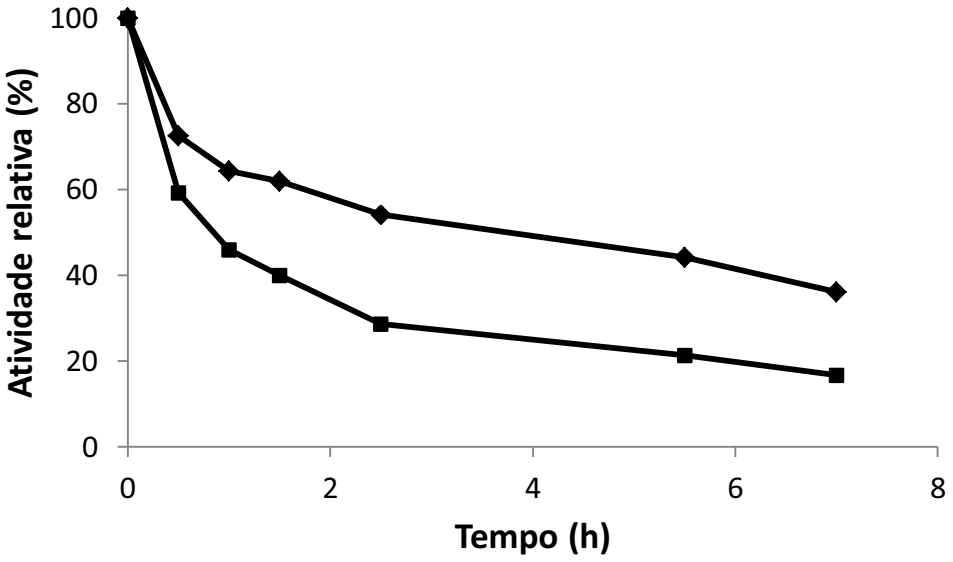

Figura 30 – Inativação térmica dos derivados Glioxil-agarose de xilanases produzidas por *Aspergillus niger*. (♦) Xilanase I; (■) Xilanase II. Os experimentos foram realizados a 75°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

Uma vez observado que a xilanase I foi purificada de forma simples, que se unia rapidamente a glioxil e que ainda foi o derivado mais estável, os seguintes experimentos foram realizados com o objetivo de se verificar e se melhorar a estabilização da estrutura tridimensional da enzima. Assim, diferentes derivados foram preparados controlando-se as condições de imobilização, como o tempo extra de incubação em pH 10,0, após união proteína-suporte, o grau de ativação dos suportes e a porcentagem de ligações cruzadas da agarose utilizada.

O processo de imobilização em pH alcalino e em suportes altamente ativados pode ocorrer de forma rápida, muitas vezes em poucos minutos. No entanto, nesse momento, a proteína pode estar apenas imobilizada ao suporte (por, pelo menos, dois pontos), e a máxima intensidade da reação enzima-suporte pode não ter sido alcançada (Figura 31). Uma vez que o suporte e a proteína não possuem estruturas complementares, a enzima perde sua flexibilidade após as primeiras ligações; assim, novas uniões podem apresentar maior dificuldade para acontecer, requerendo tempos mais prolongados de imobilização. Como consequência, consegue-se o correto alinhamento entre os grupos reativos da enzima e os do suporte (MATEO et al., 2006).

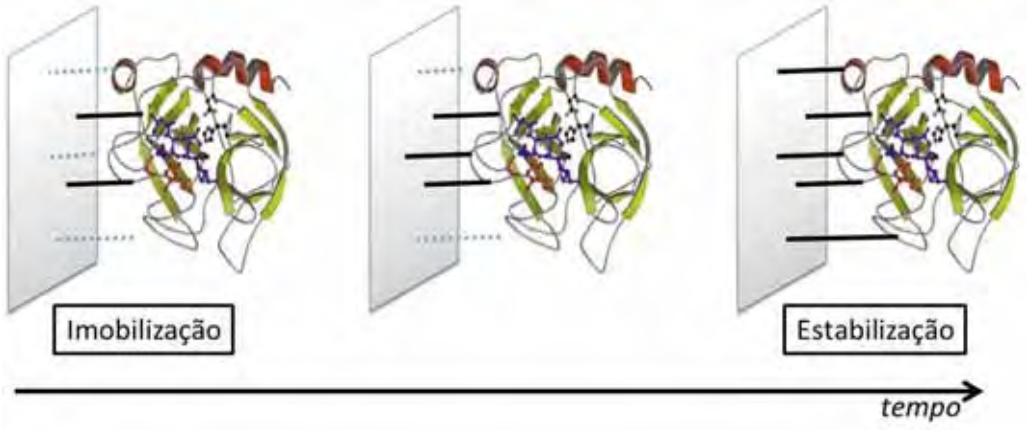

Figura 31 – Imobilização *versus* estabilização. A ocorrência de novas ligações enzima-suporte, após imobilização, pode depender de um maior tempo de contato.

Após o processo de imobilização, amostras do derivado xil I-glioxil-agarose foram filtradas e submetidas a diferentes tempos de incubação em pH 10,0, antes de serem reduzidas com boroidreto de sódio (Figura 32).

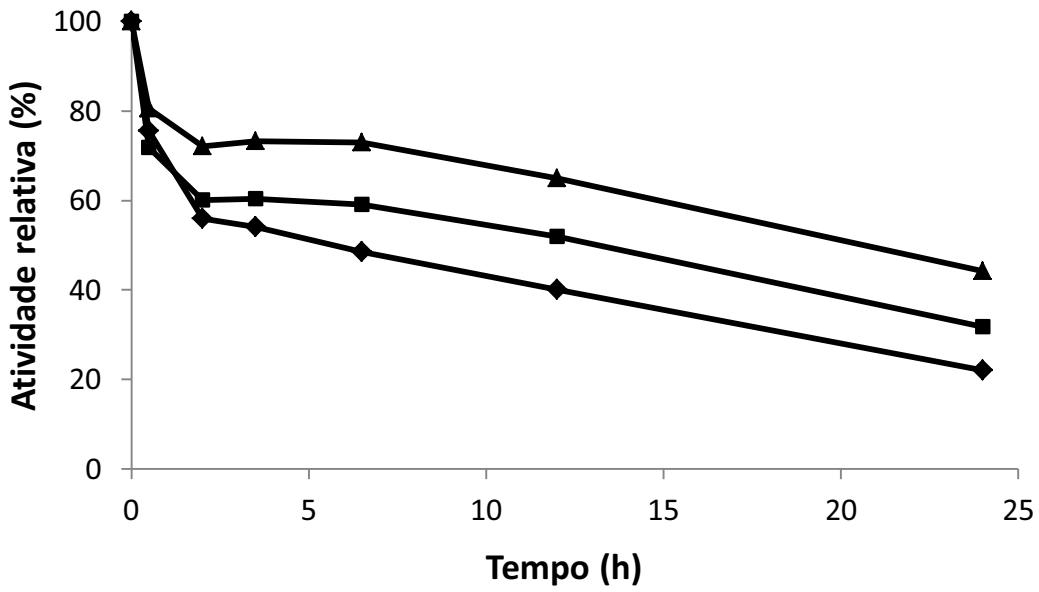

Figura 32 – Inativação térmica dos derivados submetidos a diferentes tempos de incubação em pH 10,0, após imobilização da xilanase I em glioxil-agarose 10 CL. (♦) sem incubação; (■) 5 horas; (▲) 20 horas. Os experimentos foram realizados a 70°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

Observa-se que há o aumento das uniões multipontuais covalentes entre as lisinas da enzima e os grupos aldeídos do suporte, produzindo derivados mais estáveis. De fato, a incubação em pH 10,0, por 20 horas, torna o derivado pelo menos três vezes mais estável que o controle e duas vezes mais que o incubado por cinco horas.

A agarose 10 CL pode ser totalmente ativada com 180-220 µmol de grupos glioxil por ml de gel. O grau de ativação do suporte permite controlar a intensidade da interação proteína-suporte. Dessa forma, pode-se reduzir esse grau ao nível desejado, visando à diminuição de uma possível distorção da enzima (MATEO et al., 2006).

Para verificação desse efeito, os suportes foram ativados com menores quantidades de grupos aldeídos por ml de gel. Quanto mais grupos aldeídos disponíveis para a união com a proteína, maior estabilidade foi alcançada pelo derivado, comprovando a ocorrência de mais uniões suporte-proteína sem graves alterações estruturais na enzima. O derivado obtido do suporte contendo apenas 22 µmol de grupos reativos por ml de gel foi consideravelmente menos estável, o que era esperado, por limitar a formação de uniões multipontuais. Quando se aumenta a quantidade de grupos reativos na superfície do gel, os derivados tornam-se também mais estáveis (Figura 33).

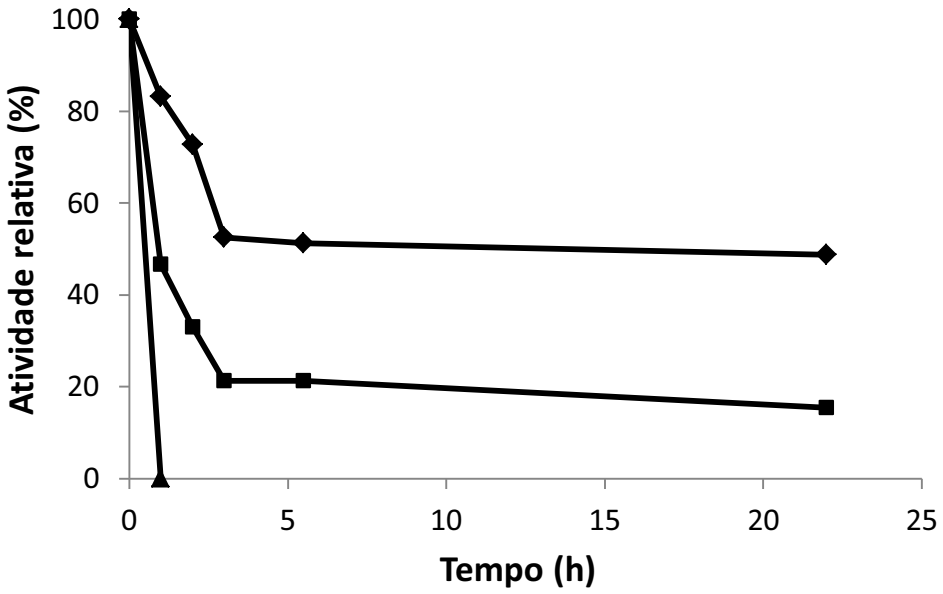

Figura 33 – Inativação térmica dos derivados xilanase I-glioxil-agarose 10 CL produzidos com diferentes graus de ativação. Suportes contendo 90 µmol de grupos reativos por ml de gel (♦), 45 µmol de grupos reativos por ml de gel (■) e 22 µmol de grupos reativos por ml de gel (▲). Os experimentos foram realizados a 70°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

Finalmente, foram produzidos derivados com uso de agarose com diferentes graus de ligações cruzadas (Figura 34). Quando utilizada a agarose 4 CL (4% de *crosslinking*), observou-se uma diminuição na estabilidade do derivado, devido à menor quantidade de grupos reativos com que se pode ativar esse gel (40 µmol de grupos glioxil por ml).

Consequentemente, na agarose 10 CL, maior superfície proteica estará em contato com o suporte, e maior multi-interação suporte-proteína é possível (MATEO et al., 2006).

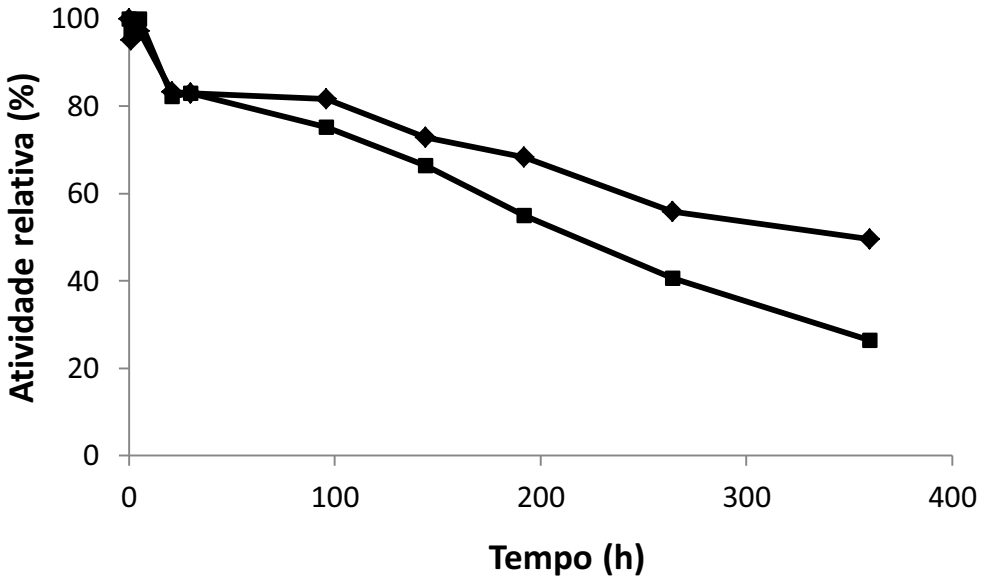

Figura 34 – Inativação térmica dos derivados xilanase I-glioxil-agarose obtidos de agaroses 4 e 10 CL. (■) agarose 4 CL; (♦) agarose 10 CL. Os experimentos foram realizados a 60°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

4.1.8 Estabilidade do derivado xil I-glioxil-agarose ao pH

Uma vez comprovada a estabilização da estrutura terciária da enzima, o derivado xil I-glioxil-agarose foi produzido com agarose 10 CL completamente ativada com grupos aldeídos (180 µmoles por ml de gel), sendo mantido incubado por 20 horas, em pH 10,0, antes de ser reduzido com boroidreto de sódio.

Esse derivado teve sua estabilidade térmica comparada com a do xil I-CNBr-agarose. Ambos foram incubados em pH 5,0, 7,0 e 9,0, todos a 60°C (Figuras 35 e 36). O aumento do pH causou a diminuição da estabilidade em ambos os derivados.

O derivado xil I-glioxil-agarose, em pH 5,0, foi 150 vezes mais estável que o xil I-CNBr-sepharose, no mesmo pH, e quase 20 vezes mais estável que o derivado glioxil, em pH 7,0 (Figura 36).

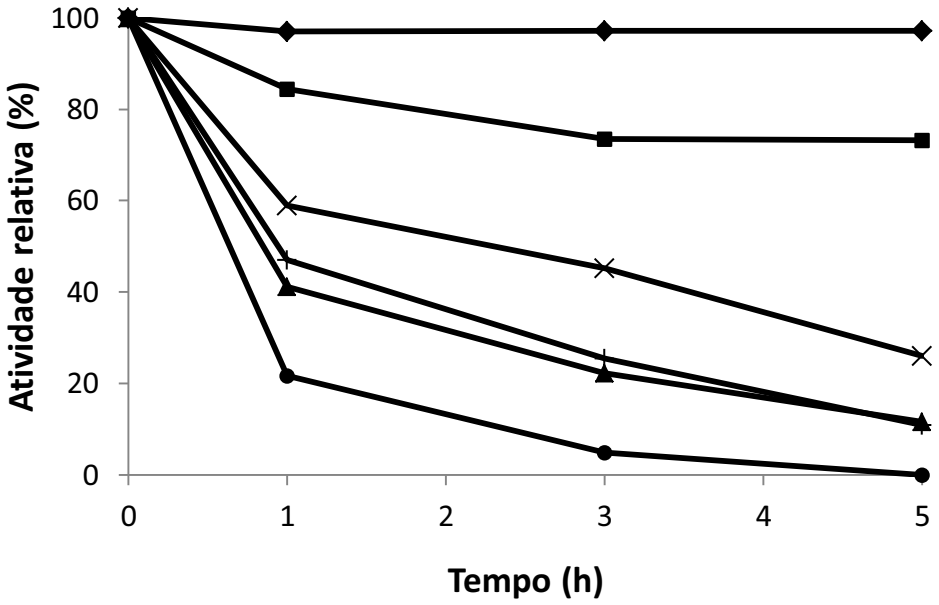

Figura 35 – Inativação térmica dos derivados de xilanase I em glioxil-agarose e CNBr-sepharose, em diferentes valores de pH. Glioxil-agarose: pH 5,0 (♦); pH 7,0 (■); pH 9,0 (▲); CNBr-sepharose: pH 5,0 (**x**); pH 7,0 (**+**); pH 9,0 (●). Os experimentos foram realizados a 60°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

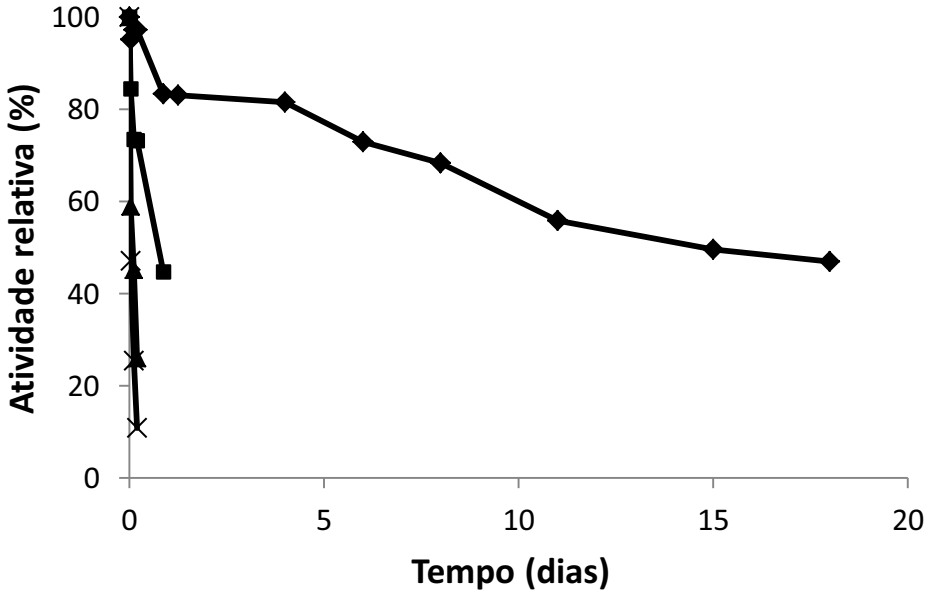

Figura 36 – Inativação térmica dos derivados de xilanase I em glioxil-agarose e CNBr-sepharose, em diferentes valores de pH. Glioxil-agarose: pH 5,0 (♦); pH 7,0 (■); CNBr-sepharose: pH 5,0 (▲); pH 7,0 (x). Os experimentos foram realizados a 60°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

4.1.9 Temperatura ótima do derivado xil-glioxil-agarose

As atividades dos derivados glioxil-agarose e CNBr-sepharose foram também observadas em diferentes temperaturas (Figura 37). Xil I-glioxil-agarose mostrou-se ativo a

temperaturas mais altas, com um significante aumento de 10°C em sua temperatura ótima de atividade, em pH 5,0, comparado com o xil I-CNBr-sepharose.

