



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

PURIFICAÇÃO DE XILANASES DE *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 E SUA  
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

LUIZ CLÁUDIO SIMÕES CORRÊA JUNIOR

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

Dr<sup>a</sup>. SUSANA JULIANO KALIL  
Orientadora

Dr<sup>a</sup>. JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT  
Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2021



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

PURIFICAÇÃO DE XILANASES DE *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 E SUA  
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

LUIZ CLÁUDIO SIMÕES CORRÊA JUNIOR

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

Dr<sup>a</sup>. SUSANA JULIANO KALIL  
Orientador

Dr<sup>a</sup>. JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT  
Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2021

## Ficha Catalográfica

C824p Corrêa Junior, Luiz Cláudio Simões.  
Purificação de xilanases de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 e sua aplicação na produção de xilo-oligossacarídeos / Luiz Cláudio Simões Corrêa Junior. – 2021.  
81 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2021.

Orientadora: Dra. Susana Juliano Kalil.

Coorientadora: Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert.

1. Enzimas xilanolíticas 2. Precipitação 3. Hidrólise enzimática  
4. Oligossacarídeos 5. Levedura 6. Caracterização enzimática  
I. Kalil, Susana Juliano II. Burkert, Janaina Fernandes de Medeiros  
III. Título.

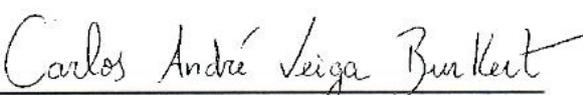
CDU 663.15

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

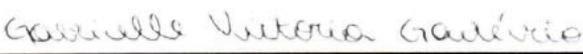
## APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Luiz Claudio Simões Corrêa Junior, com orientação da Prof. Dra. Susana Juliano Kalil, aprovada em 21 de setembro de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

  
Prof. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG

  
Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG

  
Prof. Dra. Caroline Costa Moraes – UNIPAMPA

  
Prof. Dra. Gabrielle Victoria Gautério - UFRJ



## AGRADECIMENTOS

À **Deus e a todos os mentores espirituais**, pela graça de ter saúde sem nenhuma limitação que me impedisse de alcançar meus objetivos.

À minha **Mãe** Denise, por ter me concebido a vida, por ser minha amiga e estar do meu lado dando suporte em diversas situações, especialmente quando a gente tem vontade de largar tudo. Te agradeço por ter me aceitado como sou, por todos os puxões de orelha e por me amar mesmo quando eu fiz algo que tenha te aborrecido. Aprendi contigo que **perdoar** não significa esquecer, mas sim lembrar do ocorrido e permanecer em paz com o outro e consigo mesmo. Obrigado por tudo, Mãe. Me faltam palavras para expressar o quanto sou grato por tudo. Eu te amo muito!

Ao meu **Pai**, Luiz Claudio, por ser meu amigo, ter me criado e me aceitado como sou. Por ter trabalhado tanto tempo para nos dar aquilo que nunca tiveste dos teus pais. Por ter sempre me incentivado a estudar e a seguir meus sonhos. Por tu ser uma pessoa que está sempre de bem com a vida e que busca sempre manter a calma em situações de estresse. Por ter me ensinado que ninguém faz nada **sozinho**. Por ser meu exemplo de **humildade**. Por mostrar a importância de se ter amigos e como mantê-los perto de nós. Por sempre estar aberto a conversar e a compartilhar teus conhecimentos. Sei que ainda tenho muito a aprender contigo. Pai, obrigado por tudo! Te amo muito!

À minha **irmã** Priscilla, por ser minha melhor amiga e fiel escudeira. Por ser a minha primeira referência em diversos aspectos da vida. Por influenciar meus gostos (especialmente os musicais) e ser a luz do farol que guia a minha vida. Por ser meu ombro amigo nas piores horas e sempre me aconselhar com palavras de **sabedoria**. Agradeço por tua presença em tantos momentos importantes da minha vida. Por ser meu exemplo de pessoa **responsável e trabalhadora**. Por ter me ensinado a ser uma pessoa carinhosa e batalhar pelos meus sonhos. Por toda ajuda e incentivo que me deste ao longo desses anos. Sou grato à vida por ser teu irmão e por termos construído nossa relação com carinho, respeito e amor. Me faltam palavras para agradecer e dizer tudo que tu representas. Como diz a **nossa música dos Beatles** – “You and I have memories longer than the road that stretches out ahead. **You and me** chasing paper, getting nowhere on our way back home”. Te amo sempre e para sempre!

Aos meus **avós** Neida e Walter (*in memoriam*), por terem sido meu **tudo**. Por terem participado da minha criação e me ensinado a ser um homem justo e de bom coração. Vozinha, obrigado por ter me amado tanto e por cada instante da vida que passamos juntos. Obrigado por todas as tardes com a cabeça deitada no teu colo recebendo cafuné. Nossa relação transcende palavras. Vó Neida, depois que tu partiste a vida nunca mais foi a mesma, mas deixastes dentro de mim duas coisas que vou levar comigo para todo o sempre: o **Amor** e a **Fé**. Sei que de onde estás sentes orgulho do homem que sou. Tenho fé que um dia nos reencontraremos para matar essa saudade. Obrigado por TUDO, meus amores. Este trabalho tem muito de vocês.

Ao meu namorado e grande Amor **Henrique**, por ao longo desses anos viver me dando suporte e me fazer acreditar no meu potencial quando eu mesmo já não acreditava. Obrigado por ouvir meus choros e frustrações. Obrigado por cada abraço e carinho naqueles momentos que a gente sente que perdeu o chão. Obrigado por ser meu amigo, meu companheiro... Por ter me feito enxergar as coisas e acreditar em mim quando tudo parecia tão impossível. Obrigado

por me aturar, tenho plena convicção que não foi/é uma tarefa fácil. Obrigado por sempre me ouvir e prestar atenção nos assuntos relacionados à graduação e pós-graduação. Sei que darias um aulão sobre xilanas, de tanto que me ouviste falar sobre. Haha Mor, obrigado por estar do meu lado, olhando na mesma direção, mesmo que esta acabe nos levando para caminhos diferentes temporariamente.

*“(...) You’re only everything I ever dreamed, ever dreamed of./ If you want to take it to an even higher level / If you want to make it happen, nothing is impossible / (...) I want you for a life time, so if you’re gonna think twice / Baby, I don’t wanna know, I don’t wanna know.. / (...) Kiss me once, kiss me twice, kiss me three times, be mine.. Don’t think twice...”*

**Eu te amo!** Obrigado por acreditar que um dia **chegaremos lá.**

À minha **amiga** Leticia, por se fazer tão presente na minha vida, mesmo morando no Paraná. Lê, obrigado por cada momento que tu me fizeste companhia no laboratório através de chamada de áudio pelo celular. Muitas vezes tua ligação me fez ter força para continuar com os experimentos, nem sei o que seria de mim sem tua companhia virtual. Obrigado pelas conversas, risadas e conselhos. Impossível não lembrar do dia que faltou gás no laboratório no meio de um experimento. Com certeza foi muito mais fácil superar porque estavas ali comigo. Te amo, amiga!

Às minhas amigas **Mariana e Taiele**, por estarem comigo há tanto tempo e por compartilharem do mesmo sonho. Obrigado pela convivência diária e por serem essas mulheres maravilhosas que são. Mari, obrigado pelo momento que dividimos a estrutura do LMB. Foi maravilhoso trabalhar novamente contigo e dividir almoços, cafezinhos, balanças e pipetas. Tai, obrigado por ir ao LMB me visitar, dividir angústias do mestrado e por vibrar por cada pequena conquista minha. Vocês são meu G3 e moram no meu coração.

À minha **amiga** Gabrielle Gautério, que me ajudou e contribuiu com o desenvolvimento deste trabalho de forma incansável. Gabi, me faltam palavras para agradecer todo suporte técnico e emocional que me deste ao longo da nossa caminhada no LMB. Foram diversas as vezes nas quais eu corri para te pedir ajuda e tu SEMPRE me atendeu com muita atenção e carinho. Obrigado por cada cafezinho com amendoim no lab, cada almocinho no RU e por sempre rir das minhas palhaçadas. Sou muito grato a ti. Obrigado por estar por perto mesmo estando longe do laboratório. Te admiro muito! Te amo e conte comigo sempre! <3

À minha **Orientadora**, Professora Susana, por todas as oportunidades que me deste. Profe, obrigado pela tua orientação e suporte ao longo do mestrado. Não foi somente em relação ao mestrado que me ajudasse. Tua orientação vai muito além da parte científica. Obrigado por cada conversa, cada conselho e por cada palavra de carinho e incentivo. Me faltam palavras para te agradecer. Se estou terminando o mestrado é porque um dia tu me deste a oportunidade de ser iniciante científico no laboratório. Sinto muito orgulho de ser teu último orientado de mestrado e encerrar esse ciclo contigo. Obrigado por TUDO, professora.

À minha **Co-orientadora**, Professora Janaina, te agradeço por aceitar me coorientar e por contribuir com este trabalho. Obrigado por sempre me receber com um sorriso no rosto e por reconhecer meu esforço e dedicação. Tuas palavras sempre me motivaram a seguir dando o melhor de mim. Obrigado por tudo!

Às minhas colegas e parceiras de laboratório **Andressa, Ana, Luisa, Marina, Thaís, Nathiele e Igreine**, por todos os momentos em que convivemos no laboratório e por tudo que me ensinaram.

À minha iniciante científica **Sarah**, por toda ajuda que me deste no início do mestrado. Os ensaios de purificação foram muito mais leves quando estavas junto. Não só pelo trabalho físico, mas pela tua companhia agradabilíssima. És uma guria dedicada e responsável, tens um futuro brilhante pela frente! Muito obrigado!

Aos **Professores e técnicos administrativos do PPGECA** por todo apoio e excelente trabalho desenvolvido.

À **banca examinadora** pela disponibilidade em participar deste momento tão importante. Agradeço imensamente pelas contribuições que fizeram.

À **CAPES**(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro.

À **Universidade Federal do Rio Grande** por transformar minha vida através do ensino público, gratuito e de qualidade.



## RESUMO

Enzimas xilanolíticas estão envolvidas na hidrólise da xilana, sendo que as principais incluem as endo- $\beta$ -1,4-xilanases (xilanases) e  $\beta$ -xilosidases. Estas podem ser aplicadas na bioconversão de materiais lignocelulósicos em produtos de valor agregado, como xilo-oligossacarídeos (XOs). Os XOs são oligossacarídeos que apresentam atividade prebiótica, sendo obtidos preferencialmente por hidrólise enzimática. A produção de xilanases por leveduras merece destaque, pois são secretadas enzimas com alta atividade de endo- $\beta$ -xilanases e baixa de  $\beta$ -xilosidases, característica desejável para a produção de XOs. Técnicas de purificação podem ser aplicadas para separação destas enzimas, de forma a favorecer a produção de XOs pela atenuação da produção de xilose. Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo para purificação de xilanases de *Aureobasidium pullulans*, bem como caracterizar e aplicar o extrato enzimático purificado na produção de XOs. Os cultivos para produção da enzima foram realizados em frascos Erlenmeyer aletados com 147 mL de meio estéril (pH 7.0) contendo (g/L) farelo de arroz (61,9), extrato de levedura (1,5) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3,6), além de 3 mL de inóculo. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital (150 rpm) e a 28 °C por 72 h. As técnicas de purificação da enzima estudadas foram a precipitação com sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e etanol em diferentes concentrações, em um único estágio e de forma fracionada (dois ou mais estágios). A enzima purificada foi caracterizada em termos do pH e temperatura ótimo, efeito de íons metálicos na atividade, parâmetros cinéticos, estabilidade térmica e em relação ao pH. A produção de XOs foi realizada a 45 °C, 3 % (m/v) de xilana de faia, pH 4,5, relação enzima:substrato 200 U/g, 180 rpm, por 24 h. Nestas condições de hidrólise foi avaliado o efeito de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . A purificação da xilanase por precipitação fracionada (0-20/20-60 %) com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi mais eficiente, com fator de purificação (FP) 10,27 vezes e recuperação da atividade enzimática de 48,6 % que a precipitação fracionada com etanol (FP = 5,54 e recuperação da atividade enzimática de 43,01 %). A xilanase purificada exibiu temperatura e pH ótimos de 50 °C e 4,5, respectivamente. A constante de Michaelis-Menten para a enzima purificada foi de 74,9 mg/mL. A adição dos sais  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$  no meio reacional promoveu o aumento da atividade, sendo que o  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mmol/L) destacou-se entre os demais pois aumentou a atividade da xilanase em 44 %. A xilanase purificada com sal apresentou maior estabilidade térmica a 45 °C e pH 4,5 com meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de 169 h. Nestas condições e na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mmol/L) a enzima foi ainda mais estável ( $t_{1/2}$  = 231 h). Nas reações de hidrólise os teores de XOs totais (6,7 mg/mL) e a conversão da xilana em XOs (22,3 %) não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre 2 e 24 h de processo. Os hidrolisados apresentaram composição majoritária de xilobiose, xilotriose e xilose. A adição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  não contribuiu para o aumento do conteúdo de XOs totais nem para maior conversão de xilana em XOs, porém o hidrolisado apresentou menor conteúdo de xilose e maior de xilobiose em 24 h.

**Palavras-chave:** Enzimas xilanolíticas. Precipitação. Hidrólise enzimática. Oligossacarídeos. Levedura. Caracterização enzimática.