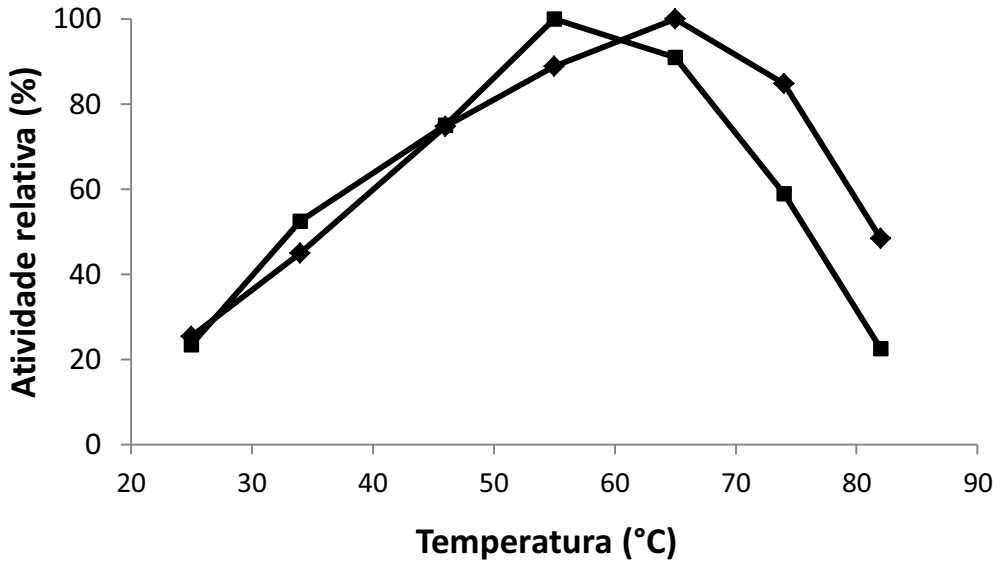

Figura 37 – Influência da temperatura na atividade enzimática da xilanase I, imobilizada em glioxil-agarose e em sepharose ativada com CNBr. (♦) glioxil-agarose 10 CL; (■) CNBr-sepharose. Os ensaios de atividade foram realizados em pH 5,0.

4.1.10 Hidrólise de xilana pelo derivado xil I-glioxil-agarose

O derivado xil I-glioxil-agarose teve seu produto inicialmente analisado por cromatografia em camada delgada, pela hidrólise de 4% (m/v) de xilana, a 37°C. Nota-se a diminuição qualitativa de XOS com grau de polimerização (DP) maior que quatro, com a formação de XOS menores (incluindo xilose), ao longo do tempo (Figura 38).

Em seguida, foi realizada a hidrólise da xilana *beechwood* pelo derivado xil I-glioxil-agarose, a 4, 25 e 55°C (Figura 39).

Figura 38 – Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana *beechwood* pelo derivado xil I-glioxil-agarose de *A. niger*, em diferentes tempos, a 37°C. X1: padrão de xilose; X2: padrão de xilobiose.

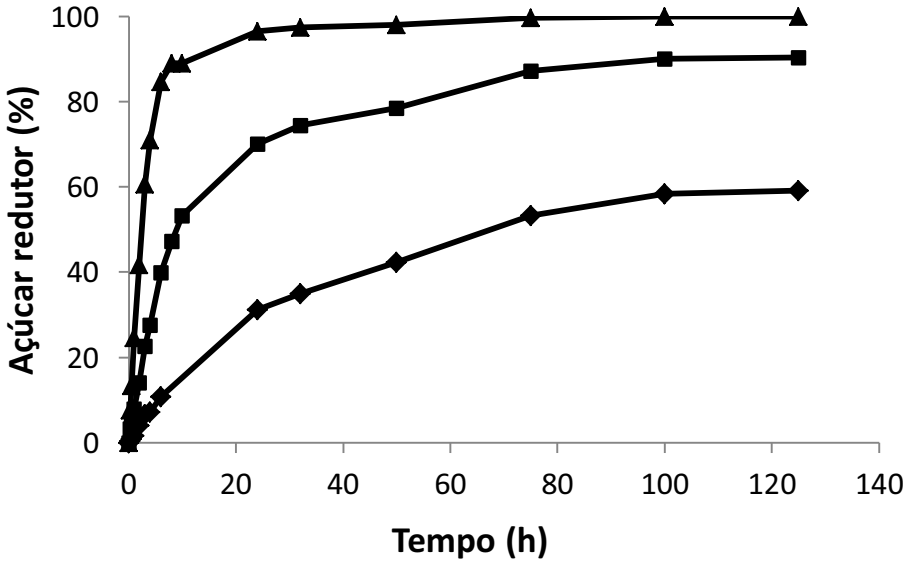

Figura 39 – Curso de hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v) pelo derivado xil I-glioxil-agarose 10 CL, em diferentes temperaturas. (♦) 4°C; (■) 25°C; (▲) 55°C. Os experimentos foram realizados em pH 5,0.

Quanto mais alta a temperatura, mais rapidamente foi alcançada a hidrólise total da xilana. Por exemplo, a 55°C, a hidrólise estava quase completa após 24 horas, com 90% de açúcares redutores formados. No mesmo tempo, a 4°C, apenas 10% de açúcares redutores foram produzidos.

A Figura 40 representa o cromatograma HPAEC-PAD de dois tempos distintos da hidrólise de xilana, a 55°C: com duas horas de hidrólise (A), quando há a formação de aproximadamente 45% de açúcares redutores; ao final da hidrólise (B), quando se nota o aparecimento majoritário de xilose, xilobiose e, em menor quantidade, xilotriose.

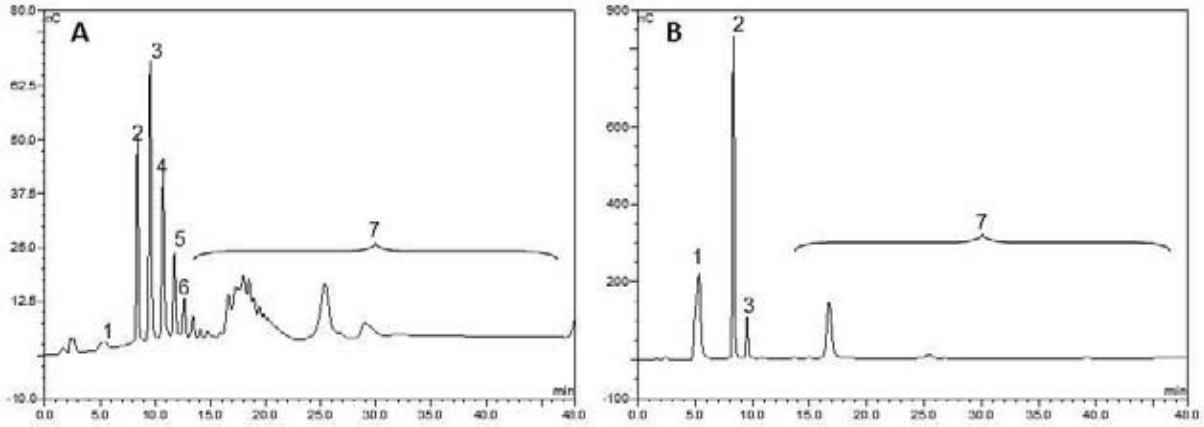

Figura 40 – Cromatograma HPAEC-PAD da hidrólise de xilana *beechwood* pelo derivado xil I-glioxil-agarose. (A) 2 horas de hidrólise (44% de AR); (B) 125 horas de hidrólise (100% de AR), a 55°C. 1) xilose, 2) xilobiose, 3) xilotriose, 4) xilotetraose, 5) xilopentose, 6) xilohexose e 7) outros XOS de DP>6.

O perfil de XOS produzidos em vários tempos de reação e em diversas temperaturas é mostrado na Tabela 11. Quando comparados com diferentes temperaturas de hidrólise e similares quantidades de açúcares redutores formadas, as menores temperaturas favoreceram a formação de compostos com 1-3 unidades de xilose. Quando se aumentou a temperatura, favoreceu-se a formação de XOS com DP>4 unidades de xilose. Isso pode ser facilmente observado quando a quantidade de açúcares redutores se encontra entre 42 e 45%, nas diferentes temperaturas. Esse é um ponto importante, uma vez que, dependendo da composição do produto final desejado, a hidrólise pode ser controlada não apenas pela remoção do derivado, quando o grau de hidrólise é alcançado, mas também pelo ajuste da temperatura do meio de reação.

Nota-se, também, que aproximadamente 70% da xilana foram hidrolisados a 55°C, o que é interessante pelo fato de a xilana possuir diversas ramificações nos carbonos 2 e 3, nas quais a endoxilanase não é específica, sendo, portanto, inativa.

Tabela 11 – Formação de XOS, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), em diferentes temperaturas, pelo derivado xil I-glioxil-agarose

T (°C)	t (h)	Açúcar redutor (%)	% carboidratos totais (m/m)						
			X1	X2	X3	X4	X5	X6	Outros XOS
-	-	4,5 (Controle)	0,00	0,00	0,00	14,03	4,56	5,72	75,69
4	0,5	5,3	0,00	0,00	0,00	19,61	6,82	7,93	65,64
	1	6,1	0,00	0,00	0,00	11,81	4,62	5,04	78,53
	24	34,3	0,73	16,42	10,58	7,93	3,12	1,90	57,95
	50	44,9	1,20	21,10	13,68	6,34	1,93	1,09	54,66
	75	55,5	1,93	25,36	14,21	4,86	1,22	0,75	51,67
	125	61,5	3,15	31,25	14,04	3,08	0,68	0,52	47,28
25	0,5	8,6	0,00	0,43	0,00	11,75	4,96	5,11	77,94
	1	12,1	0,00	3,04	2,41	9,52	4,37	3,88	76,78
	24	42,7	0,13	12,88	10,73	7,70	3,48	2,02	63,06
	32	75,7	3,26	35,37	14,33	2,43	0,47	0,43	43,71
	125	90,9	7,87	45,09	8,50	1,00	0,25	0,32	36,98
55	0,5	17,3	0,00	3,45	3,56	8,39	4,52	3,75	76,33
	1	28,0	0,00	6,30	7,09	8,32	4,86	3,41	70,02
	2	44,4	0,00	8,53	9,32	7,98	4,86	3,20	66,12
	10	89,6	1,74	31,06	17,34	5,25	0,77	0,43	43,42
	24	96,8	4,89	42,54	15,54	1,12	0,24	0,29	35,38
	100	100,0	10,23	52,01	4,86	0,65	0,25	0,32	31,68

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; X6: xilohexose.

Comparando-se o perfil de hidrólise das xilanas *beechwood* e *birchwood*, verifica-se que as curvas (Figura 41) e as porcentagens dos produtos obtidos (Tabela 12) são muito parecidas.

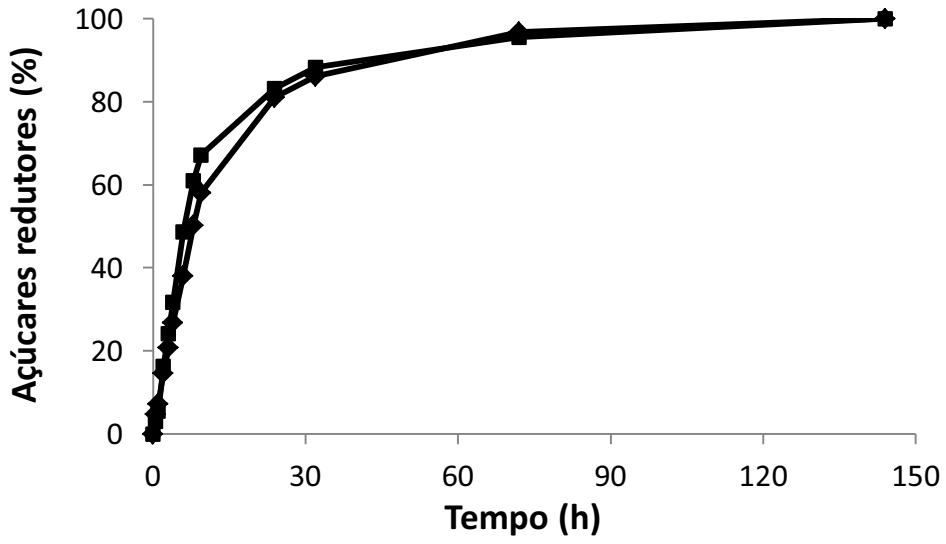

Figura 41 – Curso de hidrólise de xilanas *beechwood* e *birchwood* pelo derivado xilanase glioxil-agarose. (♦) xilana *beechwood* 4% (m/v); (■) xilana *birchwood* 4% (m/v). Os experimentos foram realizados a 25°C e em pH 5,0. Os dados representam a média de três experimentos independentes.

Tabela 12 – Formação de XOS, após hidrólise das xilanas *beechwood* 4% (m/v) e *birchwood* 4% (m/v), pelo derivado xil I-glioxil-agarose

Xilana	t (h)	Açúcar redutor (%)	% carboidratos totais (m/m)						
			X1	X2	X3	X4	X5	X6	Outros XOS
Beechwood	-	4,5 (Controle)	0,00	0,00	0,00	14,03	4,56	5,72	75,69
	1	7,2	0,00	6,92	0,81	7,91	4,63	4,28	75,44
	4	26,8	0,00	10,00	6,55	7,87	5,03	3,85	66,69
	8	50,3	0,00	14,57	10,11	8,19	4,46	2,91	59,76
	24	81	2,34	32,29	15,99	4,34	1,00	0,67	43,37
	144	100	8,82	49,99	4,96	0,89	0,30	0,75	34,29
Birchwood	-	5,8 (Controle)	0,00	0,00	0,00	15,65	5,02	6,43	72,90
	2	16,3	0,00	5,34	5,97	6,88	5,15	4,24	72,42
	4	31,7	0,00	9,17	8,96	7,83	5,00	3,61	65,43
	6	48,6	0,01	12,82	11,04	8,02	4,31	2,76	61,03
	24	83,2	3,07	35,20	15,27	2,15	0,59	0,54	43,17
	144	100	8,62	50,84	2,37	0,81	0,30	0,39	36,66

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; X6: xilohexose.

Quando testada a hidrólise da xilana *beechwood* em pH 5,0 e 7,0, a 25°C, pelo derivado xilanase I-glioxil-agarose, apenas 80% de hidrólise estavam completos em pH 7,0, quando a hidrólise em pH 5,0 foi finalizada. A Tabela 13 mostra que, ao se compararem graus de hidrólise mais elevados (aproximadamente 80% AR), em pH 7,0, há a tendência de produção de XOS de menores graus de polimerização (X1-X3). Em pH 5,0, esses XOS aparecem em maiores quantidades que em pH 7,0 quando o grau de hidrólise é menor, por exemplo, quando há a formação de 25% de açúcares redutores.

Tabela 13 – Formação de XOS, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), em diferentes valores de pH, pelo derivado xil I-glioxil-agarose

pH de hidrólise	t (h)	Açúcar redutor (%)	% carboidratos totais (m/m)						
			X1	X2	X3	X4	X5	X6	Outros XOS
-	-	4,5 (Controle)	0,00	0,00	0,00	17,43	4,91	6,18	71,48
5,0	2	25,1	0,08	11,24	5,31	7,79	3,69	2,63	69,26
	6	47,9	0,08	10,47	7,78	8,22	3,75	2,49	67,20
	24	82,7	0,11	11,56	10,20	7,73	3,49	1,99	64,92
7,0	4	25,0	0,00	3,74	4,25	9,16	4,14	3,03	75,69
	8	43,5	0,00	7,34	7,80	8,09	3,88	2,35	70,54
	32	76,8	1,09	18,27	13,77	6,89	1,92	0,83	57,24

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; X6: xilohexose.

O perfil de hidrólise foi também verificado quando se utilizaram os derivados obtidos com as xilanases I e II (Tabela 14), em pH 5,0 e a 25°C. A xilanase II parece possuir menor atividade de exoxilanase, uma vez que produz de 65 a 70% menos xilose que xilanase I, ao se compararem graus de hidrólise semelhantes.

Tabela 14 – Formação de XOS, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), pelos derivados glioxil-agarose obtidos com as enzimas xilanase I e xilanase II

Derivado	t (h)	Açúcar redutor (%)	% carboidratos totais (m/m)						
			X1	X2	X3	X4	X5	X6	Outros XOS
-	-	4,5 (Controle)	0,00	0,00	0,00	14,03	4,56	5,72	75,69
Xil I-glioxil-agarose	6	47,0	0,13	12,88	10,73	7,70	3,48	2,02	63,06
	32	83,4	3,26	35,37	14,33	2,43	0,47	0,43	43,71
	125	100	7,87	45,09	8,50	1,00	0,25	0,32	36,98
Xil II-glioxil-agarose	24	51,7	0,04	15,21	11,44	7,38	3,18	1,82	60,93
	125	83,3	1,20	33,33	11,36	3,63	0,87	0,52	49,10

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; X6: xilohexose.

4.2 Xilanase de *Aspergillus versicolor*

4.2.1 Produção da xilanase

A endoxilanase foi produzida em meio Vogel, por 72 horas, a 25°C, com uma atividade de 45 U.mg de proteína^{-1}. Essa enzima, de 21 kDa, não apresentou atividade celulolítica detectável e foi majoritária no extrato bruto (Figura 43, raia 2). Mostrou-se bastante estável em pH alcalino, mantendo 100% de atividade após 12 horas de incubação em pH 10,0, a 25°C (dados não mostrados).

4.2.2 Imobilização da xilanase

A xilanase foi imobilizada em agarose 6 CL ativada com 95 µmol de grupos glioxil, PEI, MANAE ou glutaraldeído por ml de gel. Foram oferecidas 18 U de enzima por grama de suporte. Os suportes iônicos, como PEI-agarose e MANAE-agarose, não foram apropriados para a imobilização dessa enzima (Tabela 15). Isso pode ser explicado pelo fato de tratar-se de uma glicoproteína com 71% de carboidrato, como descrito por Carmona et al. (1998), o

que pode dificultar as interações iônicas entre o suporte e as regiões carregadas negativamente da superfície proteica. Por outro lado, quase toda enzima uniu-se ao suporte glutaraldeído-agarose, no qual a proteína se liga por seu amino-terminal. No entanto, a atividade recuperada manteve-se em torno de apenas 30%.

Tabela 15 – Rendimento de imobilização e atividade recuperada da xilanase de *A. versicolor*, imobilizada em agarose com diferentes ativações

Suporte	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade recuperada (%)
Glioxil-agarose	88	84
Glutaraldeído-agarose	97	32
MANAE-agarose	34	12
PEI-agarose	19	6

Os suportes foram preparados como descrito em Métodos.

O melhor suporte testado para a imobilização da xilanase de *Aspergillus versicolor* foi o glioxil-agarose. Aproximadamente 90% da enzima ligaram-se ao suporte após uma hora, retendo 84% da atividade (Figura 42).

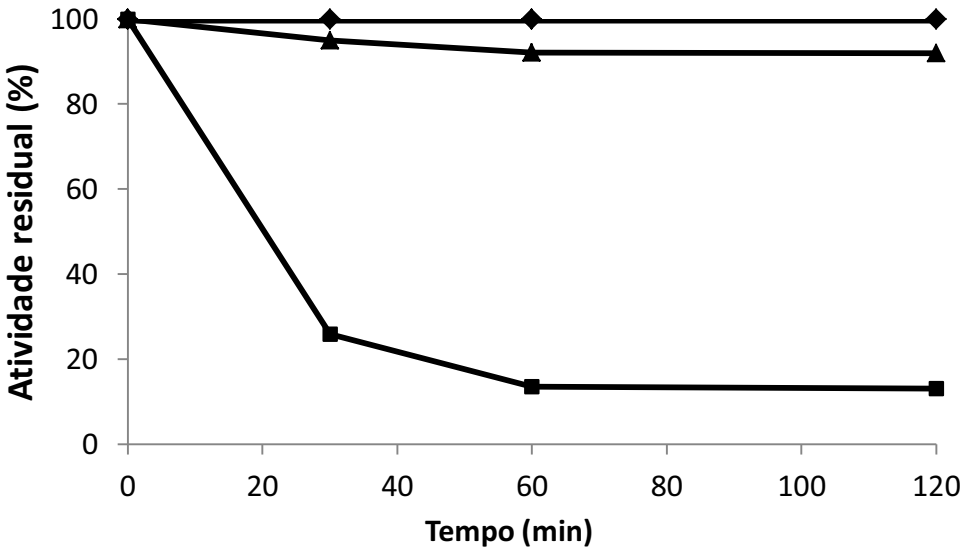

Figura 42 – Curso de imobilização da xilanase de *A. versicolor* em glioxil-agarose 6 CL. (♦) controle (enzima solúvel); (■) sobrenadante; (▲) suspensão. A imobilização foi realizada em tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 10,0, a 25°C, sob suave agitação. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

Como já visto, a ocorrência de múltiplas xilanases é observada em diversos microrganismos, como o *Aspergillus niger*, que pode secretar até cinco diferentes xilanases (BIELY, 1985). Isso pode explicar o motivo de parte da enzima oferecida não se imobilizar,

mesmo após duas horas de incubação. Ou seja, uma das isoformas pode conter maior quantidade de resíduos de lisina expostos na superfície da proteína, de modo que apenas essa se imobilize. De fato, Carmona et al. (1998; 2005) purificaram duas xilanases de *Aspergillus versicolor*, sendo uma majoritária (xil I) e outra existente em pequenas proporções no extrato bruto (xil II). De acordo com as características observadas — massa molecular, estabilidade térmica e temperatura ótima —, a enzima aqui estudada é a xilanase I, produzida em maior quantidade pelo fungo.

A Figura 43 mostra o gel de eletroforese, em condições desnaturantes, do extrato bruto de *Aspergillus versicolor* e do derivado xil I-glioxil-agarose, antes (raia 3) e após (raia 4) a redução com boroidreto de sódio. Como se observa, a xilanase liga-se ao suporte, formando uma base de Schiff reversível que, após redução com $NaBH_4$, mantém a enzima covalentemente ligada ao suporte, mesmo em condições desnaturantes, confirmando a imobilização irreversível da xilanase.

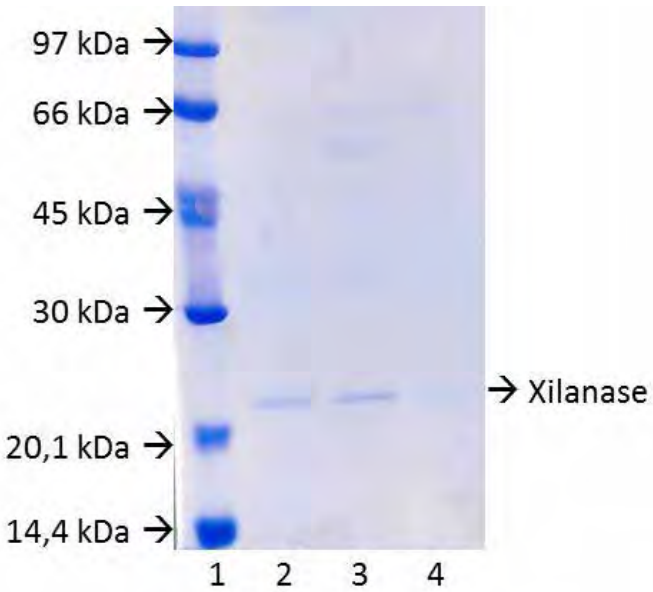

Figura 43 – SDS-PAGE da xilanase de *A. versicolor*. Raias: (1) marcador de massa molecular; (2) extrato bruto proteico; (3) xilanase imobilizada em suporte glioxil-agarose, antes da redução com boroidreto de sódio; (4) xilanase imobilizada em suporte glioxil, após redução com boroidreto de sódio. Os experimentos foram realizados como descrito em Métodos.

4.2.3. Estudo da estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima solúvel e dos melhores derivados obtidos (glutaraldeído-agarose e glioxil-agarose) foi investigada. A meia-vida foi de 17 minutos e

25 minutos para a enzima solúvel e para o derivado xil I-glutaraldeído-agarose, respectivamente (Figura 44). A baixa estabilidade deste último é explicada por tratar-se de um suporte que, de modo geral, não confere estabilidade à proteína, uma vez que as interações covalentes entre proteína e suporte ocorrem, em pH neutro, por meio do amino-terminal da enzima, o único reativo nessas condições. Assim, não há a formação de ligações multipontuais, originando um derivado com propriedades similares àquelas da enzima solúvel (GUISÁN et al., 1997; MATEO et al., 2005).

Por outro lado, o suporte glioxil-agarose conferiu mais estabilidade à estrutura terciária da enzima, uma vez que as proteínas são imobilizadas, por meio da região mais rica em resíduos de lisina, por um mecanismo multipontual que promove a estabilização da estrutura tridimensional da enzima (GUISÁN, 1988; MATEO et al., 2005). Assim, o derivado xil I-glioxil-agarose manteve quase 100% da atividade após duas horas de incubação a 60°C, sendo estável por longo período, com uma meia-vida de 68 horas. O fator de estabilização foi de 240, comparado com a enzima solúvel, e de 160, comparado com a ligação unipontual da enzima ao suporte ativado com glutaraldeído, o que demonstra o efeito da imobilização covalente multipontual no enrijecimento da estrutura terciária da proteína, refletindo em sua estabilidade.

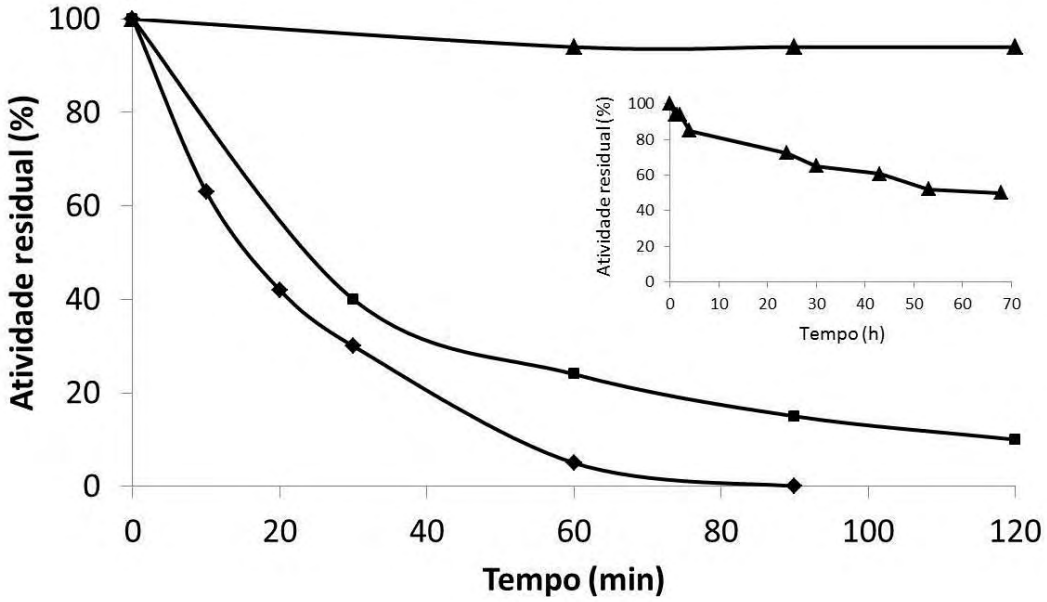

Figura 44 – Inativação térmica dos derivados e da enzima solúvel de *A. versicolor*. (♦) enzima solúvel; (■) derivado xilanase-glutaraldeído-agarose; (▲) derivado xilanase-glioxil-agarose. O gráfico interno representa a continuação da inativação térmica até o alcance da meia-vida pelo derivado xilanase-glioxil-agarose. O experimento foi realizado a 60°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

4.2.4 Melhora da estabilidade do derivado xil I-glioxil-agarose

É descrito que algumas enzimas possuem a estabilidade aumentada com uma incubação extra em pH 10,0, após o processo de imobilização e antes da redução do derivado com boroidreto de sódio. Dessa forma, novas interações entre proteína e suporte podem ser formadas (MATEO et al., 2006). Uma vez verificado que o derivado xil I-glioxil-agarose foi o mais estável, ele foi incubado em pH 10,0, por diferentes tempos, e a estabilidade térmica foi estudada (Figura 45).

A máxima estabilidade foi obtida após 24 horas de incubação em pH 10,0. Nessa condição, o derivado mostrou-se três vezes mais estável que o controle, que já havia apresentado um fator de estabilização de 240. Sendo assim, pode-se assumir que esse novo derivado é, pelo menos, 600 vezes mais estável que a enzima solúvel. Tomando-se por base a literatura científica, esse deve ser o maior fator de estabilização de uma xilanase imobilizada.

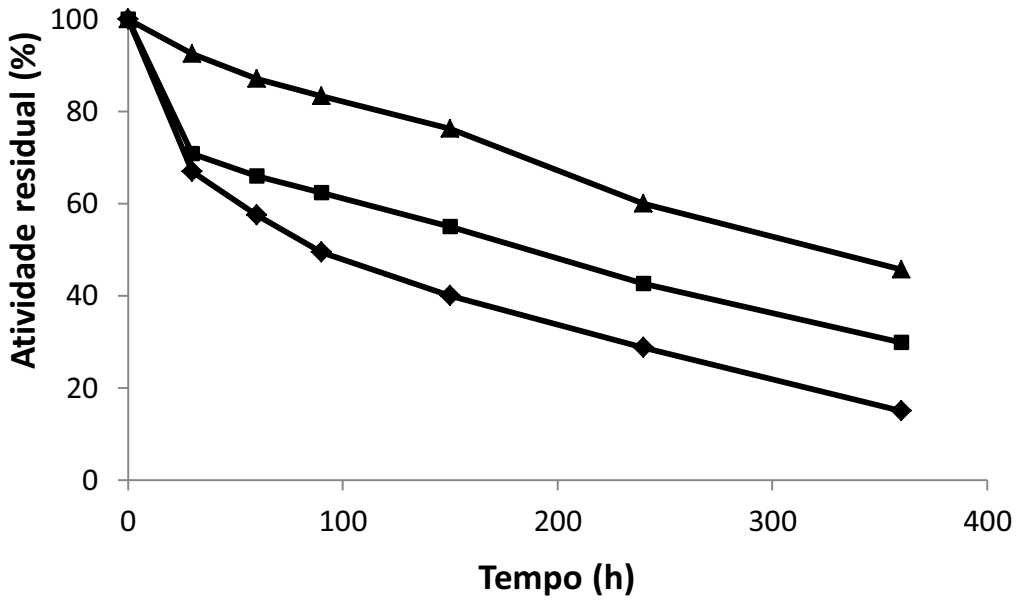

Figura 45 – Inativação térmica dos derivados xil I-glioxil-agarose com diferentes tempos de incubação em pH 10,0, após 1 hora de imobilização e antes da redução com boroidreto de sódio. (♦) sem incubação; (■) 8 h de incubação; (▲) 24 h de incubação. O experimento foi realizado a 70°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0.

4.2.5 Influência da temperatura na atividade enzimática

A temperatura ótima do derivado foi na faixa de 55-60°C (Figura 46). A enzima solúvel, a 60°C, perdeu 15% de sua atividade. Isso demonstra outro efeito da estabilização da estrutura terciária da enzima xilanase, ou seja, a rigidificação da estrutura terciária da enzima possibilita seu uso em temperaturas mais elevadas.

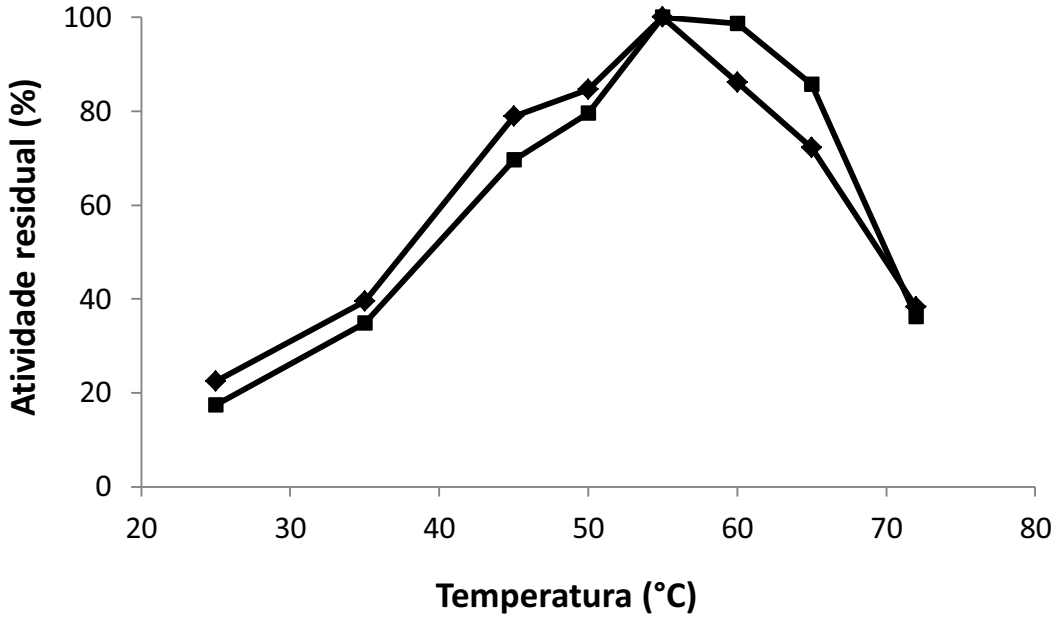

Figura 46 – Influência da temperatura na atividade enzimática da enzima solúvel e do derivado xil I-glioxil-agarose. (■) xil I-glioxil-agarose; (♦) enzima solúvel. A atividade foi verificada em pH 5,0 e a 25°C.

4.2.6 Influência do pH na hidrólise da xilana

Quando realizada a hidrólise da xilana *birchwood* pelo derivado xil I-glioxil-agarose, com variação de pH e a 25°C, notou-se que, em valores extremos de pH, a formação de açúcares redutores é muito baixa, enquanto que, em pH 5,0, a hidrólise alcançou 100% de liberação após sete horas de reação (Figura 47).