## ABSTRACT

Xylanolytic enzymes are involved in xylan hydrolysis, the main ones being endo- $\beta$ -1,4-xylanases (xylanases) and  $\beta$ -xylosidases. They can be applied to bioconvert lignocellulosic materials into value-added products such as xylooligosaccharides (XO). XOs are oligosaccharides with prebiotic activity, preferably obtained by enzymatic hydrolysis. The production of xylanases by yeasts is noteworthy, as enzymes with high endo- $\beta$ -xylanase activity and low  $\beta$ -xylosidases activity are secreted, which is a desirable characteristic to produce XOs. Purification techniques can be applied to separate these enzymes, favoring the production of XOs by attenuating the xylose production. This study aimed to establish a protocol for the purification of xylanases from *Aureobasidium pullulans*, as well as to characterize and apply the purified enzyme into XOS production. Enzyme production was carried out in Erlenmeyer flasks (500 mL) with 147 mL of sterile medium (pH 7.0) containing rice bran 61.9 g/L. All cultivations occurred under orbital shaking (150 rpm) at 28 °C for 72 h. The enzyme purification techniques studied were ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and ethanol precipitation at different concentrations, in a direct and fractionated (two or more steps) ways. The purified xylanase was characterized in terms of optimum pH and temperature, kinetic parameters, effects of metal ions, thermal stability and in relation to pH. XOS were produced by enzymatic hydrolysis of beech xylan using purified xylanase in an incubator with temperature control (45 °C) and orbital shaking (180 rpm) 3% (w/v) of beech xylan, enzyme:substrate ratio (200 U/g) and pH 4.5 for 24 h. Under these hydrolysis conditions, the effect of the  $\text{Ca}^{2+}$  ion was evaluated. Purification of xylanase by fractional precipitation (0-20 / 20-60 %) with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was more efficient (purification factor (PF) of 10.27 times and a recovery of enzyme activity of 48.6 %) than with ethanol fractional precipitation (PF = 5.54 times and a recovery of enzyme activity of 43.01%). The purified xylanase exhibited optimum temperature and pH of 50 °C and 4.5, respectively. The Michaelis-Menten constant for the purified enzyme was 74.9 mg/mL. The addition of salts such as  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  and  $\text{FeCl}_3$  in the reaction medium increased the xylanase activity. The  $\text{Ca}^{2+}$  ion (10 mmol/L) stood out among the other ions due to an increase in enzymatic activity by 44 %. The purified xylanase by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  showed greater thermal stability ( $t_{1/2} = 169$  h) at 45 °C and pH 4.5. Under these conditions and in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions the enzyme was even more stable ( $t_{1/2} = 231$  h). In the studied temperature range (45 - 55 °C) it was found that xylanase is more stable at pH 4.5. In hydrolysis reactions for total XOs contents (6.7 mg/mL) and the conversion of xylan to XOs (22.3 %) between 2 and 24 h were statistically equal. The hydrolysates showed the majority composition of xylobiose, xylotriosis and xylose. The addition of  $\text{Ca}^{2+}$  ions did not contribute to an increase in the total XOs content or to a greater conversion of xylan into XOs. However, the hydrolysate showed lower content of xylose and higher content of xylobiose in 24 h.

**Keywords:** Xylanolytic enzymes. Precipitation. Enzymatic hydrolysis. Oligosaccharides. Yeast. Enzyme characterization.



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Purificação de xilanases por diferentes técnicas.....	30
<b>Tabela 2</b> – Produção enzimática de xilo-oligossacarídeos.....	35
<b>Tabela 3</b> – Eficiência do processo de purificação da xilanase em diferentes saturações de sulfato de amônio.....	47
<b>Tabela 4</b> – Purificação da xilanase por precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	49
<b>Tabela 5</b> – Eficiência do processo de purificação da xilanase em diferentes concentrações de etanol.....	50
<b>Tabela 6</b> – Eficiência do processo de purificação da xilanase por precipitação fracionada com etanol.....	53
<b>Tabela 7</b> – Atividade de diferentes enzimas presentes no extrato bruto e purificado.....	54
<b>Tabela 8</b> – Influência de diferentes íons metálicos na atividade da xilanase purificada com sulfato de amônio.....	59
<b>Tabela 9</b> – Valores de $K_d$ e meia vida ( $t_{1/2}$ ) de desnaturação térmica da xilanase purificada com sulfato de amônio.....	63
<b>Tabela 10</b> – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão da xilana de faia utilizando a xilanase purificada.....	65
<b>Tabela 11</b> – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão da xilana de faia utilizando a xilanase purificada em presença de íons cálcio.....	65



**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Precipitados obtidos na precipitação com (a) etanol e (b) sulfato de amônio.....	53
<b>Figura 2</b> – Efeito da (a) temperatura e (b) do pH na atividade da xilanase purificada.....	56
<b>Figura 3</b> – Gráfico Lineweaver-Burk para a xilanase purificada com sulfato de amônio.....	58
<b>Figura 4</b> – Efeito do íon cálcio na atividade da xilanase purificada com sulfato de amônio em diferentes valores de (a) pH e (b) temperatura.....	61
<b>Figura 5</b> – Linearização da cinética de desnaturação térmica da xilanase purificada com sulfato de amônio a 45 °C e pH 4,5.....	63



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>25</b>
3.1	ENZIMAS XILANOLÍTICAS .....	25
3.2	PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS .....	26
<b>3.2.1</b>	<b>Precipitação de proteínas .....</b>	<b>27</b>
3.2.1.1	Precipitação de xilanases .....	28
3.3	CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....	31
3.4	XILO-OLIGOSSACARÍDEOS .....	33
<b>3.4.1</b>	<b>Produção de xilo-oligossacarídeos.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1	MATERIAL .....	37
4.2	MÉTODOS .....	37
<b>4.2.1</b>	<b>Preparo do farelo de arroz.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Produção das xilanases pela levedura.....</b>	<b>37</b>
4.2.2.1	Preparo do pré-inóculo e inóculo .....	37
4.2.2.2	Preparo e condições de cultivo .....	38
<b>4.2.3</b>	<b>Determinação da atividade de enzimas xilanolíticas e celulases totais no extrato bruto .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Purificação de xilanases .....</b>	<b>38</b>
4.2.4.1	Precipitação de xilanases com sulfato de amônio .....	39
	Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	39
4.2.4.2	Precipitação de xilanases com etanol .....	40
	Precipitação fracionada de xilanases com etanol.....	40
<b>4.2.5</b>	<b>Caracterização enzimática da xilanase purificada .....</b>	<b>41</b>
4.2.5.1	Temperatura e pH ótimos .....	41
4.2.5.2	Determinação dos parâmetros cinéticos .....	41
4.2.5.3	Influência de íons metálicos na atividade de xilanase.....	42
4.2.5.4	Influência do íon Cálcio na atividade de xilanases em diferentes valores de temperatura e pH. ....	42
4.2.5.5	Efeito da temperatura e do pH na estabilidade da xilanase .....	43
<b>4.2.6</b>	<b>Hidrólise enzimática de xilana de faia e produção de xilo-oligossacarídeos .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Determinações analíticas.....</b>	<b>44</b>
4.2.7.1	Determinação da atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase, $\beta$ -xilosidase e $\beta$ -glicosidase .....	44
4.2.7.2	Determinação da atividade de celulases totais .....	45
4.2.7.3	Concentração de proteína solúvel.....	45
4.2.7.4	Determinação do pH.....	45
4.2.7.5	Análise dos hidrolisados por CLAE.....	45
<b>4.2.8</b>	<b>Análise estatística dos resultados .....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>

5.1	PURIFICAÇÃO DE XILANASES POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO .....	47
5.2	PURIFICAÇÃO DE XILANASES POR PRECIPITAÇÃO COM ETANOL .....	50
5.3	COMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO E PURIFICADO.....	53
5.4	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE XILANASES PURIFICADO.....	55
5.4.1	Temperatura e pH ótimos.....	55
5.4.2	Parâmetros cinéticos ( $K_m$ e $V_{máx}$ ).....	57
5.4.3	Influência de íons metálicos na atividade de xilanases utilizando o extrato purificado.....	58
5.4.4	Determinação da estabilidade térmica e em relação ao pH de xilanases .....	61
5.5	PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS .....	64
6	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## 1 INTRODUÇÃO

As hemiceluloses são polissacarídeos encontrados na parede celular de plantas e estão geralmente associadas à celulose e lignina. A xilana é o principal polissacarídeo constituinte das hemiceluloses, sendo formada por monômeros de D-xilose unidos através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 na cadeia principal e diferentes carboidratos (ácidos urônicos, L-ramnose e oligossacarídeos) em cadeias laterais (PRAKASH et al., 2012; SILVA et al., 1998). A xilana pode ser obtida de diferentes fontes, incluindo resíduos agroindustriais (PATIPONG et al., 2019; YANG et al., 2005) e ser utilizada como substrato para a produção de xilose, xilitol (BAPTISTA et al., 2020; CANNETIERI; SILVA; FELIPE, 2002; CANILHA, 2006) xilo-oligossacarídeos (XOs) (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015) e enzimas xilanolíticas (GAUTÉRIO et al., 2018).

Devido à sua estrutura complexa, a degradação completa da xilana requer a ação sinérgica de várias enzimas hidrolíticas, conhecidas como enzimas do sistema xilanolítico. As endo- $\beta$ -1,4-xilanases (E.C 3.2.1.8) são as enzimas xilanolíticas mais importantes, pois atuam clivando as ligações glicosídicas internas no esqueleto da xilana - o que reduz o seu grau de polimerização (GP) (ANAND; KUMAR; SATYANARAYANA, 2013; SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015). As xilanases podem ser produzidas por algas, fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo que a maioria das xilanases comerciais são produzidas por bactérias aeróbias e fungos filamentosos (HALTRICH et al., 1996; RAJAGOPALAN et al., 2013). A produção de xilanases por diferentes cepas de *A. pullulans* vem sendo estudada desde 2016 no Laboratório de Microbiologia e Biosseparações da Universidade federal do Rio Grande (FURG) onde foi verificado que a cepa CCT 1261 é capaz de produzir xilanases com alta atividade (74,9 U/mL) (GAUTÉRIO et al., 2018).

As xilanases são aplicadas em diferentes segmentos como na fabricação de papel (WALIA et al., 2017), clarificação de sucos (SHAHRESTANI et al., 2016), e produção de XOs (CHEN et al., 2009; DING; LI; HU, 2018; FU et al., 2019). Os XOs são oligômeros não digeríveis contendo entre duas a dez unidades de xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4. Estes oligômeros são produzidos a partir da hidrólise da xilana e podem apresentar capacidade prébiótica, ou seja, podem estimular o crescimento de bactérias benéficas ao intestino humano (AMORIM et al., 2019).

No caso da produção de XOs por ação de xilanases, a purificação do extrato enzimático permite a remoção de impurezas e/ou outras enzimas, como a  $\beta$ -xilosidase. A aplicação do extrato enzimático purificado na produção de XOs pode levar a obtenção de um

hidrolisado composto majoritariamente por XOs com mínima formação de xilose, visto que a  $\beta$ -xilosidase produz xilose a partir da hidrólise dos XOs formados (CHEN et al., 2019; DING; LI; HU, 2018; REDDY; KRISHNAN, 2016).

Dentre as técnicas de purificação de xilanases, a precipitação com sulfato de amônio é amplamente utilizada (CHEN et al., 2019; PAL; KHANUM, 2011). Embora menos frequente, a precipitação com etanol também tem sido utilizada para a purificação de xilanases (CORTEZ; PESSOA, 1999; COSTA; FARINAS; MIRANDA, 2018). A purificação de proteínas por precipitação é considerada uma técnica de baixo custo e relativa simplicidade operacional, pois requer a utilização de equipamentos mais simples, quando comparado a outras técnicas. (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005).

Após estabelecer uma técnica de purificação, o estudo de caracterização da enzima purificada produzirá o conhecimento das características de atuação da enzima como por exemplo, o efeito de diferentes íons na sua atividade bem como sua estabilidade frente a condições adversas de processos industriais, como em diferentes pHs e temperaturas (DING; LI; HU, 2018). Em razão disso, é fundamental estabelecer um protocolo para purificação deste bioproduto que promova um aumento na sua pureza e mantenha sua atividade biológica, para em seguida, estudar sua aplicabilidade e desempenho em processos biotecnológicos (BHARDWAJ et al., 2019; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012).

O estudo do comportamento da xilanase na presença de sais é de extrema importância, uma vez que o desconhecimento da interferência de alguns compostos pode comprometer a aplicação efetiva da enzima em processos industriais. Neste sentido, diversos trabalhos de purificação e caracterização de xilanases mostram que estas enzimas podem ter sua atividade aumentada ou diminuída em presença de diferentes íons metálicos (BANKEEREE et al., 2014; BHARDWAJ et al., 2019; CHEN et al., 2019; RAJ et al., 2018). Apesar da importância de íons na atividade das xilanases e da vasta quantidade de artigos disponíveis, até o momento, não foram encontrados estudos que tenham avaliado o efeito destes compostos no processo enzimático de produção de XOs.

Embora existam diversos estudos na literatura que mencionem a purificação de xilanases, poucos se detêm em estabelecer um protocolo de purificação eficiente e possível de ampliação de escala, o que é imprescindível quando se deseja aplicar a enzima purificada industrialmente. Além disso, estudos que abordem a caracterização da enzima são necessários, pois através deles é possível conhecer como a enzima se comporta e pode-se direcionar sua aplicação de forma mais eficiente.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo consiste em estabelecer um protocolo para purificação de xilanases de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, caracterizar a enzima purificada e aplicar o extrato na produção de XOs.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a purificação de xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 por precipitação com sulfato de amônio e etanol em diferentes concentrações;
- Caracterizar o extrato enzimático purificado quanto as suas propriedades bioquímicas;
- Avaliar o efeito de diferentes íons metálicos na atividade da enzima purificada;
- Caracterizar o extrato enzimático purificado em relação à estabilidade térmica e ao pH e verificar o efeito de íon metálico na melhor condição de estabilidade para a xilanase;
- Produzir XOs utilizando o extrato enzimático purificado e avaliar o efeito da adição de íon metálico no meio reacional sobre conteúdo de XOs totais.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ENZIMAS XILANOLÍTICAS

Enzimas xilanolíticas constituem um grupo de hidrolases envolvidas na catálise da reação de hidrólise da xilana. Esta reação é realizada pela atuação sinérgica de xilanases (endo- $\beta$ -1,4-xilanases, E.C.3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidases (E.C.3.2.1.37),  $\alpha$ -arabinofuranosidases (E.C.3.2.1.55), acetil xilana esterases (E.C.3.1.1.72),  $\alpha$ -glicuronidases (E.C.3.2.1.139) e feruloil esterases (E.C.3.1.1.37). Dentre essas, a mais importante é a xilanase, pois atua na degradação da xilana em xilo-oligossacarídeos (XOs) (ANAND; KUMAR; SATYANARAYANA, 2013). As  $\beta$ -xilosidases atuam na extremidade não redutora da xilobiose ou de outros XOs liberando xilose, e as demais enzimas atuam na remoção de substituintes laterais presentes na cadeia da xilana (SHENG et al., 2014). A especificidade das xilanases difere de acordo com sua origem, ou seja, produzidas por diferentes organismos em condições variadas e da família a qual pertencem (F10 ou G11) (BASTAWDE, 1992; LIAB et al., 2000). Algumas xilanases clivam as ligações apenas em regiões não substituídas, enquanto outras exigem a presença de cadeias laterais nas proximidades das ligações hidrolisadas (POLAINA; MACCABE, 2007).

As xilanases apresentam aplicações variadas como no processo de fabricação do papel (WALIA et al., 2017), na indústria de panificação (BUTT et al., 2008) e na clarificação de sucos (SHAHRESTANI et al., 2016). Xilanases também podem ser utilizadas para fins mais específicos, como na produção de XOs a partir de xilanas previamente extraídas (HALTRICH et al., 1996).

As xilanases podem ser produzidas principalmente por algas, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (HALTRICH et al., 1996; RAJAGOPALAN et al., 2013) e também são encontradas no rúmen de animais superiores (BEG et al., 2001). Fungos filamentosos (BORUAH et al., 2015) e bactérias (IRFAN et al., 2016) secretam altos níveis de xilanases, no entanto, algumas espécies também secretam celulases e  $\beta$ -xilosidases (KNOB; CARMONA, 2009). Adicionalmente, os extratos produzidos por fungos e bactérias podem conter outras enzimas além da xilanases, como as celulases (ADHYARU; BHATT; MODI, 2015). Por outro lado, algumas leveduras produzem extratos enzimáticos com alta atividade de xilanases, livres de celulases (BANKEEREE et al., 2016; GAUTÉRIO et al., 2020) e com baixa atividade de  $\beta$ -xilosidases (FARIA et al., 2019; OTERO et al., 2015). Extratos enzimáticos com baixa quantidade de  $\beta$ -xilosidase são desejáveis para a produção de XOs, já que a atividade desta enzima no extrato causa a redução da produção de XOs devido ao acúmulo de xilose no meio, o que possivelmente inibe a atuação da endo- $\beta$ -1,4-xilanase (VÁZQUEZ et al., 2002).

Adsul, Bastawde e Gokhale (2009) mostraram que as xilanases produzidas pela levedura *Pseudozyma hubeiensis* apresentaram grande potencial de aplicação na produção de XOs, pois foram obtidos oligossacarídeos com GP entre 3 e 7 sem a formação de xilose. Gomes, Gomes e Steiner (2000) avaliaram a produção de xilanases pela levedura *Cryptococcus adeliae* utilizando xilana de madeira de faia como substrato. Os autores observaram a produção de  $\beta$ -xilosidase e outras enzimas auxiliares, porém em pequena quantidade. Otero et al. (2015) verificaram que a levedura *Cryptococcus laurentii* é capaz de produzir endo- $\beta$ -1,4-xilanase e pequena produção de  $\beta$ -xilosidase e celulase utilizando xilana de madeira de faia como substrato.

A produção de endo- $\beta$ -1,4-xilanase por *Aureobasidium pullulans* utilizando diversos substratos agroindustriais foi estudada por Yegin et al. (2017). De acordo com os autores, a maior produção da enzima ocorreu em presença de farelo de trigo como substrato. Gautério et al. (2018), estudaram a produção de xilanase por diferentes cepas de *Aureobasidium pullulans* (CCT 1261, CCT 7521 e CCT 4154) utilizando xilana de faia como substrato. A maior produção da enzima foi alcançada pela cepa CCT 1261. Além disso, todas as cepas estudadas apresentaram pequena produção de  $\beta$ -xilosidase, característica promissora para aplicação do extrato enzimático na produção de XOs.

Utilizando a cepa CCT 1261, Gautério et al. (2018) avaliaram a produção de endo- $\beta$ -1,4-xilanase em cultivo submerso tendo como substrato diferentes resíduos agroindustriais como farelo e casca de arroz, casca de soja, engaço de uva e pergaminho de café. Os autores verificaram que a maior produção da enzima ocorreu em presença de farelo de arroz (11,7 U/mL). Posteriormente, Gautério et al. (2020) alcançaram atividade enzimática 7 vezes maior (82,2 U/mL) pelo estudo de maximização de sua produção.

### 3.2 PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS

A recuperação e purificação de bioprodutos engloba todas as etapas do processo desde a extração celular até o produto purificado. As primeiras etapas incluem técnicas de baixa resolução como precipitação, centrifugação, sistema aquoso bifásico ou a combinação das mesmas (JUNGBAUER, 2013).

Vários processos de purificação incluem ao menos uma etapa de precipitação com sais ou solvente orgânico. Para meios com moderada variedade de contaminantes, por exemplo, quando a molécula alvo é uma proteína extracelular, a precipitação pode ser um método efetivo para purificação (PESSOA JR; KILIKIAN, 2020). No entanto, para produtos intracelulares é

necessário efetuar o rompimento celular prévio, tornando o processo de purificação de biomoléculas mais difícil em comparação aos bioprodutos extracelulares, pois a molécula-alvo é liberada com todas as outras moléculas intracelulares, o que amplia a diversidade de contaminantes (NELSON; COX, 2006; SCOPES, 1994).

### 3.2.1 Precipitação de proteínas

Após a etapa de clarificação durante a produção de enzimas extracelulares em cultivos microbianos, uma das formas de concentrar e purificar essas biomoléculas é através da técnica de precipitação. Precipitados de proteínas são agregados de diferentes moléculas proteicas, grandes o suficiente para serem observados a olho nu, e que sedimentam sob valor de força centrífuga relativamente baixa (SCOPES, 1994) Entre as técnicas que podem precipitar reversivelmente uma proteína de uma solução estão a precipitação por adição de altas concentrações de sais devido ao aumento da força iônica ou por solventes orgânicos que causam diminuição da constante dielétrica (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). Dependendo do grau de pureza necessário para a utilização final, a precipitação pode atuar como única etapa de purificação (PESSOA JR; KILIKIAN, 2020).

A forma mais comum de causar a precipitação seletiva de proteínas é pelo aumento da concentração de sais em solução, efeito chamado de *salting out*. A adição de altas concentrações salinas a uma solução de proteínas causa a precipitação, em grande parte pela remoção da água de solvatação de regiões hidrofóbicas na superfície da proteína, fazendo com que essas regiões interajam entre si, resultando na sua agregação e posterior precipitação. A precipitação é uma técnica muito utilizada nas primeiras etapas de purificação de proteínas, podendo ser empregada de forma simples ou fracionada, a fim de se obter uma purificação inicial do produto (CUTLER, 2004).

O sal mais utilizado para a precipitação de proteínas é o sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), pois sua solubilidade varia pouco em ampla faixa de temperatura e apresenta propriedades não desnaturantes para a maioria das proteínas (SCOPES, 1994; WALSH, 2002). A precipitação fracionada é comumente realizada em duas etapas. No primeiro passo ocorre a precipitação de proteínas contaminantes pela adição de baixas concentrações de sulfato de amônio (geralmente em torno de 30 % de saturação do sal). No segundo passo adiciona-se mais sal ao sobrenadante, até que se atinja a concentração desejada (aproximadamente 65 % de saturação do sal), de forma que ocorra a precipitação da proteína de interesse (NOVÁK; HAVLÍČEK, 2016)

A adição de um solvente miscível, como etanol ou acetona, a um extrato aquoso contendo proteínas tem uma variedade de efeitos, que, combinados, levam à precipitação de proteínas. O principal efeito é a redução da atividade de água em função da diminuição do poder de solvatação da água para uma molécula de proteína hidrofílica carregada, ao passo que a concentração de solvente aumenta (também descrito como a redução da constante dielétrica do solvente) (SCOPE, 1994). Conforme a constante dielétrica do meio diminui pela adição do solvente, percebe-se a redução da camada de hidratação, pois o solvente orgânico desloca progressivamente a água da superfície da proteína e a liga nas camadas de hidratação ao redor das moléculas do solvente. Com camadas de hidratação menores, ocorre o aumento nas interações eletrostáticas, resultando na agregação das moléculas proteicas (NOVÁK; HAVLÍČEK, 2016). Como o etanol apresenta boas propriedades físico-químicas (miscibilidade completa em água, baixo ponto de congelamento, alta volatilidade, baixa toxicidade), baixo custo (especialmente no Brasil) e pode ser utilizado para precipitar diversos tipos de proteínas, pode ser considerado como um importante agente precipitante (CORTEZ; PESSOA JR; ASSIS, 1998).

### 3.2.1.1 Precipitação de xilanases

Diversos protocolos de purificação de xilanases por precipitação vêm sendo realizados para que se obtenha a enzima com maior grau de pureza e elevada recuperação. A purificação por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tem sido uma das técnicas mais empregadas na purificação de xilanases, conforme mostra a Tabela 1.

É possível observar (Tabela 1) que nas precipitações realizadas em uma única etapa a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  variou de 50 a 80 % de saturação. Nessas saturações é possível observar que a maior recuperação da atividade enzimática obtida foi de 65% em saturação de 50 % (ZHANG et al., 2012). Em saturações de sulfato de 60 e 80 % (NINAWA, KAPOOR; KUHAD, 2008; SEEMAKRAM et al., 2016) percebe-se uma diminuição da recuperação para 58,9 e 13,3 %, respectivamente.

Em relação aos estudos envolvendo a precipitação fracionada, destacam-se as pesquisas de Ding, Li e Hu (2018) e Pal e Khanum (2011) pois apresentaram os maiores valores de recuperação (88,2 e 81,9 %) e fator de purificação (11,7 e 3,76). Ding, Li e Hu (2018) destacam que a escolha das faixas de saturação do sal foi baseada em ensaios preliminares de precipitação em um único estágio onde se verificou que abaixo de 20 % de saturação de sulfato de amônio não ocorreu nenhuma alteração na atividade da enzima na parcela do sobrenadante,

ou seja, a concentração de sal utilizada não foi suficiente para provocar a precipitação da enzima. Quando a saturação do sal foi maior que 60 %, a atividade da enzima medida no sobrenadante foi próxima a zero, ou seja, quase toda enzima foi precipitada. Após a precipitação por sulfato de amônio, o extrato enzimático foi dialisado, purificado por cromatografia e aplicado na hidrólise de xilana de faia para produção de XOs. A aplicação do extrato purificado causou o aumento no conteúdo total de XOs ( $2 \leq GP \leq 4$ ) de 81,6 para 92,2 % e redução de 3 vezes no conteúdo de xilose em comparação com os resultados obtidos pelo extrato bruto, característica desejável para a produção industrial de XOs.

Em relação à precipitação de xilanases com etanol, verifica-se que em concentração maior ou igual a 80 % (v/v) são obtidas recuperações da enzima na faixa de 79 e 100 %, e abaixo de 10 % ao utilizar a concentração de 40 %. No estudo de Cortez, Pessoa Jr e Assis (1998), os autores observaram que na concentração de 40 % (v/v) de etanol aproximadamente 30 % do conteúdo de proteínas totais foi precipitado, enquanto 95 % da xilanase permaneceu na parcela sobrenadante. Quando a precipitação foi realizada pela adição de etanol em 80 % (v/v), Cortez; Pessoa Jr e Assis (1998) observaram que 100 % da xilanase foi precipitada e cerca de 30 % das proteínas totais permaneceram no sobrenadante. Com base nesses resultados, os autores sugerem que a precipitação seja realizada em dois cortes: no primeiro utiliza-se 40 % (v/v) de etanol e no segundo corte o solvente é adicionado ao sobrenadante até atingir a concentração de 80 % (v/v), de forma que o FP possa aumentar duas vezes.