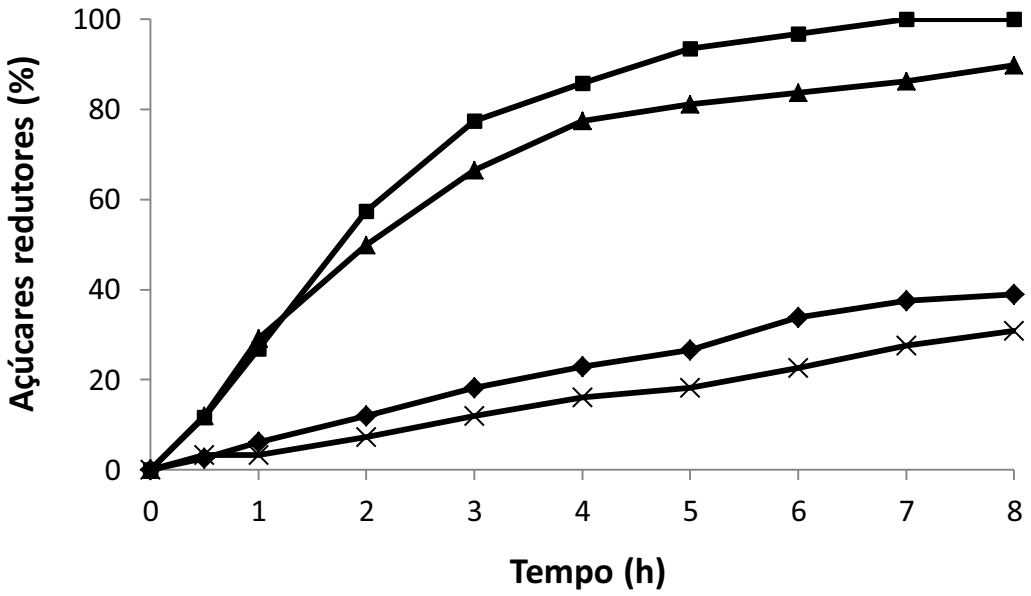

Figura 47 – Curso de hidrólise da xilana birchwood 4% (m/v) pelo derivado xil I-glioxil-agarose, em diferentes valores de pH, a 25°C. (♦) pH 3,0; (■) pH 5,0; (▲) pH 7,0; (**x**) pH 9,0.

4.2.7 Produção de XOS em reator de leito empacotado

O derivado demonstrou-se ideal para ser utilizado em um reator para produção de XOS, uma vez que apresentou ótima estabilidade em altas temperaturas, assim como eficiência para reações de longos períodos e capacidade de reúso. Empregou-se xil I-glioxil-agarose em um reator de leito empacotado, a 60°C, para hidrolisar a fração solúvel de xilana *birchwood* 4% (m/v), permitindo uma síntese contínua de XOS, sem que houvesse contaminação do produto pela enzima.

Quando testado o derivado no modo de operação contínua (sem recirculação), houve liberação de 56% (30 minutos) e 70% (4 horas) de açúcares redutores com fluxos de 60 $ml.h^{-1}$ e 12 $ml.h^{-1}$, respectivamente. Como esperado, um fluxo mais baixo favorece o contato do substrato com o derivado por mais tempo, aumentando a formação do produto. No modo de operação contínuo com recirculação, em fluxo de 60 $ml.h^{-1}$, a liberação de 100% de açúcares redutores ocorreu em quatro horas.

Esses produtos de hidrólise foram aplicados em cromatografia em camada delgada (Figura 48).

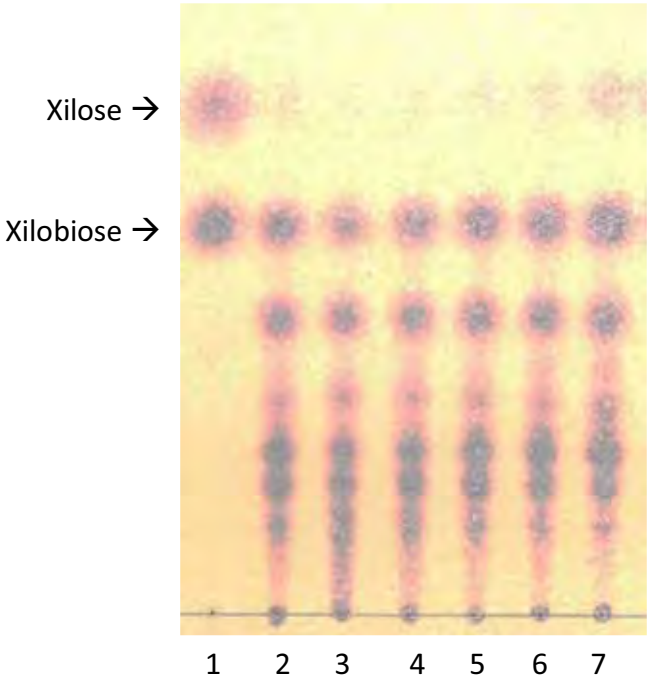

Figura 48 – Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana *birchwood* 4% (m/v) pelo derivado xil I-glioxil-agarose, em reator de leito empacotado. (1) padrão de xilose e xilobiose; (2) fluxo lento (12 $ml.h^{-1}$) sem recirculação (70%). As demais amostras foram retiradas em diferentes tempos, no modo com recirculação: (3) 0,5 h (55%); (4) 1 h (70%); (5) 1,5 h (80%); (6) 2 h (90%); (7) 4 h (100%). As porcentagens representam a quantidade aproximada, relativa ao total de açúcares redutores formados ao final da hidrólise. Os experimentos foram feitos conforme descrito em Métodos.

Formou-se uma mistura homogênea de XOS, com diminuição daqueles com baixo grau de polimerização, ao longo do tempo. Após uma hora e meia, verificou-se o aparecimento de uma pequena quantidade de xilose. Uma vez que os estudos indicam que a xilobiose e a xilotriose parecem causar melhores efeitos como prebióticos (AACHARY; PRAPULLA, 2011), os resultados são interessantes, pois esses açúcares foram produzidos desde a primeira vez que o substrato passou pelo reator.

Foi também realizada uma hidrólise, objetivando-se comparar o produto do derivado com o da enzima solúvel. Para que o aparecimento de xilose fosse mínimo, o processo de hidrólise foi feito até o ponto de 80% de formação de açúcares redutores (Figura 49). Nota-se uma mistura muito semelhante entre ambos, demonstrando que a imobilização multipontual garantiu estabilidade ao catalisador, porém sem qualquer alteração na seletividade da enzima.

Figura 49 – Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana *birchwood* 4% (m/v) pela enzima solúvel e pelo derivado xil I-glioxil-agarose. (1) xilana 4% (m/v); (2) padrão de xilose; (3) padrão de xilobiose; (4) hidrólise realizada pela enzima solúvel; (5) hidrólise realizada pelo derivado xil I-glioxil-agarose. Os experimentos foram feitos conforme descrito em Métodos, e os pontos correspondem ao ponto de 80% de hidrólise.

4.2.8 Reúso do derivado

Optou-se, novamente, por realizar diversos ciclos de reação com duração de uma hora, quando ocorreu a liberação de aproximadamente 80% de açúcares redutores, visando a uma menor produção de xilose. Após dez ciclos consecutivos, a taxa de hidrólise manteve-se constante e sem qualquer perda de atividade (Figura 50).

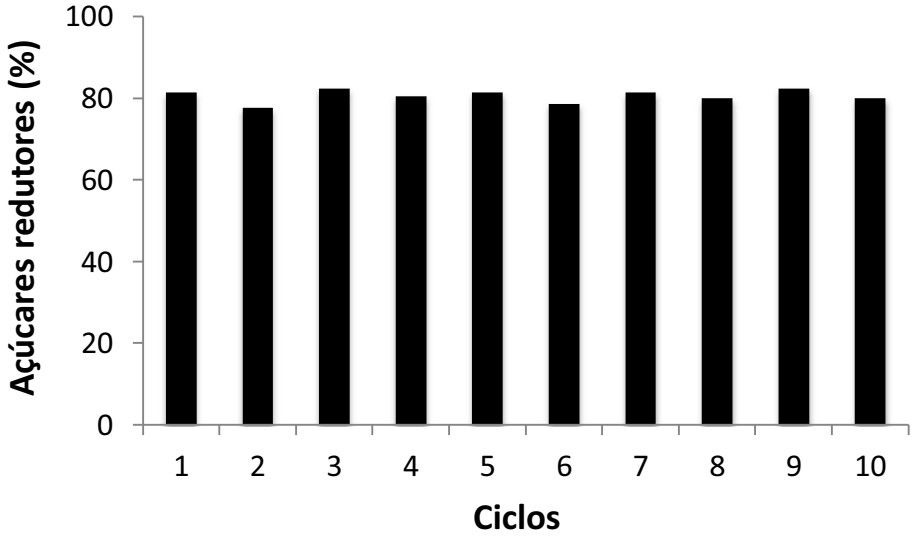

Figura 50 – Reúso do derivado xil I-glioxil-agarose por 10 ciclos de hidrólise consecutivos de 1 hora de duração. Os experimentos foram realizados como descrito em Métodos.

4.3 Xilanase de *Trichoderma longibrachiatum*

Inicialmente, como o extrato comercial era bastante impuro, buscou-se uma purificação, ainda que parcial (Figura 51, raia 2). Fazendo-se um *batch* do extrato diluído, em dois suportes comerciais (SP-sepharose e Q-sepharose), notou-se que grande parte da proteína, mas pouca porcentagem da atividade xilanolítica, se adsorvia em Q-sepharose (Tabela 16).

Tabela 16 – Percentual de atividade e proteína do extrato xilanolítico de *Trichoderma longibrachiatum* que se adsorveu aos suportes SP-sepharose e Q-sepharose

	Sulfopropil-sepharose	**Q-sepharose**
Atividade	95%	11%
Proteína	33%	62%

Optou-se, então, pela adsorção do extrato a esse suporte, e o sobrenadante restante teve seu pH reduzido a 6,0, para consequente adsorção em SP-sepharose. Já se havia verificado que 95% da atividade da enzima se adsorviam a esse suporte. Após dessorção da enzima com 50 $mmol.l^{-1}$ de NaCl, obteve-se um fator de purificação de 3,47 e atividade específica de 317 $U.mg^{-1}$ de proteína (Tabela 17).

Tabela 17 – Valores de proteína e atividade após purificação parcial da endo-1,4-β-xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* com Q-sepharose e SP-sepharose

Etapas	**Proteína (mg)**	**Atividade (UI)**	**Atividade específica ($U.mg^{-1}$)**	**Fator de purificação**
Extrato bruto	10,14	928,1	91,53	1,00
Q-sepharose	3,73	796,8	213,63	2,33
SP-sepharose	1,60	507,7	317,34	3,47

O extrato parcialmente purificado apresentou três proteínas majoritárias, de aproximadamente 21, 31 e 47 kDa (Figura 51, raia 3). Outras formas de purificação foram testadas, mesmo com uso de quelato-agarose; no entanto, as três bandas permaneceram no extrato final (dados não mostrados).

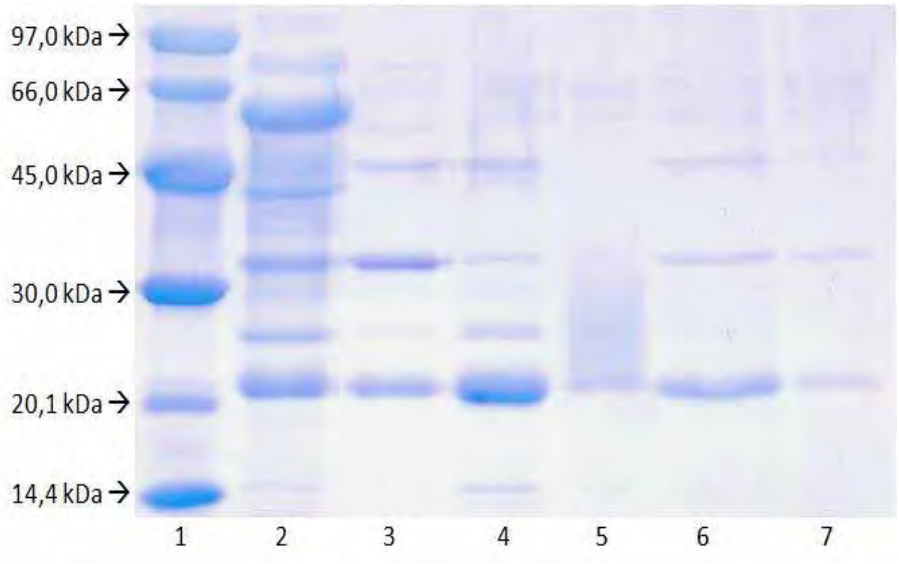

Figura 51 – SDS-PAGE do extrato de xilanase comercial produzido por *Trichoderma longibrachiatum.* Raias: (1) marcador de massa molecular; (2) extrato bruto proteico; (3) extrato parcialmente purificado; (4) derivado CNBr-sepharose de xilanase parcialmente purificada; (5) derivado CNBr-sepharose de xilanase parcialmente purificada, recoberto com dextrano 6000; (6) extrato parcialmente purificado, imobilizado em glioxil-agarose em pH 10,0, antes de redução com $NaBH_4$; (7) extrato parcialmente purificado, imobilizado em glioxil-agarose em pH 8,5, antes de redução com $NaBH_4$. Os experimentos foram feitos conforme descrito em Métodos.

O fungo *Trichoderma longibrachiatum* parece também produzir diversas formas de xilanase, sendo reportadas na literatura como proteínas monoméricas, com massas moleculares variadas. Kadi e Crouzet (2008) realizaram a purificação parcial da xilanase desse fungo e encontraram três proteínas no extrato final, correspondentes às bandas de 21,3 kDa, 33 kDa e 49,3 kDa. A proteína de 21,3 kDa era majoritária, compreendendo cerca de 80% das proteínas totais. Em princípio, acreditou-se que as bandas obtidas neste trabalho fossem as mesmas citadas pelos autores.

No entanto, quando se realizou uma imobilização branda em CNBr-sepharose, na qual as enzimas se ligam por seus grupos amino-terminais, notou-se, por SDS-PAGE, que uma parte de cada uma das três proteínas em questão se soltaram do suporte (Figura 51, raia 4). Isso não era esperado, uma vez que a união em CNBr-sepharose é covalente e irreversível, mesmo em condições desnaturantes. Esse comportamento é típico de proteínas multiméricas, que se ligam ao suporte apenas por uma de suas subunidades e, ao serem submetidas à eletroforese desnaturante, acabam por soltar as demais subunidades, aparecendo no gel. No entanto, quando se recobriu o derivado com dextrano oxidado, que reage covalentemente com grupos amino de baixo pK, não se observaram as mesmas bandas (Figura 51, raia 5).

Outro experimento foi feito na tentativa de se explicar o fato. Após confirmação da estabilidade da enzima em pH 10,0 (Figura 52), 21 U do extrato comercial parcialmente purificado foram imobilizadas em 1g de suporte glioxil-agarose em pH 10,0 e, também, em 1 g desse suporte em pH 8,5.

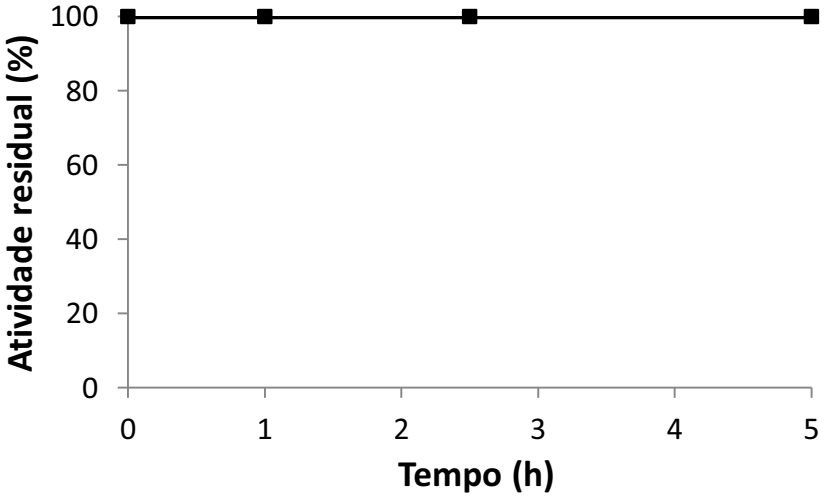

Figura 52 – Estabilidade da xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* em pH 10,0.

A maior parte da enzima imobilizou-se rapidamente em pH 10,0, sendo que 80% estavam ligados ao suporte após 30 minutos (Figura 53). O rendimento de imobilização e a atividade recuperada foram de 95%.

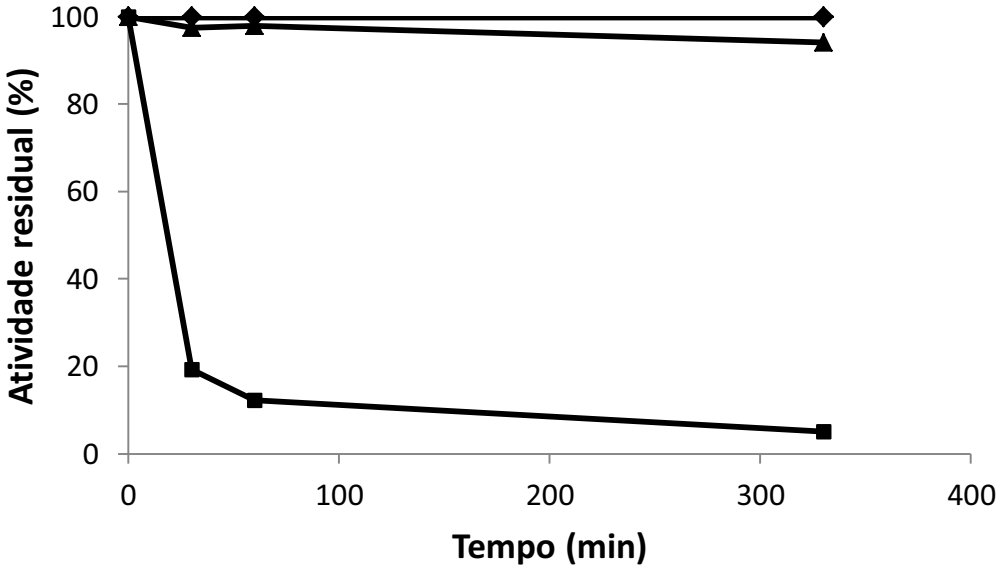

Figura 53 – Curso de imobilização da xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* em glioxil-agarose 10 CL. (♦) controle (enzima solúvel); (■) sobrenadante; (▲) suspensão. A imobilização foi realizada em tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 10,0, a 25°C, sob suave agitação. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

No entanto, em pH 8,5, apenas os grupos amino-terminais da enzima encontram-se desprotonados e, portanto, reativos. Segundo Mateo et al. (2005), para imobilização de uma proteína em glioxil, é necessária a existência de, pelo menos, duas ligações entre a proteína e o suporte, com subsequente formação de bases de Schiff. Caso contrário, a imobilização não acontece.

Assim, a imobilização foi realizada em pH 8,5, por 12 horas. Aproximadamente 40% da enzima ligaram-se ao suporte nessas condições e, sem ser reduzido com boroidreto de sódio, o derivado foi lavado com excesso de água destilada e ressuspenso em tampão de ruptura para SDS-PAGE, contendo 1 $mol.l^{-1}$ de etanolamina. Esse tratamento rompe qualquer ligação do tipo base de Schiff (MATEO et al., 2005). Como visto na Figura 51 (raia 7), as três proteínas também foram imobilizadas em glioxil, ainda que em pH 8,5. Novamente, esse é um comportamento de enzimas multiméricas. As monoméricas não são capazes de se ligar apenas por seus amino-terminais, em pH<10. Após diversas tentativas, não foi possível a visualização de bandas proteicas por eletroforese não desnaturante, o que impediu a conclusão dos fatos.

O derivado glioxil-agarose em pH 10,0 foi quase três vezes mais estável que aquele em pH 8,5, a 75°C, pois, em pH 10,0, mais ligações podem ser estabelecidas entre a proteína e o suporte, com consequente melhora na estabilidade (Figura 54). Ainda assim, a estabilidade do derivado em pH 8,5 pode ser considerada boa, uma vez que a meia-vida do controle (CNBr-sepharose) foi de apenas 20 minutos, a 65°C.

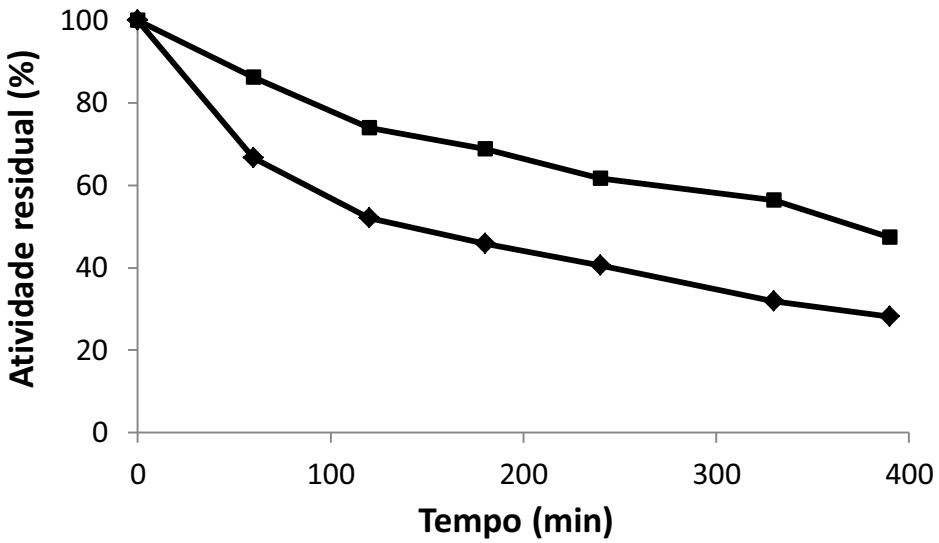

Figura 54 – Inativação térmica da xilanase de *T. longibrachiatum* imobilizada em glioxil-agarose, em pH 8,5 e em pH 10,0. (♦) glioxil-agarose em pH 8,5; (■) glioxil-agarose em pH 10,0. Os experimentos foram realizados a 75°C e pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

De todos os modos, o derivado glioxil-agarose, formado pela xilanase parcialmente purificada, foi utilizado para os próximos experimentos. Esse derivado apresentou meia-vida de 30 horas, a 65°C, sendo 90 vezes mais estável que o controle CNBr-sepharose (Figura 55).

A Tabela 18 mostra que 62% da fração solúvel da xilana *beechwood* 4% (m/v) foram hidrolisados, a 25°C, com um pequeno aparecimento de xilose ao final do processo. O produto majoritário foi a xilobiose em praticamente toda a hidrólise. Isso é importante, uma vez que diversos trabalhos reportam a xilobiose e a xilotriose como responsáveis por melhores efeitos prebióticos *in vitro* e *in vivo* (AACHARY; PRAPULLA, 2011).

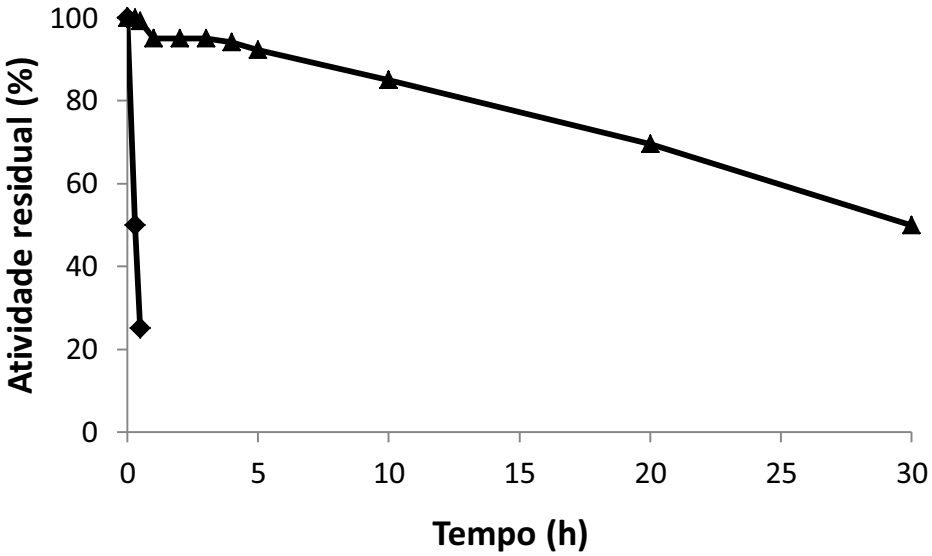

Figura 55 – Inativação térmica da xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* imobilizada em CNBr-sepharose e em glioxil-agarose 10 CL. (♦) CNBr-sepharose; (▲) glioxil-agarose 10 CL. Os experimentos foram realizados a 65°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

Tabela 18 – Formação de xilooligossacarídeos, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), pelo derivado de xilanase de *T. longibrachiatum* em glioxil-agarose

t	Açúcar redutor	% carboidratos totais (m/m)						
(h)	(%)	X1	X2	X3	X4	X5	X6	Outros XOS
-	4,0 (Controle)	0,00	0,00	0,00	14,03	4,56	5,72	75,69
1	26,3	0,00	8,20	4,61	9,02	4,99	4,45	68,73
2	44,1	0,00	14,69	7,95	7,54	4,47	3,30	62,05
9	78,3	0,41	33,47	10,33	4,26	1,43	0,76	49,35
48	100	6,68	51,32	2,52	0,90	0,22	0,32	38,04

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; X6: xilohexose.

O cromatograma apresenta os picos no momento em que ocorreu a liberação de 44% (A) e 100% (B) de açúcares redutores (Figura 56).

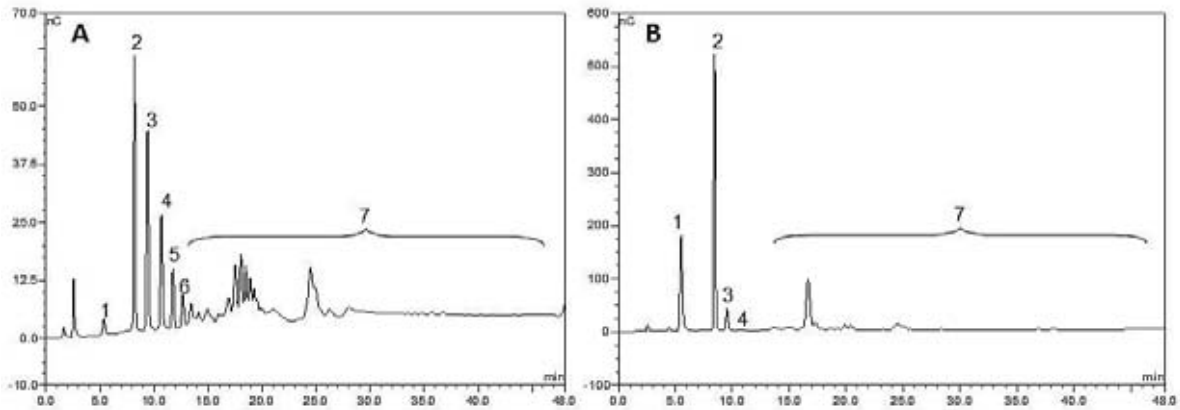

Figura 56 – Cromatograma HPAEC-PAD do produto de hidrólise de xilana pelo derivado de xilanase de *T. longibrachiatum* glioxil-agarose. Após (A) 3 horas (44% de AR) e (B) 48 horas de hidrólise (100% de AR). 1) xilose, 2) xilobiose, 3) xilotriose, 4) xilotetraose, 5) xilopentose, 6) xilohexose e 7) outros xilooligossacarídeos com DP> 6.

4.4 Xilanase de *Thermomyces lanuginosus*

A xilanase de *Thermomyces lanuginosus*, também adquirida comercialmente, apresentou um elevado grau de pureza, com uma única banda proteica de cerca de 24 kDa, de modo que a etapa de purificação foi desnecessária (Figura 57).

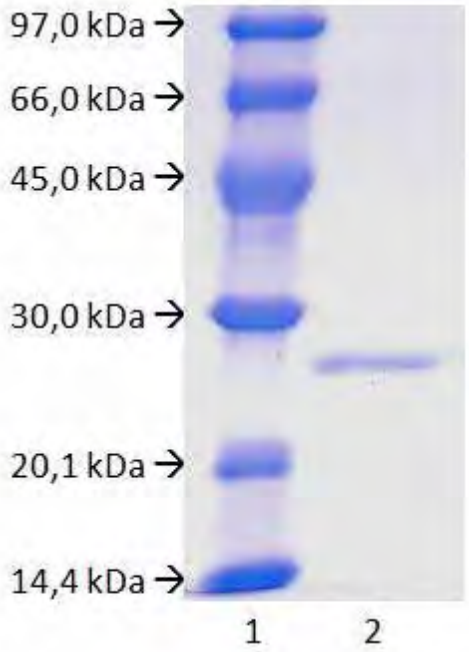

Figura 57 – SDS-PAGE da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus.* Raias: (1) marcador de massa molecular; (2) extrato proteico. O experimento foi realizado como descrito em Métodos.

A enzima apresentou-se bastante estável em pH 10,0, retendo 94% de atividade após cinco horas de incubação, a 25°C (Figura 58).

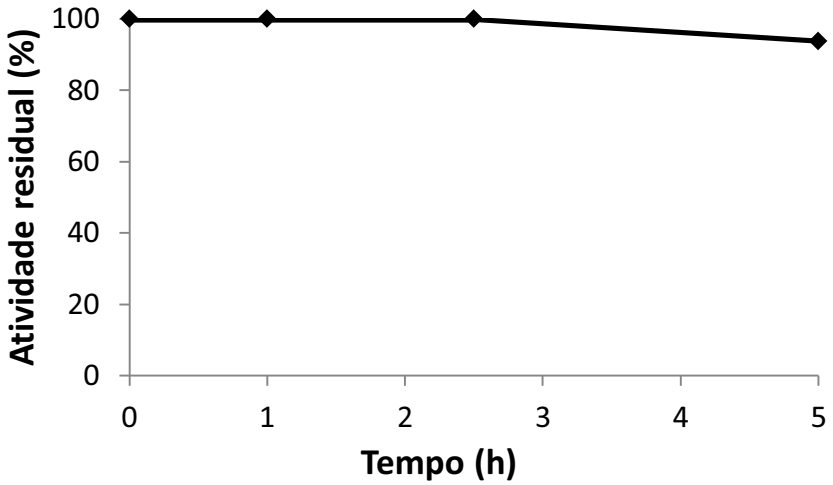

Figura 58 – Estabilidade da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* em pH 10,0, a 25°C.

Uma quantidade de 18 U (0,1 mg) de xilanase foi imobilizada em 1 g de glioxil-agarose, a 25°C (Figura 59). Quando se utilizou um volume de 10 ml de extrato diluído para 1 g de suporte, a imobilização tardou a ocorrer; após cinco horas e meia, apenas 45% da enzima estavam ligados ao suporte.

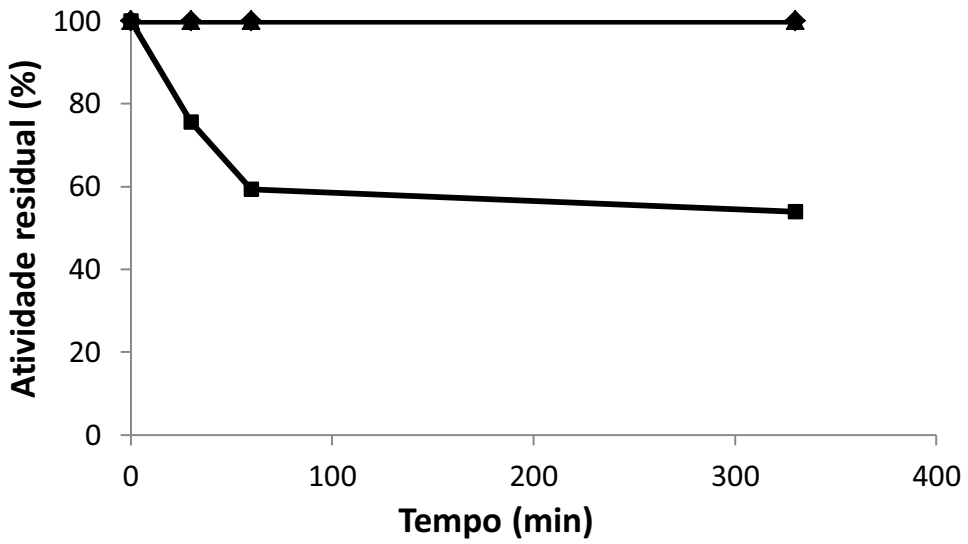

Figura 59 – Curso de imobilização da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* em glioxil-agarose 10 CL, com uso de 10 ml de extrato diluído para 1 g de gel. (♦) controle (enzima solúvel); (■) sobrenadante; (▲) suspensão. A imobilização foi realizada em tampão bicarbonato de sódio, em pH 10,0, a 25°C, sob suave agitação. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

Assim, o processo foi repetido, porém com uma relação de 3 ml de extrato (contendo também 18 U) para 1 g de suporte. Dessa forma, a imobilização tende a acontecer mais rapidamente, uma vez que há mais contato entre enzima e suporte (Figura 60). De fato, 80%

da enzima se imobilizaram em cinco horas, sendo que 90% estavam ligados ao suporte após 24 horas.

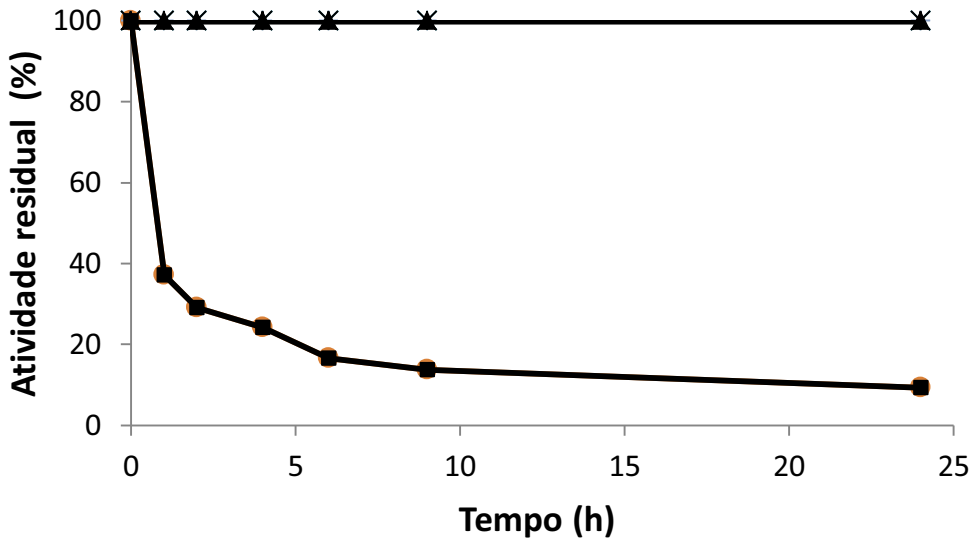

Figura 60 – Curso de imobilização da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* em glioxil-agarose 10 CL, com uso de 3 ml de extrato diluído para 1 g de gel. (x) controle (enzima solúvel); (■) sobrenadante; (▲) suspensão. A imobilização foi realizada em tampão bicarbonato de sódio, em pH 10,0, a 25°C, sob suave agitação. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

Embora a enzima parecesse bastante pura no extrato, por SDS-PAGE, foi repetida a imobilização, na proporção 10:1 (extrato:suporte), com a primeira parte que se ligou rapidamente à glioxil-agarose. Outro derivado foi obtido com a segunda parte, que tardou a ligar-se ao suporte. Os dois derivados foram submetidos à inativação térmica (Figura 61).