Na precipitação de xilanases com etanol (fracionada em três cortes) realizada por Cortez e Pessoa Jr (1999), observa-se que no primeiro fracionamento ocorreu a precipitação da maior parte das proteínas contaminantes (74 %) e menos de 10 % de xilanases e  $\beta$ -xilosidases. No segundo corte atingiu-se a concentração de 60 % (v/v) de etanol e 74 e 12 % de  $\beta$ -xilosidases e proteínas contaminantes são precipitadas com pequena perda da atividade de xilanases. No terceiro fracionamento atingiu-se 80 % (v/v) de etanol no extrato e 81 % das xilanases precipitam com aumento na sua pureza de 4,4 vezes. A última fração apresentou baixa atividade de  $\beta$ -xilosidase e com isso os autores destacam que a separação seletiva dessas enzimas por precipitação etanólica pode favorecer os processos de hidrólise de hemiceluloses (xilanas), dependendo do produto de hidrólise que se deseja, já que pode ser realizado em mais de uma etapa utilizando condições de processo mais adequadas para a atuação separada de cada enzima (CORTEZ; PESSOA JR, 1999).

**Tabela 1** – Purificação de xilanases por diferentes técnicas de precipitação.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Técnica de purificação</b>	<b>AE<sub>R</sub> (%)*</b>	<b>FP**</b>	<b>Referência</b>
<i>Neusartorya tatenoi</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (80 %)	13,30	1,25	SEEMAKRAM et al. (2016)
<i>Streptomyces cyaneus</i> SN32	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (60 %)	58,90	1,48	NINAWA; KAPOOR; KUHAD (2008)
<i>Thermobifida halotolerans</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (50 %)	65,0	1,70	ZHANG et al. (2012)
<i>Aspergillus niger</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30 – 65 %)	81,90	3,76	PAL; KHANUM (2011)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (50 – 80 %)	50,30	1,81	BANKEEREE et al. (2014)
<i>Aspergillus flavus</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (50 – 70 %)	45,0	2,85	GAUTAM; KUMAR; DUTT (2017)
<i>Rhizopus orizae</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (40 – 75 %)	12,30	2,48	BAKIR et al. (2001)
<i>Aspergillus flavus</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30 – 70 %)	23,60	3,89	BHUSHAN et al. (2015)
<i>Aspergillus foetidus</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30 – 70 %)	> 50,0	1,70	CHAPLA, PANDIT; SHAH (2012)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (20 – 80 %)	26,80	1,13	BOONRUNG et al. (2016)
<i>Pichia stipitis</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (20 – 60 %)	88,20	11,7	DING; LI; HU, 2018
<i>Aspergillus flavus</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (40 – 60 %)	46,70	2,70	CHEN et al. (2019)
<i>Aspergillus niger</i>	Etanol 85 % (v/v)	79,0	1,03	COSTA; FARINAS; MIRANDA (2018)
<i>Penicilium janthinellum</i>	Etanol 20 - 60 – 80 % (v/v)	6; 7; 81	0,1; 0,6; 4,4	CORTEZ; PESSOA JR (1999)
<i>Penicilium janthinellum</i>	Etanol 40 / 80 % (v/v)	<10; 100	-	CORTEZ; PESSOA JR; ASSIS (1998)
<i>Trichoderma harzianum</i> P49P11	Etanol 90 % (v/v)	100	-	MARIÑO; FREITAS; MIRANDA (2015)

\*AE<sub>R</sub> (%): Atividade enzimática recuperada; \*\*FP: Fator de purificação;

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

O potencial de aplicação de uma enzima em determinado processo depende do conhecimento de parâmetros que afetam sua atividade catalítica. O estudo das propriedades enzimáticas, tais como as condições ótimas de temperatura e pH, os perfis de temperatura e de estabilidade, especificidade do substrato, e as características termodinâmicas e cinéticas, podem ser utilizadas como ferramenta para avaliar a aplicação bem sucedida da enzima (CASTRO et al., 2015). Da mesma forma, é relevante o conhecimento de compostos que atuam inibindo ou estimulando o poder catalítico das enzimas (BEG et al., 2001).

Processos industriais são geralmente ambientes hostis em termos de temperatura e pH elevados, bem como pela presença de diferentes inibidores, como os íons metálicos. Em razão disso, pesquisadores vêm buscando a existência de enzimas estáveis em condições de processo mais severas (BEG et al., 2001). Um dos desafios na produção de enzimas é garantir que o produto obtido retenha sua atividade biológica por longos períodos pois as indústrias não as utilizam de forma imediata, e sim as armazenam até seu emprego. Sendo assim, faz-se necessário o estudo de procedimentos que evitem a perda significativa de sua atividade biológica durante algum processo ou ao longo de seu armazenamento (PESSOA JR; KILIKIAN, 2020)

Os mecanismos de desativação podem ser complexos, uma vez que as enzimas têm estruturas definidas, e um desvio da sua forma nativa pode afetar sua atividade específica (LEMES, 2015). A estabilidade de uma proteína em solução depende de sua interação com a água (solvente) e especialmente do seu grau de hidratação. Sendo assim, a perda de água de hidratação provoca um estado termodinamicamente instável que pode resultar na perda da estrutura secundária e/ou terciária. A presença de cossoluto (sal, açúcar, ureia, polímeros de cadeia flexível) altera a interação entre a água e a proteína e, portanto, sua estabilidade. O aumento do grau de hidratação da proteína em função de sua interação com o cossoluto reflete no aumento de estabilidade termodinâmica devido ao aumento da quantidade de calor necessário para desnaturar a proteína (PESSOA JR; KILIKIAN, 2020).

Os parâmetros cinéticos como a meia vida ( $t_{1/2}$ ), constante de desativação, energia de ativação ( $E_a$ ), mudanças na energia livre de Gibbs, entalpia e entropia de enzimas são geralmente empregados para descrever a desnaturação termodinâmica e podem ajudar a otimizar o rendimento de processos envolvendo enzimas (GOHEL; SINGH, 2018).

O melhoramento da estabilidade enzimática durante uma reação é um foco importante de estudo que pode trazer benefícios econômicos em função da utilização de

menores quantidades de enzimas no sistema reacional (WANG et al., 2019). A otimização da concentração de íons metálicos é um parâmetro importante que pode afetar diretamente a atividade catalítica da enzima. Estes íons podem estar envolvidos na catálise enzimática de várias maneiras: podem aceitar ou doar elétrons para ativar eletrófilos e nucleófilos, eles podem reunir enzima e substrato por meio de ligações coordenadas, podem conter grupos reagentes na orientação tridimensional necessária ou eles podem simplesmente estabilizar uma conformação cataliticamente ativa da enzima (PALMER; BONNER, 2007).

Lemes et al. (2019) estudaram o efeito de diversos íons metálicos na atividade da enzima esterase. De acordo com os autores, o efeito inibitório de alguns íons pode limitar aplicação eficaz de enzimas em processos industriais, pois estes podem estar presentes ao longo do processamento ou mesmo nas matérias-primas onde a enzima pode ser usada como catalisador. No estudo de Bibi et al. (2019b), os íons  $K^+$  e  $Mg^{2+}$  destacaram-se como promotores da atividade de xilanases pois causaram um aumento de 205 e 350 %, respectivamente. Os íons metálicos frequentemente associados a um efeito positivo na atividade de xilanases são:  $Ca^{2+}$ ;  $Mn^{2+}$ ;  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  (KUMAR et al., 2017; ZHANG et al., 2012; WU et al., 2018; YAN et al., 2009). De acordo com Kumar et al (2017) a inibição ou estímulo da atividade enzimática pode ser devido à interação de íons metálicos com grupamentos SH ou carboxila, que alteram a conformação da proteína em uma estrutura mais estável.

Kumar et al. (2017) avaliaram o efeito de polióis sobre a estabilidade térmica de xilanases. O estudo mostrou que a presença de sorbitol causou um efeito positivo (aumento de 6 vezes na estabilidade térmica da enzima), em comparação ao ensaio controle. Após 180 min de incubação em presença de sorbitol (70 °C), as xilanases mantiveram cerca de 66 % de sua atividade inicial. Em razão do aumento da estabilidade térmica da xilanase pela presença de sorbitol, os autores sugerem que a enzima seja aplicada no branqueamento da polpa de celulose no processo de fabricação do papel. No entanto, os autores comentam que o efeito estabilizante de ativos não é absoluto para todas as enzimas pois depende da sua natureza, do seu caráter hidrofílico ou hidrofóbico e do grau de interação com o aditivo.

Tendo em vista a importância da caracterização enzimática e como este conhecimento pode impactar no desempenho de processos, torna-se imprescindível a realização de estudos que investiguem a atuação da enzima em diferentes condições e a busca de estratégias para aumentar sua eficiência. Como a produção de XOs por xilanases geralmente ocorre em condições de temperatura elevada e tempo prolongado, o estudo prévio de caracterização da enzima permitirá conhecer condições que favoreçam a atividade e a estabilidade da xilanase ao longo do processo.

### 3.4 XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os XOs são oligômeros formados por resíduos de xilose unidos através de ligações do tipo  $\beta$ -1,4, que são facilmente hidrolisados por ácidos ou enzimas específicas em seus monossacarídeos constituintes. Estes oligômeros podem estar naturalmente presente no mel, frutas e vegetais, mas não em quantidade suficiente para exibir efeito prébiótico (1,4-2,4 g/dia), o que justifica a necessidade de sua produção em escala industrial (AMORIM et al., 2019; FINEGOLD et al., 2014). A produção industrial dos XOs pode ser feita a partir da extração prévia da xilana de materiais lignocelulósicos como sorgo doce (JOSHI; SHARMA; SINGH, 2020), e resíduos agroindustriais como talos de tabaco (AKPINAR et al., 2010) e algodão (AKPINAR et al., 2007), espigas de milho (YANG et al., 2005) e casca de arroz (GUIDO, 2016). Os oligômeros de xilose podem ser encontrados em diferentes formas, dependendo do número de unidades de xilose que compõe sua estrutura química como xilobiose (GP = 2), xilotriose (GP = 3), xilotetraose (GP = 4), xilopentaose (GP = 5) e xilohexose (GP = 6) (KUMAR; SATYANARAYANA, 2011).

Os XOs são considerados oligossacarídeos não digeríveis (OND), pois passam pelo trato gastro intestinal superior sem serem digeridos, atingem o intestino para serem metabolizados pela microflora benéfica ao intestino humano, chamado de efeito prebiótico (CARVALHO et al., 2013; CEZAR et al., 2017). O efeito prebiótico causado pela ingestão de XOs vem sendo avaliado a partir de testes *in vitro* (AMORIM et al., 2020; FINEGOLD et al., 2014; RATNADEWI et al., 2020; THAKURIA, 2020) e *in vivo* (HAFIDAH et al., 2018). Estudos *in vivo* são de alto custo e longos, portanto não são adequados como ferramenta para seleção de prebióticos (AMORIM et al., 2020).

Além do crescimento da microbiota intestinal, a fermentação colônica dos XOs leva à produção de compostos fundamentais para o bom funcionamento do intestino, como os ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e lactato (MOURE et al., 2006). Chapla, Pandit e Shah (2012) demonstraram que a fermentação de XOs *in vitro* causou um aumento notável na massa celular seca (*Bifidobacteria bifidum*, *Bifidobacteria adolescentins* e *Lactobacillus acidophilus*) e redução do pH (possivelmente causado pela produção de ácidos graxos de cadeia curta). Adicionalmente, alguns estudos mostram que os XOs apresentam outras propriedades biológicas, tais como: capacidade antioxidante (VALLS et al., 2018), prevenção do desenvolvimento de diabetes (YANG et al., 2015) e do câncer de cólon (AACHARY et al., 2015).

O GP dos XOs é um fator que afeta o seu potencial prebiótico, pois exerce

influência nos produtos formados pela fermentação. XOs com baixo GP ( $GP < 5$ ) produzem acetato e butirato e tem forte efeito bifidogênico, enquanto que aqueles com GP acima de 5 resultaram na diminuição acentuada de ácidos graxos de cadeia curta. Além disso, XOs com GP entre 2 e 3 apresentam cinética de metabolização mais rápida do que XOs com GP de 4 e 5. Dessa forma, para aplicação em alimentos com alegação prebiótica, XOs com GP entre 2 e 4 são desejáveis (GULLÓN et al., 2011; SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015).

No ano de 2013 os XOS receberam certificação GRAS (generally recognized as safe) pelo FDA (Food and drug administration) para aplicação em alimentos (FDA, 2013). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) negou a inclusão de XOs na lista de ingredientes que são fonte de fibras (com previsão de alegação do seu consumo para auxílio no funcionamento do intestino). A agência explicou que o ingrediente deve passar por avaliação de segurança por meio de petição específica (BRASIL, 2018). Até o presente momento os XOs não foram incluídos na lista de ingredientes com alegação prebiótica. Para Amorim et al. (2019), a aprovação regulamentária regional pode causar uma evolução no mercado de XOs, o que por sua vez depende fortemente de investimentos em pesquisa e desenvolvimento.

Os XOs podem ser utilizados como ingredientes em alimentos (VÁZQUEZ et al., 2000), fármacos (VÁZQUEZ et al., 2005) e em rações animais (KUMAR; SATYANARAYANA, 2011), pois apresentam propriedades organolépticas aceitáveis e elevada estabilidade em ampla faixa de temperatura (até 100 °C) e pH (2,5 a 8,0). As diferentes propriedades e efeitos dos XOs os tornam adequados para aplicações em em diferentes mercados (alimentos, rações animais, cosméticos e saúde) (AMORIM et al., 2019; CARVALHO et al., 2013; CEZAR et al., 2017).