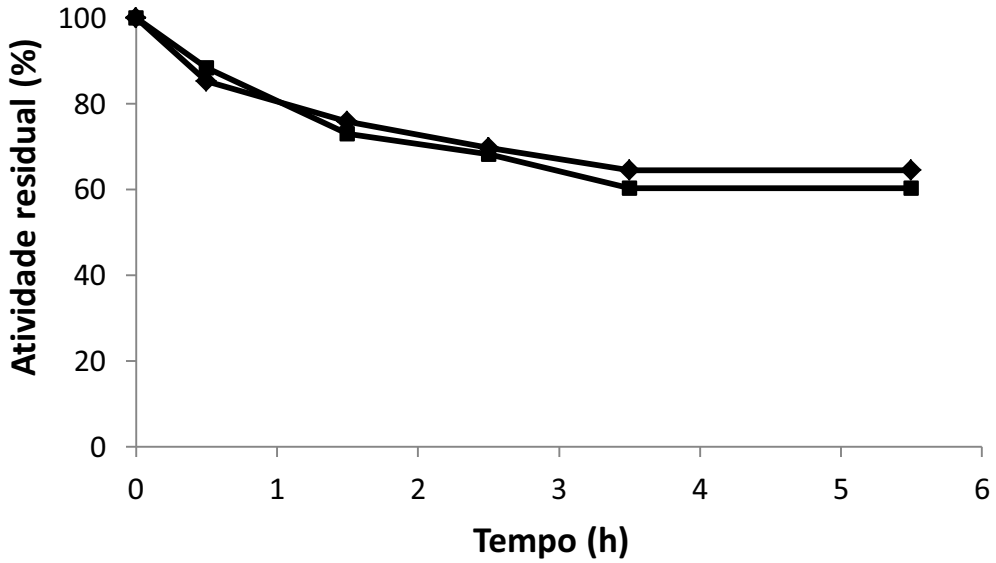

Figura 61 – Inativação térmica da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em glioxil-agarose. (♦) primeira fração; (■) segunda fração. Os experimentos foram realizados a 65°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

As curvas de inativação mostram que ambas as frações possuem o mesmo comportamento, decorrente da estabilidade promovida pela união multipontual covalente entre a enzima e o suporte. Trata-se, talvez, de uma mesma enzima, e ambas foram igualmente estabilizadas, ainda que em diferentes tempos.

Em seguida, o derivado, obtido com a imobilização na proporção 3:1 (extrato:suporte), foi inativado a 65°C e comparado ao controle (CNBr-sepharose). O derivado glioxil-agarose apresentou uma meia-vida de aproximadamente 11 horas, com um fator de estabilização igual a 12 (Figura 62).

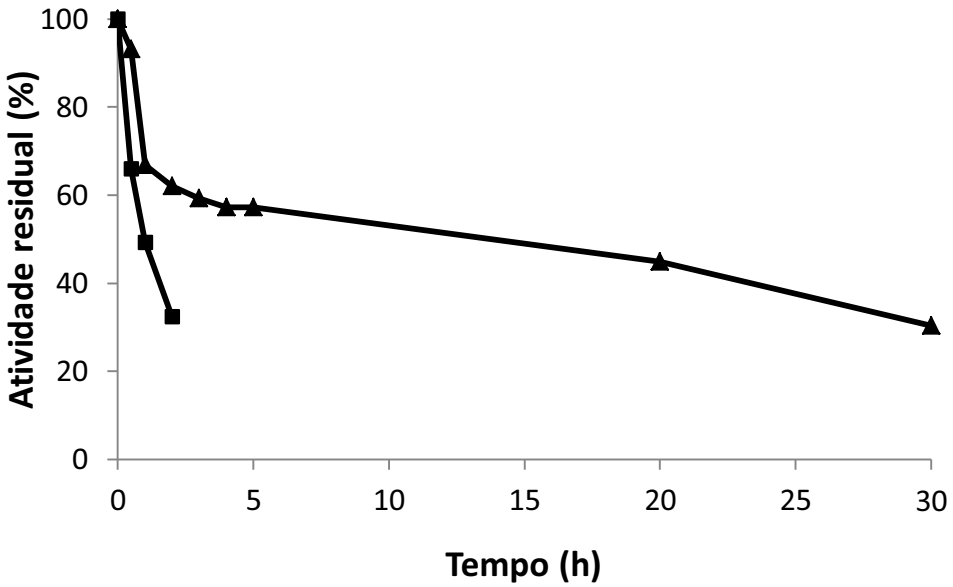

Figura 62 – Inativação térmica da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em CNBr-sepharose e em glioxil-agarose. (■) CNBr-sepharose; (▲) glioxil-agarose 10 CL. Os experimentos foram realizados a 65°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

Embora a xilanase de *Thermomyces lanuginosus* tenha apresentado, após imobilização, a menor estabilidade dentre todas as estudadas, esse valor não é desprezível quando comparado com as estabilidades de xilanases imobilizadas encontradas na literatura. Além disso, essa enzima apresenta a importante característica de não possuir qualquer atividade exoxilanolítica, ou seja, ao final da hidrólise de xilana pelo derivado glioxil-agarose, não houve qualquer formação de xilose, com liberação de cerca de 20% de xilobiose (Tabela 19).

Tabela 19 – Formação de xilooligossacarídeos, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), pelo derivado de xilanase de *T. lanuginosus* em glioxil-agarose

t	Açúcar redutor	% carboidratos totais (m/m)						
(h)	(%)	X1	X2	X3	X4	X5	X6	Outros XOS
-	4,0 (Controle)	0,00	0,00	0,00	14,03	4,56	5,72	75,69
1	25,6	0,00	1,72	4,18	6,75	5,00	4,10	78,25
7	56,9	0,00	5,33	7,71	7,77	5,25	3,51	70,43
34	100	0,00	21,38	13,39	6,28	2,10	0,98	55,87

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; X6: xilohexose.

No entanto, ao final do processo, esse derivado foi o que hidrolisou a menor porcentagem da xilana. O cromatograma ilustra bem, em ambos os graus de hidrólise (57 e 100%), a ausência de picos referentes à xilose e a presença de muitos picos de XOS com DP>6, mesmo com 100% de hidrólise (Figura 63).

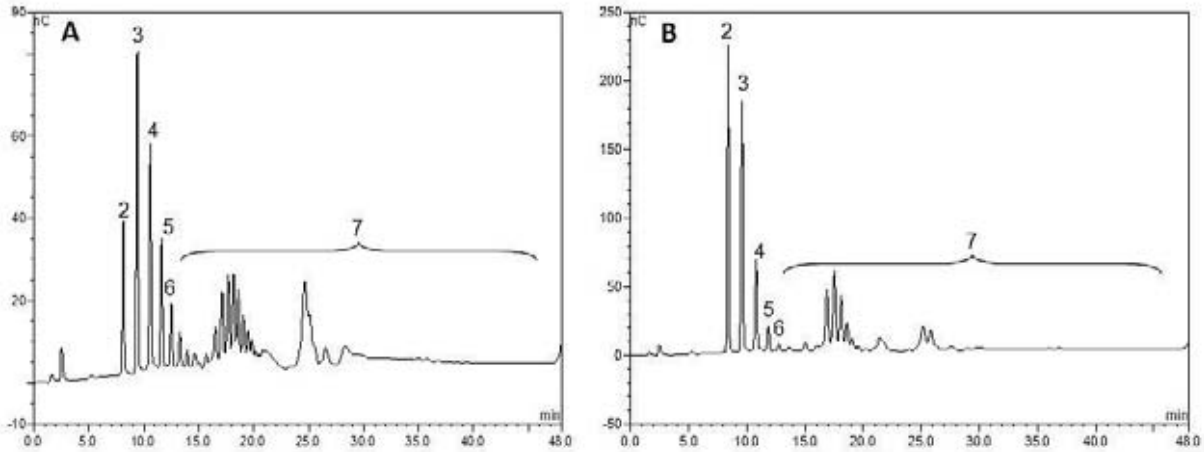

Figura 63 – Cromatograma HPAEC-PAD do produto de hidrólise de xilana pelo derivado de xilanase de *T. lanuginosus* em glioxil-agarose. Após (A) 7 horas (57% de AR) e (B) 34 horas de hidrólise (100% de AR). 1) xilose, 2) xilobiose, 3) xilotriose, 4) xilotetraose, 5) xilopentose, 6) xilohexose e 7) outros xilooligossacarídeos com DP>6.

4.5 Xilanase de *Streptomyces halstedii*

4.5.1 Purificação da endoxilanase recombinante

A endoxilanase recombinante foi superexpressa em *S. lividans* e secretada no meio de cultura. O extrato bruto obtido continha a enzima razoavelmente pura (Figura 64, raia 2).

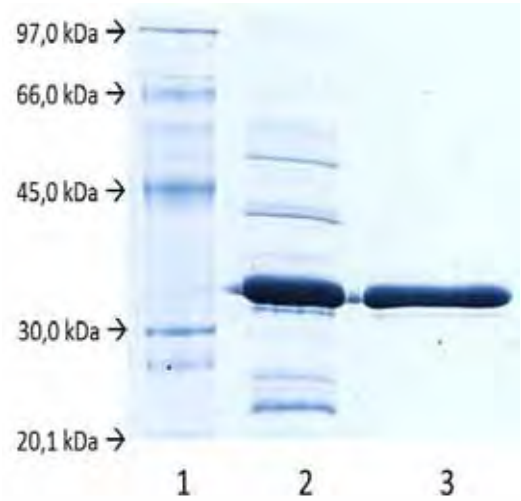

Figura 64 – SDS-PAGE da endoxilanase de *Streptomyces halstedii*. Raias: (1) marcador de massa molecular; (2) extrato celular bruto; (3) endoxilanase purificada. Os experimentos foram realizados como descrito em Métodos.

Após a adsorção seletiva da enzima, em suporte Ni-quelato com baixa ativação e em presença de imidazol, e dessorção com 100 mmol.l-1 de imidazol, conseguiu-se a sua purificação (Figura 64, raia 3). O fator de purificação foi igual a 2 e a enzima pura apresentou atividade específica de 255 U.mg de proteína-1. Assim, foi possível a purificação da enzima recombinante com cauda de histidina em apenas uma etapa e de forma relativamente simples e a baixo custo. Com essa metodologia, por exemplo, até 900 mg de enzima podem ser purificados com apenas 20 ml de suporte cromatográfico.

4.5.2 Imobilização

A enzima purificada foi imobilizada em sepharose ativada com CNBr, em pH 7,0 e a 4°C, por 15 minutos. Apenas 30% foram imobilizados, porém com 100% de atividade recuperada.

Em seguida, verificou-se a estabilidade da enzima livre em pH 10,0, condição necessária para a imobilização em glioxil-agarose. Observou-se que, a 25°C, a xilanase era pouco estável, com meia-vida de duas horas (Figura 65). Por outro lado, quando se testou a estabilidade em pH 10,0 e a 4°C, a enzima reteve 97% da atividade, após esse mesmo tempo.

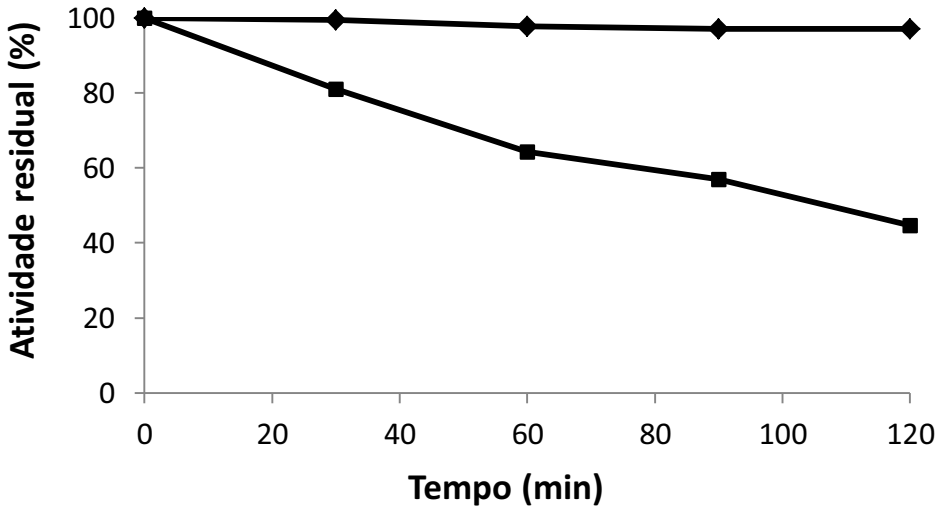

Figura 65 – Estabilidade da xilanase de *Streptomyces halstedii* em pH 10,0, em diferentes temperaturas. 4°C (♦) e 25°C (■). O experimento foi realizado em tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.l^{-1}, em pH 10,0. A atividade foi determinada a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

Assim, realizou-se a imobilização em suporte glioxil-agarose 10 CL, em pH 10,0 e a 4°C. Aproximadamente 95% da enzima oferecida ao suporte foram imobilizados em duas horas e, após quatro horas de incubação a 4°C, o derivado foi incubado a 25°C, por 12 horas, antes de ser submetido ao processo de redução com boroidreto de sódio. A atividade recuperada foi de 65%.

Os derivados xil-glioxil-agarose e xil-CNBr-sepharose foram incubados a 60°C e em pH 5,0. O primeiro apresentou meia-vida de 15 dias, nessas condições, enquanto que o segundo teve meia-vida de menos de duas horas (Figura 66).

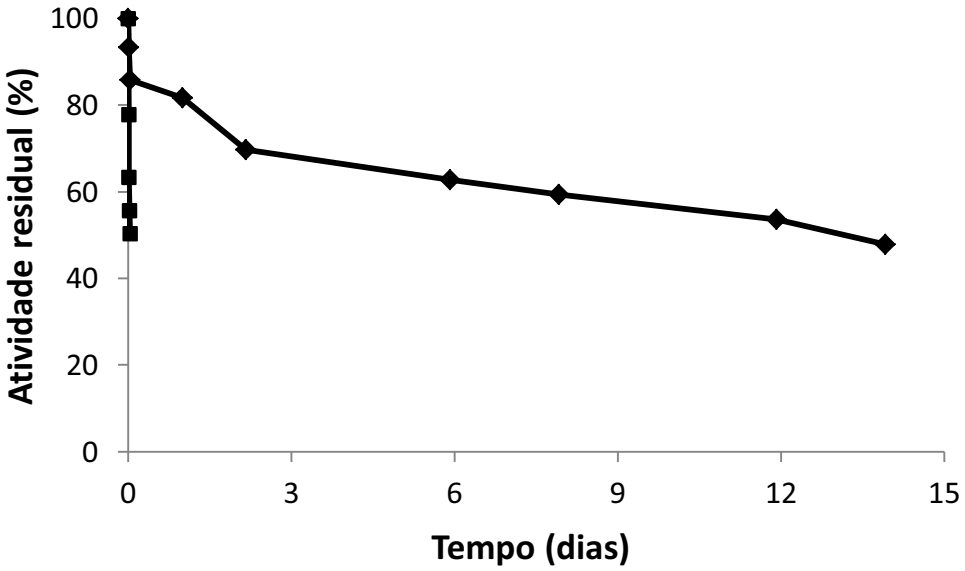

Figura 66 – Inativação térmica da xilanase de *Streptomyces halstedii* imobilizada em glioxil-agarose 10 CL e em CNBr-sepharose. (♦) glioxil-agarose 10 CL; (■) CNBr-sepharose. Os experimentos foram realizados a 60°C e em pH 5,0. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

A estabilização da estrutura terciária da enzima promoveu o aumento de 10°C na temperatura ótima do derivado xil-glioxil-agarose, em comparação com o controle (Figura 67).

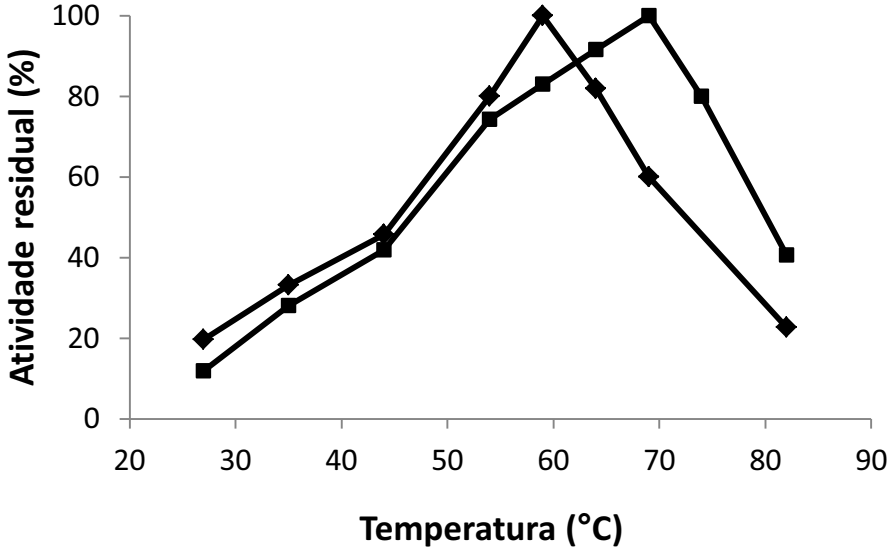

Figura 67 – Influência da temperatura na atividade enzimática da xilanase de *Streptomyces halstedii* imobilizada em glioxil-agarose 10 CL e em CNBr-sepharose. (■) xil-glioxil-agarose 10 CL; (♦) xil-CNBr-sepharose. A atividade foi medida em pH 5,0, como descrito em Métodos.