### **3.4.1 Produção de xilo-oligossacarídeos**

Os XOs são produzidos a partir da hidrólise ácida ou enzimática da xilana ou combinação desses processos (CARVALHO et al., 2013). A produção por hidrólise ácida é comumente realizada utilizando ácido sulfúrico diluído (0,1 – 0,5 mol/L) e em condições elevadas de temperatura e pressão, o que resulta em elevada quantidade de xilose produzida pela degradação dos oligossacarídeos em monômeros (CHEN et al., 2018). Além disso, a hidrólise ácida pode formar alguns compostos indesejáveis como furfural e hidroximetilfurfural (QING et al., 2013; XUE et al., 2016). Conforme Carvalho et al. (2013), a formação de compostos indesejáveis torna as etapas de purificação de XOs mais difíceis e caras, além de

diminuir o rendimento dos XOs.

A despolimerização da xilana via hidrólise (ácida ou enzimática) forma primeiramente XOs de elevada massa molar e, à medida que a reação de hidrólise prossegue, são então convertidos em XOs de baixa massa molar e os últimos convertidos em xilose. Por fim, na hidrólise ácida a xilose é então degradada a furfural e outros produtos de degradação não identificados (QING et al., 2013). A produção de XOs por hidrólise enzimática pode ser alcançada pelo uso de enzimas do complexo xilanolítico, que podem ser adicionadas diretamente no meio reacional (CHEN et al., 2009; GUIDO; SILVEIRA; KALIL, 2019) ou produzidas *in situ* por micro-organismos (AMORIM; SILVÉRIO; GONÇALVES, 2019; GAUTÉRIO et al., 2018). De acordo com Brienzo (2010), o uso de endo- $\beta$ -1,4-xilanase na produção de XOs é mais vantajoso que o método químico, devido à especificidade da enzimas e condições amenas de processo havendo pouca geração de produtos indesejáveis e ausência de produtos tóxicos. Na Tabela 2 estão apresentados alguns trabalhos de produção de XOs.

**Tabela 2** – Produção enzimática de xilo-oligossacarídeos.

Fonte de xilanase	Reação enzimática	Rendimento de XOs (%)	Referência
Preparado comercial ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	Xilana de faia (3 %), pH 5,3, 200 U/g, 50 °C, 36 h.	93,5	GUIDO; SILVEIRA; KALIL (2019)
<i>Pichia stipitis</i>	Xilana de faia (1 %), pH 6,0, 50 °C, 2 h	92,2	DING; LI; HU (2018)
<i>Trichoderma</i> sp. K9301	Xilana de espiga de milho(1%), pH 5, 6, 1 U/mg, 50 °C, 3 h	43,3	CHEN et al. (2009)
<i>Bacillus aerophilus</i>	Xilana de espiga de milho (5%), pH 4,0, 200 U/g, 70 °C, 12 h	3,6	GOWDHAMAN; PONNUSAMI (2015)
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	Xilana (4%), pH 7,0, 10 U/g, 28 °C, 96 h	29,6	PATIPONG et al. (2019)
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCT 1261	Xilana de faia (6%), pH 6,0, 260 U/g, 40 °C, 24 h	99,1	GAUTÉRIO (2020)

A xilanase é a principal enzima envolvida na produção de XOs, pois atua na

hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 entre as unidades de xilose produzindo XOs, ao passo que as  $\beta$ -xilosidases convertem os XOs de baixo GP em unidades monoméricas de xilose. Sendo assim, com o intuito de maximizar a produção de XOs e diminuir a produção de xilose, o extrato enzimático utilizado deve apresentar baixa atividade de  $\beta$ -xilosidase para que não ocorra a inibição das endo-xilanases pela produção de xilose (QING et al., 2013; VÁZQUEZ et al., 2002). O extrato de xilanases também pode ser submetido a técnicas prévias de purificação para gerar um extrato livre de  $\beta$ -xilosidases, impedindo a formação de xilose na produção de XOs (CHAPLA, PANDIT; SHAH, 2012).

O rendimento, a produtividade e o tipo de oligossacarídeo produzido por processos enzimáticos são influenciados pelas características da xilanase utilizada, tais como estabilidade e atividade em diferentes valores de pH e temperatura. Deve ser considerado também o tipo e a concentração de substrato, e parâmetros reacionais (temperatura, agitação, tempo de hidrólise) (SAMANTA et al., 2015). A imobilização de enzimas em processos biotecnológicos também pode causar uma melhora no desempenho de reações enzimáticas. Isto por que as técnicas de imobilização fornecem estabilidade às enzimas, principalmente frente à alterações de pH e temperatura (NERI, 2008).

Um aumento no desempenho de uma reação de hidrólise enzimática também pode ser alcançado pelo estudo de diferentes compostos químicos que afetam a estabilidade enzimática. Borba (2019) mostrou que adição de 50 mmol/L de cloreto de cálcio ao extrato de proteases promoveu melhor atuação catalítica da enzima em hidrolisar a proteína do plasma de sangue. Na literatura são encontrados trabalhos que avaliam o efeito de íons metálicos e outros compostos na atividade e estabilidade de extratos de xilanases, porém não foram encontrados estudos que tenham avaliado o impacto desses íons (seja utilizando um extrato de xilanases contendo o íon estabilizante ou pela sua incorporação no meio reacional) no processo de produção de XOs.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

A levedura *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello. O farelo de arroz foi adquirido de uma indústria da Região Sul do Rio Grande do Sul e armazenado a -18 °C.

A xilana de madeira foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos), os padrões de XOs (xilbiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose) foram obtidos da Megazyme (Bray, Irlanda) e o padrão de xilose foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). A coluna cromatográfica utilizada na análise de XOs (Aminex HPX-42A, dimensão 300 mm x 7,8 mm) foi da Bio-Rad Laboratories (Hercules, Estados Unidos). Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparo do farelo de arroz

O preparo do farelo de arroz para utilização como substrato nos cultivos consistiu na sua homogeneização em lote único e secagem em estufa a 50 °C por 24 h. Posteriormente, o farelo de arroz foi submetido ao peneiramento para obtenção de partículas com tamanho menor que 0,5 mm em peneira de Tyler 32 (GAUTÉRIO et al., 2018).

#### 4.2.2 Produção das xilanases pela levedura

##### 4.2.2.1 Preparo do pré-inóculo e inóculo

A cepa da levedura *A. pullulans* CCT 1261 foi mantida a 4 °C em ágar batata-dextrose (PDA) inclinado (WEI et al., 2017). Repiques periódicos a partir da cepa estoque foram realizados e mantidos a 24 °C por 72 h (YEGIN et al., 2017).

O preparo do pré-inóculo consistiu na transferência da massa celular contida na superfície do ágar PDA para tubos contendo 5 mL de meio estéril composto por (g/L): xilose (10), base nitrogenada de levedura (6,7), asparagina (2) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5) em pH 5,0. Os tubos foram incubados a 28 °C (sem agitação) durante 24 h (CHRISTOV et al., 1997).

Para o crescimento do inóculo, o volume do pré-inóculo (5 mL) foi transferido para frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo o mesmo meio estéril (45 mL), os quais foram mantidos

a 28 °C e 150 rpm (agitação orbital) durante 24 h. A esterilização do meio foi realizada em autoclave a 121 °C por 15 min, sendo a xilose esterilizada por filtração em membrana de acetato celulose (Millipore, Burlington, Estados Unidos) com poros de 0,22 µm de diâmetro. O inóculo utilizado nos cultivos teve sua densidade ótica (DO) previamente padronizada em 0,8 (SUGUMARAN et al., 2013) pela sua leitura em espectrofotômetro a 620 nm.

#### 4.2.2.2 Preparo e condições de cultivo

Os cultivos para obtenção de endo-β-1,4-xilanases foram realizados em frascos *Erlenmeyer* aletados de 500 mL contendo meio estéril (147 mL), composto por (g/L): farelo de arroz (61,9), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,6), extrato de levedura (1,5) em pH 7,0 (GAUTÉRIO et al., 2020). A esterilização do meio foi realizada em autoclave a 121 °C por 15 min. Os frascos contendo meio estéril foram inoculados com 2% (v/v) de inóculo com densidade ótica padronizada e foram mantidos a 28 °C, com agitação de 150 rpm por 72 h. Ao final do cultivo o meio líquido foi centrifugado a 4757 × g e 4 °C durante 20 min e posteriormente filtrado para remover partículas em suspensão. O extrato bruto (EB) livre de células e partículas em suspensão foi utilizado para os demais experimentos.

#### 4.2.3 Determinação da atividade de diferentes enzimas no extrato bruto e purificado

O EB e o purificado foram caracterizados em termos de atividade das seguintes enzimas: endo-β-1,4-xilanases, β-xilosidases, β-glicosidases, α-L-arabinofuranosidases e celulasas totais. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com os itens 4.2.7.1 e 4.2.7.2.

#### 4.2.4 Purificação de xilanases

A purificação do EB foi realizada por precipitação com sulfato de amônio (item 4.2.4.1) e com etanol (item 4.2.4.2). A eficiência dos processos de purificação foi avaliada em termos do percentual de recuperação da atividade enzimática (AE<sub>REC</sub>) e do fator de purificação (FP) e foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$AE_{REC} (\%) = \frac{A_s \times V_s}{A_i \times V_i} \times 100 \quad (1)$$

$$FP = \frac{AE_s}{AE_i} \quad (2)$$

Onde  $A_s$  representa a atividade enzimática de endo- $\beta$ -1,4-xilanase (U/mL) na fração de saída,  $A_i$  representa a atividade enzimática de endo- $\beta$ -1,4-xilanases (U/mL) na fração inicial,  $V_s$  representa o volume da fração de saída (mL),  $V_i$  representa o volume da fração inicial (mL),  $AE_s$  representa a atividade enzimática específica de endo- $\beta$ -1,4-xilanase (U/mg<sub>proteína</sub>) na fração de saída e  $AE_i$  é a atividade enzimática específica de endo- $\beta$ -1,4-xilanases (U/mg<sub>proteína</sub>) na fração inicial. A partir da melhor condição de precipitação o extrato enzimático purificado será caracterizado conforme o item 4.2.5.

#### 4.2.4.1 Precipitação de xilanases com sulfato de amônio

O EB foi submetido à precipitação em único estágio por adição de sulfato de amônio  $(NH_4)_2SO_4$  nas concentrações de saturação de 20, 30, 40, 50 e 60 %, de acordo com Scopes (1993). Em béquer contendo 50 mL de EB, o sal foi adicionado de forma gradativa até atingir a concentração de saturação desejada. A adição do sal foi feita sob refrigeração (4 °C) em banho de gelo, com constante agitação magnética. Em seguida, as amostras permaneceram em repouso refrigerado por 2 h (KUMAR et al., 2017). Após este período as amostras foram centrifugadas ( $4757 \times g$ , 30 min, 4 °C) e o precipitado foi ressuscitado em 25 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3. Após, as suspensões foram dialisadas. A diálise foi realizada em sacos de 25 mm  $\times$  16 mm (INLAB, São Paulo), *overnight* a 4 °C contra o tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3. A remoção do sal foi monitorada mediante adição do reagente de Nessler à solução tamponante.

A atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase e a concentração de proteínas solúveis foram determinadas no extrato inicial, na fração precipitada (dialisada) e no sobrenadante. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### Precipitação fracionada de xilanases com sulfato de amônio

O EB (50 mL) foi submetido à precipitação fracionada em dois cortes por  $(NH_4)_2SO_4$  nas concentrações de saturação do sal de 0-20 % no primeiro estágio e de 20-60 % no segundo estágio. Em béquer contendo o EB, o sal foi adicionado de forma gradativa até atingir a concentração de saturação do primeiro corte (20 %), de acordo com Scopes (1994). A

adição do sal foi feita sob refrigeração (4 °C) com constante agitação magnética. Em seguida, as amostras permaneceram em repouso refrigerado por 2 h (KUMAR et al., 2017). Após este período as amostras foram centrifugadas ( $4757 \times g$ , 30 min, 4 °C) e o precipitado descartado. O sobrenadante teve seu volume aferido e então foi tratado novamente com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  até atingir a concentração de saturação do segundo corte (60 %) para o volume medido. Após a adição do sal, foram realizadas etapas de repouso e centrifugação conforme descritas anteriormente. O precipitado obtido após a centrifugação das amostras foi ressuspensionado em 25 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3. Para a remoção do excesso de sal, o precipitado foi dialisado *overnight* a 4 °C contra o mesmo tampão de ressuspensão. A diálise foi realizada em sacos de 25 mm  $\times$  16 mm (INLAB, São Paulo) e monitorada mediante adição do reagente de Nessler à solução tamponante.

A atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase e a concentração de proteínas solúveis foram determinadas no extrato inicial, na fração dialisada e no sobrenadante obtido da segunda centrifugação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.4.2 Precipitação de xilanases com etanol

A precipitação pela adição de etanol ao EB foi estudada nas concentrações de 20, 40, 60 e 80 % (v/v) (CORTEZ; PESSOA JR, 1999; FADEL et al., 2014). O EB (5 mL) foi mantido a 4°C (em banho de gelo e agitação). O etanol resfriado (-22 °C) foi adicionado lentamente com auxílio de pipeta automática (0,1 mL) até atingir o volume correspondente à concentração desejada. Após, a mistura permaneceu em repouso a 4 °C por 15 min e posteriormente foi centrifugada a  $4757 \times g$ , durante 15 min a 2 °C. O precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3 e o sobrenadante descartado. A atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase e a concentração de proteínas solúveis foi determinada no extrato inicial e nas frações precipitadas. A atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase e a concentração de proteínas solúveis não foram determinadas no sobrenadante pois a presença do etanol pode interferir nos resultados. A partir deste ensaio foi possível conhecer o perfil de precipitação da endo- $\beta$ -1,4-xilanase nas diferentes concentrações de etanol estudadas, de forma que se estabeleceu um ponto de corte ideal (concentração de solvente) para purificação da enzima por precipitação fracionada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### Precipitação fracionada de xilanases com etanol

A precipitação pela adição de etanol ao EB foi estudada de forma fracionada, em três cortes, nas concentrações de 0-40 % / 40-60 % / 60-80 % (v/v) (CORTEZ; PESSOA JR, 1999; FADEL et al., 2014). O EB (5 mL) foi mantido em banho de gelo e agitação magnética e o solvente resfriado (-22 °C) foi adicionado gota a gota com auxílio de pipeta automática (0,1 mL) até atingir o volume correspondente à concentração desejada. Após, a mistura permaneceu em repouso a 4 °C por 15 min e centrifugada a  $4757 \times g$  por 15 min a 2 °C. O precipitado obtido foi descartado, o sobrenadante teve seu volume aferido, e então foi submetido a nova de adição de etanol até atingir a concentração desejada. Na última etapa o precipitado obtido foi ressuscitado em 5 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3 e o sobrenadante descartado. A atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase e a concentração de proteínas solúveis foi determinada no extrato inicial e no precipitado obtido no último corte. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.2.5 Caracterização enzimática da xilanase purificada**

A xilanase purificada por precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-20 % / 20-60 %) foi caracterizada em termos de sua temperatura e pH ótimos (item 4.2.5.1), parâmetros cinéticos de reação como  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  (item 4.2.5.1), influência de íons metálicos em sua atividade (itens 4.2.5.3 e 4.2.5.4) e estabilidade térmica e ao pH (item 4.2.5.5).

##### **4.2.5.1 Temperatura e pH ótimos**

A temperatura ótima da xilanase purificada foi estabelecida no pH 5,3 (tampão citrato de sódio 50 mmol/L), medindo a atividade da enzima (item 4.2.7.1) em diferentes temperaturas (35 a 70 °C, com intervalos de 5 °C) (BIBI et al., 2019b). O pH ótimo foi determinado medindo a atividade da enzima em valores de pH na faixa de 3,5 a 7,0 (tampão citrato de sódio 50 mmol/L) e 7,5 a 8,0 (tampão fosfato de sódio 50 mmol/L) a 50 °C (temperatura do método de atividade da xilanase do item 4.2.7.1) por 5 min (PAL; KHANUM, 2011). A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa (%), considerando o ponto de maior atividade como 100%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

##### **4.2.5.2 Determinação dos parâmetros cinéticos**

A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas segue o modelo de Michaelis-Menten (Equação 5). A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) foram calculados a partir de um gráfico duplo-recíproco ( $1/v$  versus  $1/S$ ) de acordo com o método de Lineweaver-Burk (Equação 6), considerando cinética da reação de ordem zero ou de primeira ordem. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando como substrato xilana de faia em diferentes concentrações (6 a 30 mg/mL) a 50 °C e pH 5,3.

$$v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (6)$$

Onde  $v$  representa a velocidade de reação;  $v_{max}$  representa a velocidade máxima de reação;  $K_m$  representa a constante de Michaelis-Menten e  $[S]$  a concentração de substrato.

#### 4.2.5.3 Influência de íons metálicos na atividade de xilanase

Foi avaliada a influência de diferentes íons metálicos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ) na atividade da xilanase nas concentrações de 1, 5, 10 e 15 mmol/L utilizando o extrato enzimático purificado. Os experimentos foram realizados adicionando o íon na solução tampão de diluição da enzima (tampão citrato de sódio) para que quando adicionados (tampão, enzima e íon) ao meio reacional (item 4.2.7.1) atingisse a concentração final desejada neste estudo, conforme proposto por Raj et al. (2018). Após o tempo de reação, a atividade da xilanase foi determinada e comparada ao ensaio controle (sem a presença de íons), o qual foi incubado sob as mesmas condições e teve sua atividade considerada como 100 %. Os íons metálicos utilizados nestes experimentos foram de sais de cloreto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.5.4 Influência do íon $Ca^{2+}$ na atividade de xilanases em diferentes valores de temperatura e pH.

O íon  $Ca^{2+}$  (10 mmol/L) foi utilizado para investigar sua influência na atividade da xilanase sob diferentes valores de temperatura (35 a 70 °C com intervalo de 5 °C, mantendo fixo o pH em 5,3) e em diferentes valores de pH (3,5 a 8,0 mantendo fixa a temperatura em 50 °C). Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 4.2.5.3 e a atividade enzimática

determinada conforme item 4.2.7.1. A atividade da xilanase foi determinada e comparada ao ensaio controle (sem a presença de íons), o qual foi incubado sob as mesmas condições e teve sua atividade considerada como 100 %. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.5.5 Efeito da temperatura e do pH na estabilidade da xilanase

A estabilidade térmica foi estudada pela incubação da enzima nas temperaturas de 45, 50 e 55 °C (GAUTAM; KUMAR; DUTT, 2017) sob diferentes valores de pH (4,5; 5,0 e 5,5). Além disso, foi avaliado o efeito da adição de 10 mmol/L de íon cálcio na estabilidade da xilanase, utilizando a temperatura e pH de maior estabilidade da enzima. Para tal, igual volume de extrato enzimático purificado e solução tampão com o respectivo pH de estudo (NINAWA, KAPOOR; KUHAD, 2008) foram incubados (na temperatura específica de estudo) em frascos âmbar fechados para evitar alterações de volume causados pela evaporação. Alíquotas foram retiradas dos frascos (intervalos de tempo predefinidos), resfriadas em banho de gelo e posteriormente utilizadas para determinar a atividade da xilanase (item 4.2.7.1). Os ensaios foram realizados em triplicata e conduzidos até que a enzima perdesse no mínimo 50 % de sua atividade inicial.

Levando em consideração que em altas temperaturas a cinética de desnaturação é de 1ª ordem, a constante de desnaturação térmica ( $K_d$ ) para cada temperatura foi calculada a partir do coeficiente angular do gráfico  $-\ln(A/A_0)$  versus tempo de incubação (h ou min) (Equação 3), e a meia-vida ( $t_{(1/2)}$ ) foi determinada de acordo com a Equação 4. A meia vida corresponde ao tempo decorrido na qual a enzima perde 50 % de sua atividade inicial.

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -K_d \times t \quad (3)$$

$$t_{(1/2)} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (4)$$

Onde A é a atividade enzimática no tempo t;  $A_0$  é a atividade enzimática inicial;  $A/A_0$  é a atividade relativa;  $K_d$  é a constante de desnaturação; t é o tempo de incubação (h ou min) e  $t_{(1/2)}$  é a meia vida.

#### 4.2.6 Hidrólise enzimática de xilana de faia e produção de xilo-oligossacarídeos

A produção de XOs através da hidrólise da xilana de faia pela xilanase purificada com sulfato de amônio foi realizada em frascos *Erlenmeyer* (capacidade de 125 mL), utilizando

incubadora com controle de temperatura (45 °C) e agitação orbital (180 rpm), pelo período de 24 h. O sistema reacional foi composto por xilana de faia (3 % m/v) em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,5 (mantida *overnight* sob agitação para completa solubilização) e enzima (200 U/g<sub>xilana</sub>), totalizando o volume de 40 mL. Nestas condições também foi avaliada a adição de CaCl<sub>2</sub> (10 mmol/L) ao meio reacional a fim de estimar seu efeito na produção de XOs. Ensaio feito na temperatura de pH de maior estabilidade.

Em todos os ensaios foram coletadas alíquotas (2 mL) em intervalos de tempo predefinidos, e o meio foi aquecido a 100 °C por 5 min para completa inativação da enzima. As alíquotas foram centrifugadas (10.000 × g a 4 °C por 10 min) e submetidas à filtração em membranas de polivinilideno (0,22 µm de poros) para posterior quantificação dos XOs e xilose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As reações de hidrólise foram realizadas em triplicata. A conversão de xilana de faia em XOs foi calculada pela razão entre a massa de XOs (mg) gerada e a massa de inicial de xilana (mg) multiplicado por 100 %.

#### 4.2.7 Determinações analíticas

##### 4.2.7.1 Determinação da atividade de endo-β-1,4-xilanase, β-xilosidase, β-glicosidase e α-L-arabinofuranosidase

A atividade enzimática de endo-β-1,4-xilanasas foi determinada conforme Bailey, Biely e Poutanen (1992). O meio reacional foi composto de 0,1 mL de extrato enzimático (convenientemente diluído em solução tampão) e 0,9 mL de xilana de madeira de faia 1 % (m/v) em solução tampão citrato de sódio (50 mmol/L, pH 5,3), sendo submetido a 50 °C por 5 min. A quantificação dos açúcares redutores liberados a partir da xilana de faia foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), correlacionando com curva padrão de xilose a 540 nm. Uma unidade (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose por minuto, sob as condições descritas de ensaio.

As atividades enzimáticas de β-xilosidase, β-glicosidase e α-L-arabinofuranosidase foram determinadas pela incubação (50 °C, 30 min) de 0,2 mL de extrato enzimático e 0,8 mL de 0,2% (m/v) dos substratos sintéticos p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPX), p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (pNPG) e 0,1% (m/v) de p-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo (pNPAF), respectivamente, preparados em tampão acetato de sódio (50 mmol/L, pH 4,8) conforme descrito por Tan, Mayers e Saddler (1987). As reações foram interrompidas pela adição de 2 mL de carbonato de sódio 10 % (m/v). O p-nitrofenol (pNP) liberado pela ação das respectivas

enzimas foi quantificado a 410 nm, correlacionando com a respectiva curva padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por min, sob as condições de ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.7.2 Determinação da atividade de celulasas totais

A atividade de celulasas totais foi determinada de acordo com Ghose (1987), utilizando papel filtro Whatman® n.1, contendo 95 % de  $\alpha$ -celulose como substrato. Em 50 mg (tiras de 1,0 x 6,0 cm) de papel filtro foi adicionado 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático. A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 60 min. Após, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) em 1 mL de meio reacional. Os açúcares redutores liberados na reação foram quantificados de acordo com Miller (1959), correlacionando com a curva padrão de glicose a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por min, sob as condições de ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.7.3 Concentração de proteína solúvel

A concentração de proteína solúvel foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

#### 4.2.7.4 Determinação do pH

A determinação do valor de pH foi realizada em potenciômetro digital conforme AOAC nº 972.44 (AOAC, 2000).

#### 4.2.7.5 Análise dos hidrolisados por CLAE

Os produtos da hidrólise da xilana foram analisados em cromatógrafo líquido (Prominence, Shimadzu®), equipado com detector de índice de refração (RID-10A) e forno de colunas (CTO-20A). Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram injetadas automaticamente (SIL-20AHT) utilizando como fase móvel água ultrapura (Milli-Q, Milipore) com 0,4 mL/min de taxa de

fluxo em coluna para análise de carboidratos (Aminex HPX-42A, Biorad). A coluna foi operada a 50 °C e o tempo total de corrida foi de 40 min (GUIDO, 2016). A identificação e a quantificação dos XOs e xilose foi feita através dos seus respectivos tempos de retenção e curvas de calibração previamente construídas com o *pool* de padrões (1 a 10 mg/mL). O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution ®.

#### **4.2.8 Análise estatística dos resultados**

Os dados foram submetidos a testes de comparação de médias, desde que tenham atendido os pressupostos de independência, normalidade e homocedasticidade. Foram realizados teste *t* ou análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de *Tukey*, a fim de verificar diferenças significativas entre as condições estudadas, considerando um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PURIFICAÇÃO DE XILANASES POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

A Tabela 3 estão apresenta os resultados obtidos nos ensaios de precipitação em um único estágio com sulfato de amônio nas faixas de saturação do sal de 20, 40 e 60 %. Conforme exposto na Tabela 3, o aumento da concentração de sulfato de amônio causou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na recuperação enzimática e no fator de purificação do precipitado.