Quando feita a inativação térmica em pH 5,0 e 7,0, observou-se que, no primeiro, o derivado foi significativamente mais estável (Figura 68).

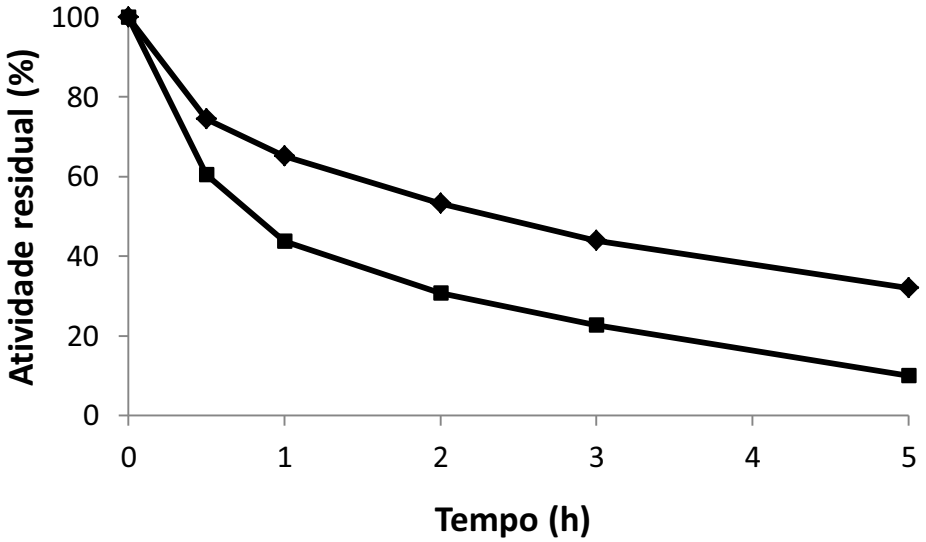

Figura 68 – Inativação térmica, em diferentes valores de pH, da xilanase imobilizada em glioxil-agarose 10 CL. (♦) pH 5,0; (■) pH 7,0. O experimento foi realizado a 75°C. A atividade foi medida a 25°C e em pH 5,0, como descrito em Métodos.

4.5.3 Hidrólise de xilana pelo derivado xil-glioxil-agarose

Estudou-se a liberação de açúcares redutores pela hidrólise enzimática de xilana. Quanto maior a temperatura, maior foi a taxa de hidrólise, assim como o rendimento final (Figura 69). O máximo aparecimento de açúcares redutores alcançado a 55°C, após 140 horas, foi considerado como 100% de liberação. Assim, 80% e 90% de açúcares redutores foram obtidos após três e cinco horas de reação, respectivamente. Em 25°C, a hidrólise não chegou a alcançar o valor de 70%, mesmo em 140 horas. Não se verificou diferença entre o perfil de hidrólise em pH 5,0 e o em pH 7,0.

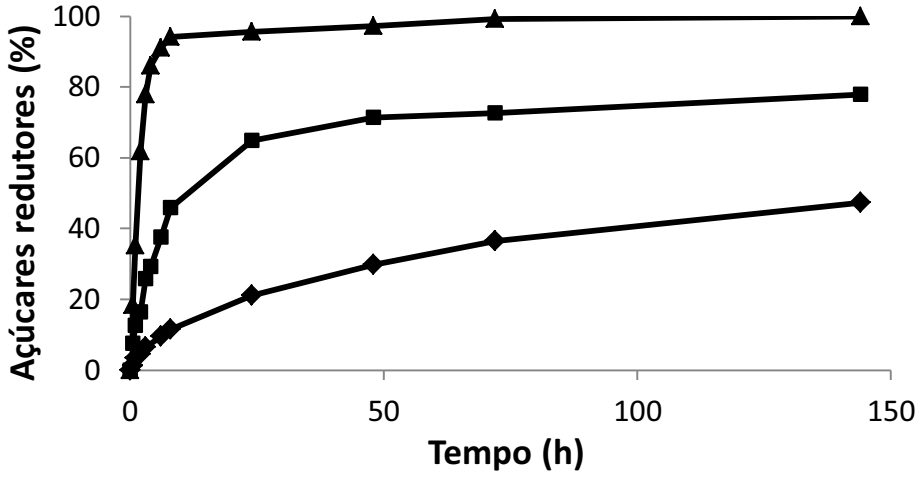

Figura 69 – Curso de hidrólise de xilana *beechwood* 1 % (m/v) pela xilanase imobilizada em glioxil-agarose, em diferentes temperaturas. (♦) 4°C; (■) 25°C; (▲) 55°C. Os experimentos foram realizados em pH 5,0.

Uma vez que o derivado foi bastante estável a 60°C, verificou-se a possibilidade de reúso por dez ciclos de reação, até o ponto de 80% de hidrólise, a 55°C (Figura 70).

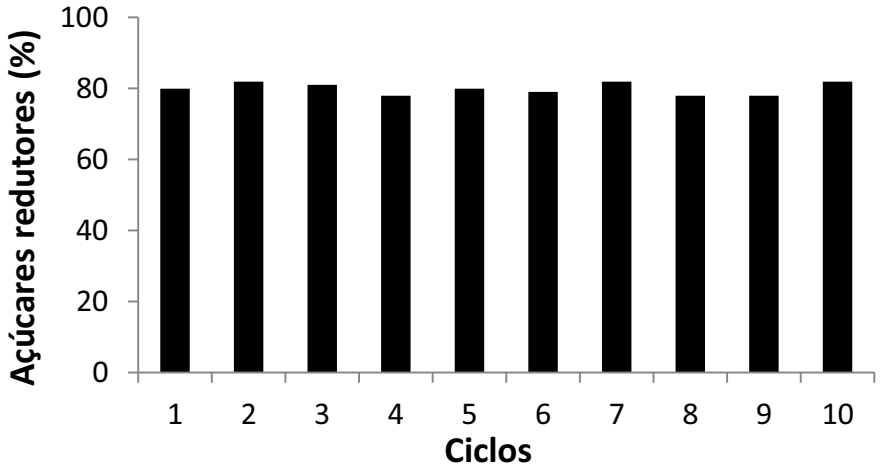

Figura 70 – Ciclos consecutivos de hidrólise de xilana *beechwood* 1 % (m/v) pela xilanase imobilizada em glioxil-agarose. Cada ciclo de reação foi interrompido após 3 horas, quando a liberação de açúcares redutores foi de aproximadamente 80%. Os experimentos foram realizados em pH 5,0 e a 55°C.

Nota-se que o comportamento de hidrólise da xilana não se alterou, mantendo toda a atividade após esses ciclos.

Estudou-se a composição dos produtos de hidrólise, em diferentes graus de conversão, por HPAEC-PAD (Figura 71).

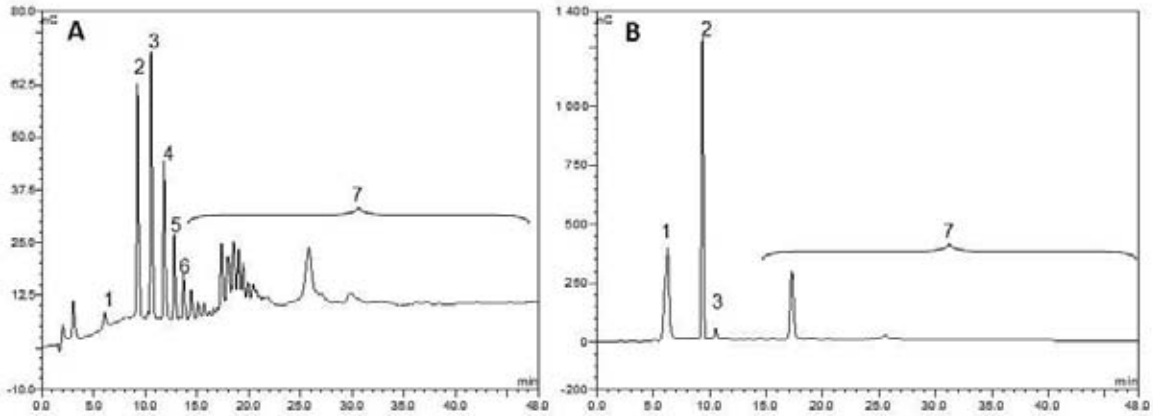

Figura 71 – Cromatograma HPAEC-PAD do produto de hidrólise de xilana pelo derivado de xilanase de *Streptomyces halstedii* em glioxil-agarose. Após (A) 1 hora (38% de AR) e (B) 72 horas de hidrólise (100% de AR), a 55°C. 1) xilose, 2) xilobiose, 3) xilotriose, 4) xilotetraose, 5) xilopentose, 6) xilohexose e 7) outros xilooligossacarídeos com DP>6.

A liberação de xilose foi mínima até a formação de 80% de açúcares redutores, a 55°C. A esse grau de conversão, que aconteceu em três horas de reação, obteve-se uma mistura de 49% de XOS (de xilobiose a xilohexose), com 51% da xilana total hidrolisada (Tabela 20).

Tabela 20 – Formação de xilooligossacarídeos, após hidrólise de xilana *beechwood* 4% (m/v), pelo derivado de xilanase de *S. halstedii* em glioxil-agarose

T (°C)	t (h)	Açúcar redutor (%)	% carboidratos totais (m/m)						
			X1	X2	X3	X4	X5	X6	Outros XOS
-	-	4,4 (Controle)	0,00	0,00	0,00	11,43	4,18	5,98	78,41
4	3	10,6	0,00	6,40	2,51	6,87	3,17	2,81	78,23
	48	32,9	0,34	19,73	8,90	5,84	3,11	2,10	59,98
	144	49,7	2,27	35,03	10,24	3,28	1,16	0,63	47,38
25	3	29,2	0,00	13,49	7,73	6,46	3,60	2,61	66,11
	8	48,3	0,39	20,58	9,96	6,20	3,35	2,24	57,28
	144	78,8	10,11	51,07	1,25	0,72	0,22	0,27	36,36
55	1	38,0	0,00	12,13	8,39	7,31	4,42	3,29	64,45
	2	63,6	0,21	17,18	11,17	7,32	4,46	3,01	56,65
	3	78,8	0,53	22,65	12,92	7,17	3,73	2,23	50,77
	72	100,0	10,82	56,07	0,96	0,40	0,23	0,24	31,28

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; X6: xilohexose.

Após 140 horas, com 100% de liberação de açúcares redutores, 70% da xilana foram hidrolisados, com aparecimento de 10% de xilose e formação majoritária de xilobiose.

Assim como verificado após a hidrólise da xilana pela xilanase I de *A. niger* imobilizada em glioxil-agarose, as menores temperaturas também favoreceram a formação de compostos com 1-2 unidades de xilose. Quando se aumenta a temperatura, a síntese de XOS com DP>3 é favorecida.

4.6 Síntese dos resultados de imobilização

Nas últimas décadas, as xilanases já foram imobilizadas por diversos métodos e em diferentes suportes (Tabela 1 - Introdução). No entanto, os fatores de estabilidade foram, de modo geral, menores que os verificados neste trabalho. A Tabela 21 resume alguns dados obtidos, com a imobilização das cinco xilanases em glioxil-agarose.

Observaram-se os maiores fatores de estabilização quando a atividade recuperada foi menor. Esse comportamento é muito comum quando se trata de imobilização de enzimas, ou seja, o maior enrijecimento da estrutura terciária da enzima acarreta, inevitavelmente, pequenas alterações que comprometem sua atividade; no entanto, o ganho, em termos de estabilidade, acaba por compensar esse inconveniente.

Tabela 21 – Atividade recuperada, rendimento de imobilização e fator de estabilização obtidos após imobilização das cinco xilanases

Fonte da xilanase	AR [a] (%)	RI [b] (%)	FE [c]
Aspergillus niger	80	100	150
Aspergillus versicolor	84	88	600
Trichoderma longibrachiatum	95	95	90
Thermomyces lanuginosus	90	90	12
Streptomyces halstedii	65	95	300

[a]Atividade recuperada; [b]Rendimento de imobilização; [c]Fator de estabilização.

5 CONCLUSÃO

A xilanase de *Aspergillus niger*, estudada de forma mais aprofundada neste trabalho, apresentou interessantes propriedades, como a boa estabilidade até 55°C, a temperatura ótima também de 55°C e a indução por xilose. Além disso, o extrato bruto produzido com uso de pó de sabugo de milho como fonte de carbono não exibiu atividades de beta-xilosidase, avicelase e carboximetilcelulase. A atividade enzimática foi inibida por íons Cu^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+3} e Hg^{+2}, uma característica já observada em diversas xilanases, na literatura.

Essa enzima foi purificada em uma simples etapa, por adsorção em suporte ativado com ácido iminodiacético e cobre. Na sequência, essa e outras quatro xilanases — parcial ou totalmente purificadas —, provenientes de diferentes fontes, foram imobilizadas e estabilizadas em suporte sólido de agarose ativada com grupos aldeídos.

O fato de uma xilanase não se adsorver a suportes iônicos (por exemplo, as de *A. niger* e *A. versicolor)* pode indicar ausência de grupos com cargas ou, ainda, alto grau de glicosilação da proteína. A xilanase de *A. niger* foi purificada com grupos quelatos e imobilizada rapidamente em glioxil-agarose, sugerindo a presença de diversos resíduos de histidina e de lisina na superfície de sua estrutura terciária. A xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* apresentou alta adsorção em SP-sepharose, o que não aconteceu em Q-sepharose, possivelmente por a enzima possuir baixa densidade de aspartato e glutamato e maiores quantidades de aminoácidos básicos expostos.

Todas as enzimas estudadas imobilizaram-se de forma rápida em glioxil-agarose, com exceção da xilanase de *Thermomyces lanuginosus*. Sugere-se que há poucos resíduos de lisina na superfície dessa proteína. Não por coincidência, foi ela que apresentou o menor fator de estabilização após a imobilização.

Comprovou-se, também, que alguns tratamentos simples, como a manutenção da enzima imobilizada por alguns períodos de tempo em pH 10,0, antes da redução com boroidreto de sódio, ampliou a estabilização. Por exemplo, a incubação por 20-24 horas, em pH 10,0, após a imobilização das xilanases de *A. niger* e *A. versicolor* em glioxil-agarose, gerou um derivado três vezes mais estável que o controle, sem incubação.

Os rendimentos de imobilização obtidos foram altos, entre 88 e 100%, com boas atividades recuperadas. As duas enzimas comerciais (*Trichoderma longibrachiatum* e

Thermomyces lanuginosus) foram as que apresentaram os menores fatores de estabilização, sendo que, nas demais, este fator variou de 150 (*A. niger*) a 600 (*A. versicolor*).

As xilanases oferecem vantagens na produção de XOS, frente aos demais métodos, pois não geram resíduos e atuam de forma específica em seu substrato, mesmo em sua forma solúvel. Imobilizada, a enzima pode conferir ao catalisador, além da estabilização, outros benefícios, confirmados neste trabalho:

- aumento de até 10°C na faixa ótima da atividade enzimática;
- possibilidade de reúso do catalisador por, pelo menos, 10 ciclos de reação;
- controle do grau de polimerização, com retirada do catalisador no momento desejado;
- obtenção de um produto mais puro, livre da enzima;
- emprego do catalisador insolúvel em biorreatores, para produção de XOS, após hidrólise da xilana em temperaturas relativamente elevadas.

As xilanases tiveram comportamentos distintos quanto ao modo de ação. Por exemplo, a de *Thermomyces lanuginosus* não apresentou produção de xilose, mesmo ao final da hidrólise. Com uso de outras (*A. niger* e *S. halstedii*), alterações na temperatura favoreceram maior ou menor produção de XOS com menor grau de polimerização. Assim, não apenas a fonte das xilanases, mas também as condições de hidrólise — temperatura, pH e fluxo (em caso de emprego em reator) —, interferem fortemente na obtenção do produto final desejado.

As enzimas estudadas foram imobilizadas e estabilizadas com êxito, gerando catalisadores propícios para a econômica, eficiente e sustentável produção de xilooligossacarídeos nos diferentes setores industriais.

Futuros estudos envolvem a imobilização dessas enzimas em suportes heterofuncionais, com os quais se pode conseguir a união por diferentes regiões da proteína, obtendo-se derivados ainda mais ativos e estáveis. São necessários, também, novos experimentos que possibilitem a elucidação da estrutura terciária da xilanase de *Trichoderma longibrachiatum*, obtida comercialmente.

REFERÊNCIAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Compr. Rev. Food Sci. F.**, v. 10, p. 2-16, 2011.

AI, Z.; JIANG, Z.; LI, L.; DENG, W.; KUSAKABE, I.; LI, H. Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. **Process Biochem.**, v. 40, p. 2707-2714, 2005.

AKDEMIR, Z. S.; DEMIR, S.; KAHRAMAN, M. V.; APOHAN, N. K. Preparation and characterization of UV-curable polymeric support for covalent immobilization of xylanase enzyme. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 68, p. 104-108, 2011.

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.

ALMEIDA, E. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of beta-xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 130, p. 171-176, 1995.

ANDRADE, S. V. **Estudos comparativos das β-xilosidases produzidas por *Aspergillus versicolor* cultivado em xilana ou xilose como únicas fontes de carbono**. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

ARMISÉN, P.; MATEO, C.; CORTÉS, E.; BARREDO, J. L.; SALTO, F.; DIEZ, B.; RODÉS, L.; GARCÍA, J. L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports. **J. Chromatogr. A**, v. 848, n. 1/2, p. 61-70, 1999.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World J. Microb. Biot.**, v. 8, p. 353-368, 1992.

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

BENEDETTI, A. C. E. P. **Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas**: produção e caracterização de xilanases. 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

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

BIELY, P.; PULS, J.; SCHNEIDER, H. Acetyl xylan estereases in fungal cellulolytic systems. **FEBS Lett.**, v. 186, p. 80-84, 1995.

BOCCHINI, D. A.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochem.**, v. 40, p. 3653-3659, 2005.

BOCCHINI, D. A.; ALVES-PRADO, H. F.; BAIDA, L. C.; ROBERTO, I. C.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. **Process Biochem.**, v. 38, p. 727-731, 2002.

BOKHARI, S. A. I.; RAJOKA, M. I.; JAVAID, A.; SHAFIQ-UR-REHMAN, ISHTIAQ-UR-REHMAN, LATIF, F. Novel thermodynamics of xylanase formation by a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Thermomyces lanuginosus* and its xylanase potential for biobleachability. **Bioresource Technol.**, v. 101, p. 2800-2808, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-54, 1976.

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

BRODEL, B.; SAMAIN, E.; DEBEIRE, P. Regulation and optimization of xylanase production in *Clostridium thermolacticum*. **Biotechnol. Lett.**, v. 12, n. 1, p. 65-70, 1990.

CANO, A.; MINGUILLON, C.; PALET, C. Immobilization of endo-1,4-β-xylanase on polysulfone acrylate membranes: synthesis and characterization. **J. Membr. Sci.**, v. 280, p. 383-388, 2006.

CARDOSO, O. A. V.; FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a novel cellulase-free xilanase from *Acrophialophora nainiana*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 223, p. 309-314, 2003.

CARMONA, E. C.; BROCHETTE-BRAGA, M. R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor.* **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 166, p. 311-315, 1998.

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.**, v. 40, p. 359-364, 2005.

CHANDRA, R. K.; CHANDRA, T. S. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 145, p. 457-461, 1996.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochem. Eng. J.**, v. 49, p. 361-369, 2010.

CHEN, H.; LIU, L.; LV, S.; LIU, X.; WANG, M.; SONG, A.; JIA, X. Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on chitosan using dialdehyde starch as a coupling agent. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 162, n. 1, p. 24-32, 2010.

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

DAMÁSIO, A. R. D. L.; SILVA, T. M.; ALMEIDA, F. B. D. R.; SQUINA, F. M.; RIBEIRO, D. A.; LEME, A. F. P.; SEGATO, F.; PRADE, R. A.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. **Process Biochem.**, v. 46, n. 6, p. 1236-1242, 2011.

DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. Purification, properties and mode of action of hemicellulase produced by *Ceratocystis paradoxa*. **Carbohydr. Res.**, v. 39, p. 97-114, 1975.

DHIMAN, S. S.; JAGTAP, S. S.; JEYA, M.; HAW, J. R.; KANG, Y. C.; LEE, J. K. Immobilization of *Pholiota adiposa* xylanase onto SiO_2 nanoparticles and its application for production of xylooligosaccharides. **Biotechnol. Lett.**, v. 34, n. 7, p. 1307-1313, 2012.

DHIMAN, S. S.; KALYANI, D.; JAGTAP, S. S.; HAW, J. R.; KANG, Y. C.; LEE, J. K. Characterization of a novel xylanase from *Armillaria gemina* and its immobilization onto SiO_2 nanoparticles. **App. Microbiol. Biotechnol.**, 2012. Doi:10.1007/s00253-012-4381-9.

DÍAZ, M.; RODRIGUEZ, S.; FERNÁNDEZ-ABALOS, J. M.; DE LAS RIVAS, J.; RUIZ-ARRIBAS, A.; SHNYROV, V. L.; SANTAMARÍA, R. I. Single mutations of residues outside the active center of the xylanase Xys1 Delta from *Streptomyces halstedii* JM8 affect its activity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 240, 237-243, 2004.

DUMITRIU, S.; CHORNET, E. Immobilization of xylanase in chitosan-xanthan hydrogels. **Biotechnol. Prog.**, v. 13, p. 539-545, 1997.

EDWARD, V. A.; PILLAY, V. L.; SWART, P.; SINGH, S. Immobilization of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP using Eudragit S-100. **S. Afr. J. Sci.**, v. 98, p. 553-554, 2002.

EIJSINK, V. G. H.; GASEIDNES, S.; BORCHERT, T. V.; VAN DEN BURG, B. Directed evolution of enzyme stability. **Biomol. Eng.**, v. 22, n. 1/3, p. 21-30, 2005.

FÁGÁIN, C. O. Understanding and increasing protein stability. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1252, p. 1-14, 1995.

FANG, T. J.; LIAO, B. C.; LEE, S. C. Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach. **New Biotechnol.**, v. 27, p. 25-32, 2010.

FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; BARALDO JUNIOR, A.; TARDIOLI, P. W.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnol.**, v. 27, n. 6, p. 810-815, 2010.

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

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, n. 7, p. 546-50, 1993.

FERREIRA FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 5, p. 1093-1109, 1994.

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

GAFFNEY, M.; CARBERRY, S.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Purification and characterisation of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and its functional expression by *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 45, p. 348-354, 2009.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnol. Adv.**, v. 23, n. 7/8, p. 471-99, 2005.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Preparation, characterization and application of *Aspergillus* sp. xylanase immobilized on Eudragit S-100. **J. Biotechnol.**, v. 66, p. 165-175, 1998.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutr. Res. Rev.**, v. 17, p. 259-75, 2004.

GOUDA, M. K.; ABDEL-NABY, M. A. Catalytic properties of the immobilized *Aspergillus tamarii* xilanase. **Microbiol. Res.**, v. 157, p. 275-281, 2002.

GOULART, A. J.; CARMONA, E. C.; MONTI, R. Partial purification and properties of cellulase-free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* in solid-state fermentation. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 48, n. 3, p. 327-333, 2005.

GRAZÚ, V.; LOPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; ABIAN, O.; GONZÁLEZ, R.; HERMOSO, J. A.; GARCIA, J. L.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Process Biochem.**, v. 45, p. 390-398, 2010.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; BARBOSA JUNIOR, A.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J. M.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose: strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment. In: BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 1997. p. 289-298.

GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. **Bioresource Technol.**, v. 102, p. 6112-6119, 2011.

GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; VAN GOOL, M. P.; SCHOLS, H. A.; HIRSCH, J.; EBRINGEROVÁ, A.; PARAJÓ, J. C. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. **J. Agr. Food Chem.**, v. 58, p. 3632-3641, 2010.

HARADA, K. M.; TANAKA, K.; FUKUDA, Y.; HASHIMOTO, W.; MURATA, K. *Paenibacillus* sp. strain HC1 xylanases responsible for degradation of rice bran hemicelluloses. **Microbiol. Res.**, v. 163, p. 293-298, 2008.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HE, J.; CHEN, D.; YU, B.; ZHANG, K. Optimization of the *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase production by recombinant *Pichia pastoris.* **Biochem. Eng. J.**, v. 52, p. 1-6, 2010.

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electrophoresis**, v. 6, p. 103-112, 1985.

HUNG, Y. J.; PENG, C. C.; TZEN, J. T. C.; CHEN, M. J.; LIU, J. R. Immobilization of *Neocallimastix patriciarum* xylanase on artificial oil bodies and statistical optimization of enzyme activity. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 8662-8666, 2008.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Enzyme nomenclature**. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>. Acesso em: 10 dez. 2012.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization— aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochem.**, v. 43, n. 10, p. 1019-1032, 2008.

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.**, v. 120, p. 457-462, 2010.

JUN, H.; BING, Y.; KEYING, Z.; DAIWEN, C. Functional characterization of a recombinant thermostable xylanase from *Pichia pastoris*: a hybrid enzyme being suitable for xylooligosaccharides production. **Biochem. Eng. J.**, v. 48, p. 87-92, 2009.

KADI, N.; CROUZET, J. Transglycosylation reaction of endoxylanase from *Trichoderma longibrachiatum*. **Food Chem.**, v. 106, n. 2, p. 466-474, 2008.

KANDA, T.; AMANO, Y.; NISIZAWA, K. Purification and properties of two endo-1,4-β-xylanase from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). **J. Biochem.**, v. 98, p. 1545-1554, 1985.

KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 142, n. 2, p. 125-138, 2007.

KESKAR, S. High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T_7: cultural conditions and enzyme properties. **Biotechnol. Lett.**, v. 14, n. 6, p. 481-486, 1992.

KIM, D. Y.; HAN, M. K.; OH, H. W.; PARK, D. S.; KIM, S. J.; LEE, S. G.; SHIN, D. H.; SON, K. H.; BAE, K. S.; PARK, H. Y. Catalytic properties of a GH10 endo-β-1,4-xylanase from *Streptomyces thermocarboxydus* HY-15 isolated from the gut of *Eisenia fetida*. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 62, p. 32-39, 2010.

KO, C. H.; LIN, Z. P.; TU, J.; TSAI, C. H.; LIU, C. C.; CHEN, H. T.; WANG, T. P. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 64, p. 13-19, 2010.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 411-456, 1999.

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

LAKSHMI, G. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; HOBBS, P. J.; PRAKASHAM, R. S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: a statistical optimization. **Biochem. Eng. J.**, v. 48, p. 51-57, 2009.

LI, L.; ZHUA, Y.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; CHENA, W. Immobilization of the recombinant xylanase B (XynB) from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* on metal-chelate Eupergit C 250L. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, p. 278-285, 2007.

LISZKA, M. J.; CLARK, M. E.; SCHNEIDER, E.; CLARK, D. S. Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 3, p. 77-102, 2012.

LIU, J.; SELINGER, L. B.; CHENG, K.; BEAUCHEMIN, K. A.; MOLONEY, M. M. Plant seed oil-bodies as an immobilization matrix for a recombinant xylanase from the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. **Molecular Breed.**, v. 3, p. 463-470, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCENA NETO, S. A.; FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, p. 86-90, 2004.

MAALEJ-ACHOURI, I.; GUERFALI, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase. **J. Mol. Catal. B**: Enzym., v. 59, p. 145-152, 2009.

MANDALARI, G.; BISIGNANO, G.; LO CURTO, R. B; WALDRON K. W.; FAULDS, C. B. Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 5130-5133, 2008.

MANRICH, A.; KOMESU, A.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 161, n. 1/8, p. 455-467, 2010.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and non distorting ionic adsorption on support-polyethylemine composites. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 6, p. 98-105, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATEO, C.; BOLIVAR, J. M.; GODOY, C.; ROCHA-MARTIN, J.; PESSELA, B. C. C.; CURIEL, J. A.; MUÑOZ, R.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilizaton process on novel heterofunctional supports. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 3112-3117, 2010.

MATEO, C.; GRAZÚ, V.; PESSELA, B. C. C.; MONTES, T.; PALOMO, J. M.; TORRES, R.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, n. 6, p. 1593-1601, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B. C. C.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 274-280, 2006.

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B. C. C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 37, n. 4, p. 456-462, 2005.

MEDEIROS, R. G; HANADA, R.; FERREIRA FILHO, E. X. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 52, p. 97-100, 2003.

MILAGRES, A. M. F.; MAGALHÃES, P. O.; FERRAZ, A. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, p. 267-272, 2005.

MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochem.**, v. 39, p. 1387-1391, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalycilic reagent for the determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MONTI, R.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 675-681, 1991.

MONTI, R.; CARDELLO, L.; CUSTÓDIO, M. F.; GOULART, A. J.; SAYAMA, A. H.; CONTIERO, J. Production and purification of an endo-1,4-β-xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 124-128, 2003.

MUMTAZ, S.; REHMAN, S. U.; HUMA, N.; JAMIL, A.; NAWAZ, H. Xylooligosaccharide enriched yoghurt: physicochemical and sensory evaluation. **Pak. J. Nutri.**, v. 7, n. 4, p. 566-569, 2008.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; GUPTA, V. K. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. **Process Biochem.**, v. 47, n. 9, p. 1402-1410, 2012.

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

PEIJ, N. M. E.; VAN VISSER, J.; GRAAFF L. H. Isolation and analysis of xlnR encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 131-142, 1998.

PESSOA JUNIOR, A; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Evaluation of sugar cane hemicelullose hydrolisate for cultivation of yeasts and filamentous fungi. **J. Indust. Microbio. Biotech.**, v. 18, p. 360-363, 1997.

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

PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotech. Genet. Eng. Rev.**, v. 13, p. 100-131, 1995.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMNICKY, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRSANSKA, M.; KEKOS, D.; MARCIS, B. J.; BHAT, M. K. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 24, p. 355-361, 1999.

PURKARTHOFER, H.; SINNER, M.; STEINER, W. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. **Enzyme Microb. Techonol.**, v. 15, p. 677-682, 1993.

QIU, Z.; LUO, H.; BAI, Y.; YUAN, T.; YANG, P.; LIU, S.; YAO, B. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 46, n. 6, p. 506-512, 2010.

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; DAWIDOWICZ, A.; ILCZUK, Z.; LEONOWICZ, A. Immobilization of cellulase and d-xylanase complexes from *Aspergillus terreus* F-413 on controlled porosity glasses. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 7, n. 8, p. 395-400, 1985.

RUIJTER, G. J. G.; VISSER, J. Carbon repression in Aspergilli. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 151, n. 2, p. 103-114, 1997.

RUIZ-ARRIBAS, A.; FERNANDEZ-ABALOS, J. M.; SÁNCHEZ, P.; GARDA, A. L.; SANTAMARÍA, R. I. Overproduction , purification , and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 6, p. 2414-2419, 1995.

RUIZ-ARRIBAS, A.; ZHADAN, G. G.; KUTYSHENKO, V. P.; SANTAMARÍA, R. I.; CORTIJO, M.; VILLAR, E.; FERNANDEZ-ABALOS, J. M.; CALVETE, J. J.; SHNYROV, V. L. Thermodynamic stability of two variants of xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. **Eur. J. Biochem.**, v. 253, p. 462-468, 1998.

SANDRIM, V. C.; RIZZATTI, A. C. S.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A.; MILAGRES, A. M. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochem.**, v. 40, p. 1823-1828, 2005.

SARBU, A.; PINHO, M. N.; FREIXO, M. R.; GONÇALVES, F.; UDREA, I. New method for the covalent immobilization of a xylanase by radical grafting of acrylamide on cellulose acetate membranes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 125-130, 2006.

SARDAR, M.; ROY, I.; GUPTA, M. N. Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit L-100. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 672-679, 2000.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Simultaneous refolding, purification and immobilization of xylanase with multi-walled carbon nanotubes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1784, p. 363-367, 2008.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.6, p. 219-228, 2003.

SHARMA, M.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions. **Bioresource Technol.**, v. 101, p. 8834-8842, 2010.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. **Process Biochem.**, v. 40, p. 161-164, 2005.

SILVA, R. da; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Braz. J. of Microbiol.**, v. 36, p. 235-241, 2005.

SIMPSON, H. D.; HAUFLER, U. R.; DANIEL, R. M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. **Biochem. J.**, v. 277, n. 2, p. 413-417, 1991.

SQUINA, F. M.; MORT, A. J.; DECKER, S. R.; PRADE, R. A. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. **Protein Expres. Purif.**, v. 68, p. 65-71, 2009.

SU, Y.; ZHANG, X.; HOU, Z.; ZHU, X.; GUO, X.; LING, P. Improvement of xylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 using response surface methodology. **New Biotechnol.**, v. 28, n. 1, p. 40-46, 2011.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

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

TAN, S. S.; LI, D. Y.; JIANG, Z. Q.; ZHU, Y. P.; SHI, B.; LI, L. T. Production of xylobiose from the autohydrolysis explosion liquor of corncob using *Thermotoga maritima* xylanase B (XynB) immobilized on nickel-chelated Eupergit C. **Bioresource Technol.**, v. 99, n. 1, p. 200-204, 2008.

TARDIOLI, P. W.; VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M. S.; ZANIN, G. M.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization-stabilization of glucoamylase: chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. **Process Biochem.**, v. 46, p. 409-412, 2010.

TAVARES, V. B.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Characterization of a cellulase-free xylanase producing *Bacillus* sp for biobleaching of kraft pulp. **Rev. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 179-82, 1997.

TENG, C.; YAN, Q.; JIANG, Z.; FAN, G.; SHI, B. Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. **Bioresource Technol.**, v. 101, p. 7679-7682, 2010.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 11, p. 387-93, 2000.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). **Microb. Genet. Bull.,** v. 13, p. 42-43, 1956.

VRIES, R. P.; VISSER, J.; GRAAFF, L. H. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. **Res. Microbiol.**, v. 150, p. 281-285, 1999.

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. and Bioeng.**, v. 109, p. 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.**, v. 105, n. 4, p. 367-374, 2008.

WONG, K. K. Y. Purification of a third distinct xylanase from xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol.**, v. 32, n. 7, p. 570-576, 1986.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v. 52, p. 305-317, 1988.

XU, Z.; MIAO, Y.; CHEN, J. Y.; JIANG, X.; LIN, L.; OUYANG, P. Co-immobilization mechanism of cellulase and xylanase on a reversibly soluble polymer. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 163, n. 1, p. 153-161, 2011.

YAN, X.; WANG, X.; ZHAO, P.; ZHANG, Y.; XU, P.; DING, Y. Xylanase immobilized nanoporous gold as a highly active and stable biocatalyst. **Microporous Mesoporous Mat.**, v. 161, p. 1-6, 2012.

ZHANG, M.; JIANG, Z.; YANG, S.; HUA, C.; LI, L. Cloning and expression of a *Paecilomyces thermophila* xylanase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant xylanase. **Bioresource Technol.**, v. 101, p. 688-695, 2010.