**Tabela 3** – Eficiência do processo de purificação da xilanase em diferentes saturações de sulfato de amônio.

Saturação do sal (%)	Fração	Concentração de proteínas (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg <sub>proteína</sub> )	AE <sub>REC</sub> (%)	Fator de Purificação (FP)
20 Ensaio 1	Entrada	2,88 ± 0,04	81,30 ± 1,96	28,20 ± 0,68	100	1
	Precipitado	0,27 ± 0,04	4,75 ± 0,45	17,90 ± 0,72	2,28 <sup>c</sup> ± 0,24	0,63 <sup>b</sup> ± 0,03
	Sobrenadante	2,15 ± 0,08	59,4 ± 2,20	27,80 ± 0,40	74,50 ± 1,04	0,98 ± 0,01
40 Ensaio 2	Entrada	2,71 ± 0,038	73,10 ± 1,75	26,60 ± 0,80	100	1
	Precipitado	0,20 ± 0,01	27,70 ± 4,19	103,90 ± 13,30	17,90 <sup>b</sup> ± 1,05	3,90 <sup>a</sup> ± 1,17
	Sobrenadante	1,50 ± 0,02	33,2 ± 1,12	22,0 ± 1,02	48,70 ± 1,64	0,83 ± 0,04
60 Ensaio 3	Entrada	2,72 ± 0,04	72,80 ± 1,52	26,80 ± 1,02	100	1
	Precipitado	0,84 ± 0,02	78,70 ± 0,97	93,70 ± 3,39	51,07 <sup>a</sup> ± 3,36	3,23 <sup>a</sup> ± 0,04
	Sobrenadante	1,33 ± 0,02	ND	-	-	-

AE<sub>REC</sub> (%): Percentual de recuperação da atividade enzimática; \*ND: não detectado; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tukey.

O Ensaio 1 mostrou que a saturação de 20 % do sal é muito baixa para precipitar as xilanases, resultando em um baixo valor de recuperação enzimática (2,28 %). A atividade recuperada aumentou de 2,28 % (Ensaio 1) para 51,07 % (Ensaio 3) e o fator de purificação passou de 0,63 (Ensaio 1) para 3,23 (Ensaio 3).

Como pode ser observado na Tabela 3 não existe diferença significativa entre o fator de purificação dos Ensaios 2 e 3. Dessa forma, observando simultaneamente os resultados de recuperação enzimática e do fator de purificação, é possível afirmar que o Ensaio 3 apresentou melhor eficiência no processo purificação e recuperação das xilanases.

Ninawe, Kapoor e Kuhad (2008) precipitaram xilanases com 60 % de saturação de sulfato de amônio e recuperaram 58,9 % da atividade da enzima com fator de purificação de 1,48 vezes. No estudo de Luo et al. (2016), foi possível purificar xilanases com recuperação enzimática de 68,17 % e fator de purificação de 3,21 vezes por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 60 % de saturação, estando esses resultados muito próximos aos encontrados neste trabalho com mesma saturação de sal.

De acordo com Łojewska et al. (2016), o objetivo da precipitação de proteínas em uma única etapa é conhecer as concentrações de agente precipitante nas quais as proteínas contaminantes e a molécula alvo possam ser separadas com maior eficiência através do processo realizado em duas ou mais etapas.

Neste sentido, a faixa de concentração de saturação de 0-20 e 20-60 % de sulfato de amônio foram escolhidas para a realização do estudo de purificação de xilanases por precipitação fracionada. A concentração de 20 % de saturação de sal mostrou ser a quantidade de sal mais adequada para o primeiro estágio da precipitação fracionada, pois nesta concentração as xilanases permaneceram principalmente no sobrenadante e outras proteínas precipitaram. Para o segundo estágio da precipitação fracionada, a concentração de 60 % de saturação de sulfato de amônio foi escolhida pois nesta condição as xilanases precipitaram e não houve detecção da atividade da enzima na fração sobrenadante.

Dessa forma, a Tabela 4 apresenta os parâmetros de eficiência referentes à purificação da xilanase por precipitação fracionada com sulfato de amônio nas concentrações de 0-20 / 20-60 % de saturação do sal. O processo de purificação por precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em duas etapas promoveu o aumento em seu grau de pureza na ordem de 10,27 vezes em relação ao extrato bruto, com recuperação de 48,60 % de sua atividade (Tabela 4). Nesse sentido, verifica-se que o processo de purificação dividido em dois estágios favoreceu a obtenção de xilanases mais pura, promovendo um aumento expressivo no seu FP (7 vezes maior) sem diminuição da recuperação de sua atividade, confirmado pelo teste t ( $p > 0,05$ ), quando comparado ao processo de purificação realizado em um único estágio (Ensaio 3, na Tabela 3). Os resultados apresentados na Tabela 4 estão de acordo com Pessoa Jr e Kilikian (2005), que afirmam que a purificação realizada em um único estágio tem alto valor como técnica de concentração, ao passo que a precipitação fracionada tem sido largamente utilizada para a purificação.

**Tabela 4** – Purificação de xilanase por precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-20% / 20-60 %).

<b>Extrato</b>	<b>Atividade enzimática (U/mL)</b>	<b>Concentração de proteínas (mg/mL)</b>	<b>Atividade específica (U/mg<sub>proteína</sub>)</b>	<b>AE<sub>REC</sub>(%)</b>	<b>Fator de purificação (FP)</b>
Inicial	39,78 ± 1,22	2,53 ± 0,04	15,71 ± 0,66	100	1
Purificado	41,13 ± 1,62	0,26 ± 0,02	161,25 ± 10,26	48,60 ± 1,92	10,27 ± 0,65

Média ± desvio padrão (n=3). AE<sub>REC</sub> (%): Percentual de recuperação da atividade enzimática

Seemakram et al. (2020) purificaram xilanases de *Thermomyces dupontii*, utilizando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20-80 %) na primeira etapa de purificação e alcançaram FP de 7,82 e recuperação enzimática (AE<sub>REC</sub>) de 9,97. Chen et al. (2019) purificaram a xilanase produzida por *Aspergillus flavus* utilizando precipitação por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em dois estágios (40-60 %), alcançando FP de 2,7 vezes com AE<sub>RE</sub> de 46,7 %. A purificação de xilanases de *Streptomyces griseorubens* utilizando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em dois estágios (25-55 %) resultou na obtenção da enzima com FP 1,9 vezes e AE<sub>REC</sub> de 57,4 % (Wu et al., 2018). Gautério et al. (2021) purificaram xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 utilizando precipitação fracionada (30-60 %) com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e alcançaram FP e AE<sub>REC</sub> de 6,8 vezes e 69,4 %, respectivamente. No estudo realizado por Ding, Li e Hu, (2018), a purificação de xilanases de *Pichia stipitis* por precipitação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em duas etapas (20-60 %) causou o incremento da pureza da enzima em 11,7 vezes com AE<sub>REC</sub> de 88,2 %, os quais são superiores a maioria dos estudos de purificação de xilanases por precipitação salina encontrados na literatura.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho com os estudos mencionados acima, é possível verificar que a eficiência do processo de purificação de xilanases por precipitação com sulfato de amônio é variável, onde os parâmetros do processo como o FP variaram entre 1,13 e 11,7, e a AE<sub>REC</sub>(%) de 26,80 a 88,20 % (BOONRUNG et al., 2016; DING; LI; HU, 2018). Esta variação pode estar associada às características do extrato enzimático utilizado, tais como: o micro-organismo produtor, tipos de contaminantes, pH do extrato enzimático, bem como a concentração de sal utilizada.

A partir deste estudo foi possível verificar que o processo de purificação de xilanases por precipitação fracionada com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi eficiente, pois foi possível incrementar sua atividade específica em 10 vezes, com percentual de recuperação de sua atividade próxima a 50 %.

## 5.2 PURIFICAÇÃO DE XILANASES POR PRECIPITAÇÃO COM ETANOL

A purificação de proteínas por precipitação com etanol é considerada uma alternativa em relação à precipitação com sais, pois também é uma técnica de purificação de baixo custo e não exige a utilização de equipamentos robustos. Adicionalmente, o tempo de contato do agente precipitante com a proteína é consideravelmente menor e não há a etapa de diálise necessária na precipitação de proteínas por sais. Dessa forma, o estudo da purificação de xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 por precipitação com etanol em um único estágio foi realizado e os parâmetros de eficiência do processo estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Eficiência do processo de purificação da xilanase em diferentes concentrações de etanol (média ± desvio).

% (v/v) etanol	Fração	Concentração de proteínas (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg <sub>proteína</sub> )	AE <sub>REC</sub> (%)	Fator de Purificação (FP)
20	Entrada	2,71 ± 0,04	45,88 ± 2,65	16,93 ± 0,74	100	1
	Precipitado	0,27 ± 0,01	1,06 ± < 0,24	3,88 ± 0,91	2,31 <sup>c</sup> ± 0,53	0,23 <sup>c</sup> ± 0,05
40	Entrada	2,71 ± 0,04	40,58 ± 1,54	14,98 ± 0,52	100	1
	Precipitado	0,38 ± 0,02	0,90 ± 0,10	2,18 ± 0,60	2,21 <sup>c</sup> ± 0,25	0,15 <sup>c</sup> ± 0,04
60	Entrada	2,71 ± 0,04	40,58 ± 1,54	14,98 ± 0,52	100	1
	Precipitado	0,51 ± 0,01	4,45 ± 0,42	8,75 ± 0,90	10,96 <sup>b</sup> ± 1,03	0,58 <sup>b</sup> ± 0,06
80	Entrada	2,71 ± 0,04	40,58 ± 1,54	14,98 ± 0,52	100	1
	Precipitado	0,71 ± 0,01	14,10 ± 0,06	19,82 ± 0,30	34,75 <sup>a</sup> ± 0,16	1,32 <sup>a</sup> ± 0,02

Média ± desvio padrão (n=3)..AE<sub>REC</sub>: Percentual de recuperação da atividade enzimática; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.

Analisando os resultados da Tabela 5, é possível observar que o aumento da concentração de etanol de 20 para 80 % (v/v) promove um aumento significativo (p < 0,05) da atividade de xilanase recuperada (AE<sub>REC</sub>) e do fator de purificação (FP) na fração precipitada. Dessa forma, a concentração de 80 % (v/v) de etanol foi a mais eficiente na purificação da xilanase, pois obteve-se maior AE<sub>REC</sub> (34,75 %) e maior FP (1,32) com aumento da atividade enzimática específica (U/mg<sub>proteína</sub>) de 14,98 para 19,82.

Nos ensaios de precipitação com concentrações de 20, 40 e 60 % (v/v) de etanol constata-se a redução do FP, em relação ao valor inicial deste parâmetro (1,0). Isto ocorre em

função da baixa atividade de xilanase detectada nos precipitados. O estudo de precipitação de xilanases de *A. niger* realizado por Farinas et al. (2011) mostrou que a máxima recuperação da atividade enzimática (cerca de 25 %) ocorre na concentração de 80 % (v/v) de etanol. Já no estudo de purificação de xilanases realizado por Abd El Aty et al. (2018), a concentração de 75 % (v/v) de etanol promoveu recuperação de 41% e FP da ordem de 4,3 vezes. No trabalho de Costa, Farinas e Miranda (2018), após a precipitação com 85 % (v/v) de etanol foi possível recuperar 79 % da atividade de xilanases alcançando FP de 1,03 vezes.

Andrade (2014) realizou a purificação de xilanases de *Cryptococcus flavescens* por precipitação com 75 % (v/v) de etanol e recuperou 35 % da atividade enzimática com FP de 15,54 vezes. No entanto, a autora comenta que comparado à purificação da enzima por ultrafiltração, a precipitação com etanol foi menos eficiente, tendo em vista que o micro-organismo utilizado como fonte de xilanases também produz um heteropolissacarídeo polianiônico extracelular que não foi separado das proteínas por precipitação.

Dessa forma é importante destacar que a levedura *A. pullulans* é um micro-organismo amplamente utilizado para a produção de pululana (LEATHERS, 2003; PRAJAPATI; JANI; KHANDA, 2013) e diversos autores recuperam esse composto do meio de cultivo por precipitação com etanol com concentração em torno de 66 % (v/v) (AN et al., 2017; JIANG; WU; KIM, 2011; MA et al., 2014; ÖZCAN; SARGIN; GÖKSUNGUR, 2014; WANG; YU; GONGYUAN, 2013).

Ao longo dos ensaios de precipitação da xilanase com etanol (20, 40 e 60 % v/v) observou-se grande resistência de solubilização do precipitado na solução tampão, possivelmente devido à precipitação conjunta de pululana, o que dificultou a purificação das xilanases. Em alguns trabalhos, após a pululana ser precipitada com etanol, o polissacarídeo é redissolvido na temperatura de 80 °C, o que justifica a dificuldade de solubilização do precipitado em temperaturas mais baixas. Na recuperação da pululana do meio de cultivo, o líquido é inicialmente aquecido para que as proteínas termo sensíveis presentes no caldo sejam desnaturadas e não precipitem junto com o polímero na etapa de adição do etanol (CHOUDHURY; BHATTACHARYYA; PRASAD, 2012; MA et al., 2014). De acordo com Scopes (1994), os precipitados de solventes orgânicos são, às vezes, espessos e pegajosos, e podem ser bastante difíceis de serem redissolvidos, possivelmente causado pela desnaturação proteica. No entanto, o autor não discute a possibilidade de precipitação de outros componentes presentes no extrato enzimático. Em contrapartida, o precipitado obtido no ensaio com 80% (v/v) de etanol não apresentou resistência de solubilização na solução tampão, o que possivelmente corroborou com o aumento do FP e da  $AE_{REC}$ .

Na literatura, alguns trabalhos mostram que a produção de pululana é influenciada por diversos fatores. Dentre eles, a fonte de nitrogênio (especialmente extrato de levedura e/ou sulfato de amônio) utilizada no meio de cultivo exerce um efeito positivo na produção de pululana (CHOUDHURY; BHATTACHARYYA; PRASAD, 2012; SHIN et al., 1989; SUGUMARAN et al., 2013; YADAV; RAHI; SONI, 2014). Tanto o extrato de levedura como o sulfato de amônio compõem o meio de cultivo utilizado neste trabalho, e suas concentrações foram definidas no estudo de maximização das condições de cultivo para a produção de xilanases (GAUTÉRIO et al., 2020).

Sendo assim, com objetivo de aumentar a eficiência do processo de purificação com etanol, foram realizados dois ensaios de precipitação fracionada. O primeiro teste consistiu em um fracionamento em dois estágios (dados não apresentados) na faixa de concentração de 60 a 80 % (v/v). O segundo, foi realizado em três estágios, com concentrações (% v/v) de 40 – 60 – 80, e os resultados estão apresentados na Tabela 6. A escolha das concentrações utilizadas nos três estágios foi feita com base nos resultados da precipitação em um único estágio (Tabela 5), aliado a observação do aspecto visual do precipitado obtido (Figura 1), e da sua resistência de solubilização na solução tampão, com o intuito de que nos primeiros estágios precipitasse a maior parte do polissacarídeo (precipitado de cor branca), tendo em vista que nas concentrações de 40 e 60 % de etanol (Tabela 5) as atividades enzimáticas recuperadas foram apenas 2,26 e 10,96 %, respectivamente. As Figuras 1a e 1b mostram a diferença dos precipitados obtidos na precipitação com etanol (80 %) e sulfato de amônio (0-20 % / 20-60 %), respectivamente.

Analisando a Tabela 6, é possível verificar que a precipitação fracionada com etanol em três cortes favoreceu o processo de purificação da xilanase, uma vez que foi alcançado FP de 5,54 vezes e  $AE_{REC}$  de 43,01 %. Ambos os parâmetros (FP e  $AE_{REC}$ ) foram superiores ao obtido na precipitação com etanol em um único estágio (1,32 vezes e 34,75 %).

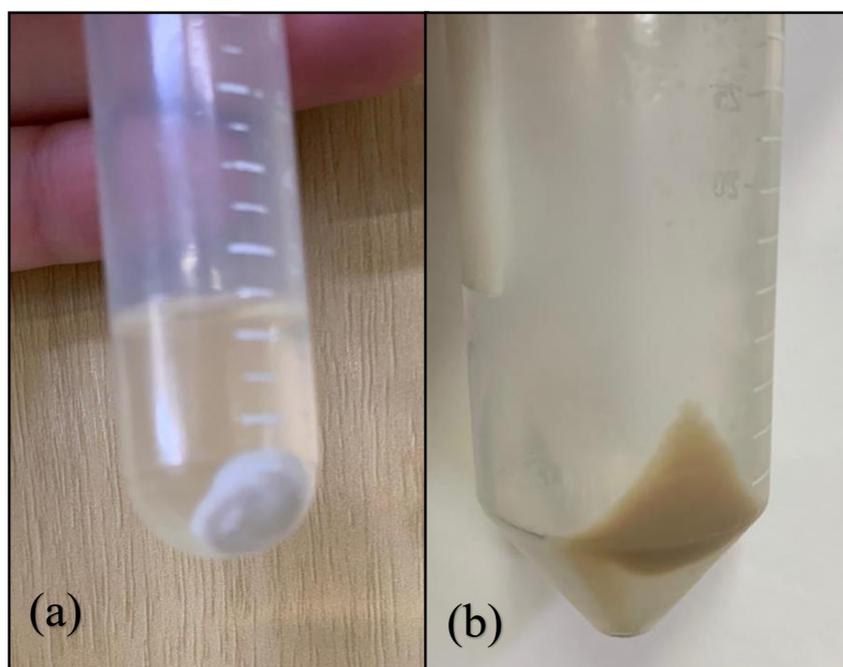
No estudo realizado por Cortez e Pessoa (1999) a precipitação fracionada com etanol em três cortes (20 – 60 – 80 %) propiciou a obtenção da xilanase com FP de 4,4 vezes e  $AE_{REC}$ (%) de 81 %, quando o pH do extrato enzimático foi ajustado para 4,6. Em estudo prévio, os autores mostraram a influência do pH do extrato enzimático na eficiência do processo de purificação, concluindo que a adição de etanol causa uma variação no valor do pH do meio, capaz de afetar o rendimento do processo. Além do pH do extrato enzimático e da concentração de etanol, o tempo de contato do agente precipitante com a enzima e a temperatura do processo podem ser avaliados de forma que se estabeleça uma condição que favoreça a eficiência da purificação (COSTA; FARINAS; MIRANDA, 2018; FARINAS et al., 2011).

**Tabela 6** – Eficiência do processo de purificação de xilanases por precipitação fracionada em três cortes com etanol (0-40 / 40-60 / 60-80 %).

Extrato	Atividade enzimática (U/mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Atividade específica (U/mg <sub>proteína</sub> )	A <sub>REC</sub> (%)	Fator de purificação (FP)
Inicial	51,98 ± 2,33	2,81 ± 0,03	18,48 ± 0,83	100	1
Purificado	22,36 ± 0,39	0,22 ± 0,03	102,25 ± 4,51	43,01 ± 4,42	5,54 ± 0,24

Média ± desvio padrão (n=3). A<sub>REC</sub> (%): Percentual de recuperação da atividade enzimática

**Figura 1** – Precipitados obtidos na precipitação fracionada com (a) etanol (80 %) e (b) sulfato de amônio (0-20 / 20-60 %).



Devido a precipitação conjunta de pululana e da menor eficiência do processo de purificação das xilanases por etanol, a precipitação por sulfato de amônio mostrou-se como melhor opção, considerando o maior FP (10,27), de acordo com teste t ( $p < 0,05$ ) Dessa forma, os ensaios de caracterização da enzima, bem como a produção de XOs, foram realizados utilizando a enzima purificada por precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-20 / 20-60 %).

### 5.3 COMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO E PURIFICADO

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados referentes a atividade enzimática de endo- $\beta$ -1,4-xilanase (xilanase),  $\beta$ -xilosidase,  $\beta$ -glicosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e celulases totais no extrato enzimático bruto e no purificado com sulfato de amônio.

**Tabela 7** – Atividade de diferentes enzimas presentes no extrato bruto e no purificado com sulfato de amônio.

<b>Atividade enzimática (U/mL)</b>		
	<b>Bruto</b>	<b>Purificado</b>
endo- $\beta$ -1,4-xilanase	98,3 $\pm$ 0,85	78,0 $\pm$ 5,4
$\beta$ -xilosidase	0,02 $\pm$ <0,01	0,002 $\pm$ <0,01
$\beta$ -glicosidase	0,06 $\pm$ <0,01	0,045 $\pm$ <0,01
$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	0,16 $\pm$ <0,01	0,043 $\pm$ <0,01
Celulases totais	0,017 $\pm$ <0,01	ND

Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). \*ND: não detectado

Conforme Guido (2016), os preparados enzimáticos comerciais contêm uma mistura de enzimas tais como endo- $\beta$ -1,4-xilanas,  $\beta$ -xilosidas,  $\beta$ -glicosidas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidas e acetil xilana esterases. A presença dessas enzimas pode gerar um hidrolisado com XOs de diferentes GPs. Por isso, ter o conhecimento da presença destas enzimas nos extratos possibilita uma melhor avaliação da sua performance hidrolítica sobre as xilanas com diferentes estruturas, principalmente as xilanas com ramificações.

Analisando a Tabela 7 é possível observar que o extrato enzimático produzido por *A. pullulans* CCT 1261 apresentou elevada atividade (U/mL) de xilanase (98,3) e baixas de  $\beta$ -xilosidase (0,02),  $\beta$ -glicosidase (0,06) e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (0,16). Também é possível verificar que a purificação do extrato enzimático com sulfato de amônio reduziu a atividade de todas as enzimas. No entanto, mesmo com alta atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase (78,0 U/mL) e baixa atividade de  $\beta$ -xilosidase (0,002 U/mL), a utilização do extrato purificado na produção de XOs pode resultar na produção indesejável de xilose visto que a  $\beta$ -xilosidase é considerada uma enzima essencial na conversão da xilobiose e outros XOs em xilose (SHENG et al., 2014).

A Tabela 7 mostra que o extrato enzimático bruto apresentou baixa atividade de celulases totais (0,017 U/mL) e que o processo de purificação resultou em um extrato enzimático livre de celulases, o que torna promissor o uso de ambos os extratos no processo de fabricação de papel e celulose. De acordo com Techapun et al. (2003), as xilanas facilitam a remoção das frações de hemicelulose associadas à lignina com danos mínimos à celulose pela

atividade de celulases. Havendo a necessidade de se obter um extrato enzimático livre de  $\beta$ -xilosidases e/ou celulases, diferentes estratégias (designs) de purificação e separação de proteínas podem ser aplicadas a fim de produzir um extrato enzimático com especificações desejadas e maior grau de pureza.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE XILANASES PURIFICADO

### 5.4.1 Temperatura e pH ótimos

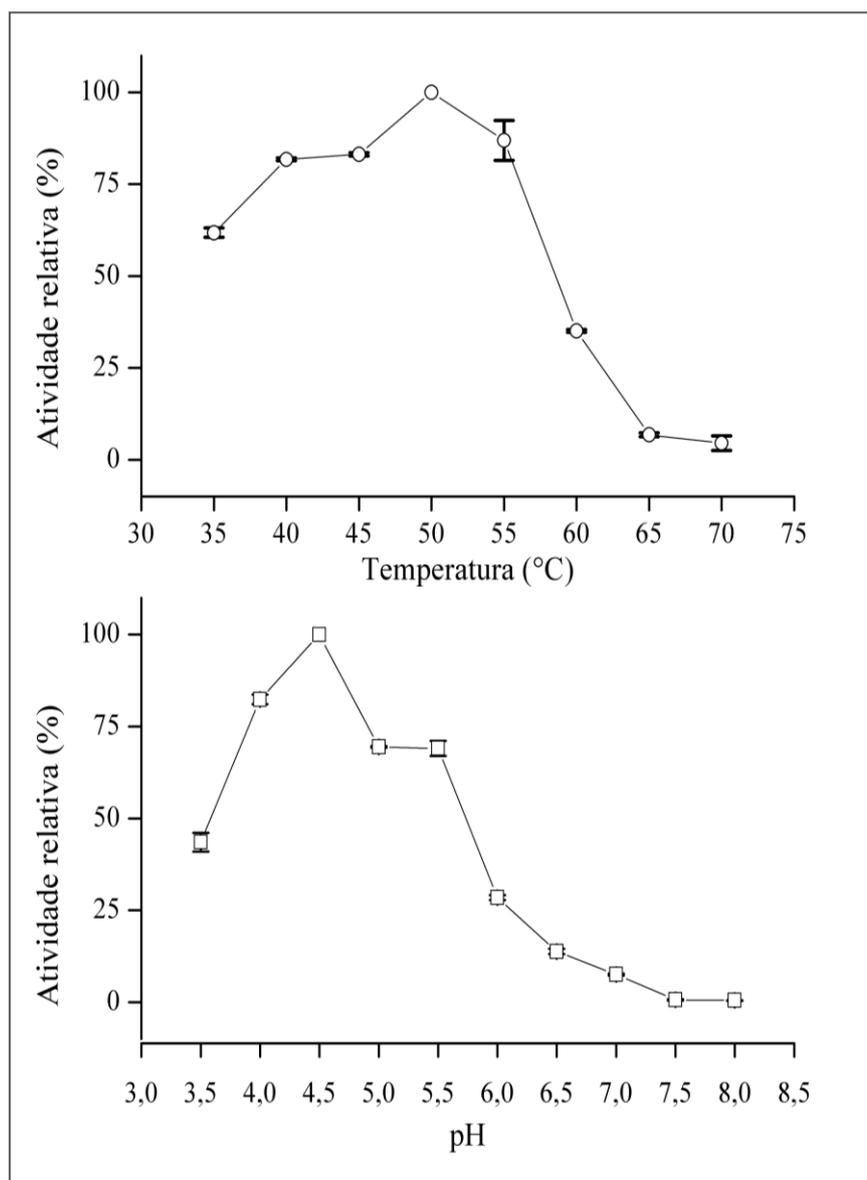
As Figuras 2a e 2b apresentam o efeito da temperatura e do pH na atividade da xilanase purificada. Nas Figuras 2a e 2b é possível verificar que a enzima apresentou atividade ótima a 50 °C e em pH 4,5. A redução da temperatura para 45 °C diminuiu sua atividade em 17 %. No entanto, nota-se que a xilanase foi pouco afetada na faixa de 40-45 °C, pois sua atividade teve uma redução menor do que 2 % neste intervalo. Já na temperatura de 35 °C, a enzima apresentou atividade 40 % menor do que aquela alcançada no ponto de máxima atividade. Acima de 60 °C percebe-se uma queda mais acentuada na capacidade catalítica da enzima, pois sua atividade foi reduzida em mais de 50 % do valor inicial. A atividade da xilanase foi quase completamente perdida, chegando a menos do que 5 % a 70 °C. Fato este devido a maior instabilidade da enzima nessa faixa de temperatura. De acordo com Copeland (2000), a eficiência catalítica de uma enzima pode ser comprometida pelos efeitos de desnaturação de proteínas em altas temperaturas. Por esta razão, a atividade de uma enzima típica aumentará com a temperatura ao longo de uma faixa finita, e em seguida, diminuirá significativamente acima da temperatura crítica que é a característica da desnaturação da proteína.

Em relação ao efeito do pH (Figura 2b), é possível observar que em pH 4,0 a atividade relativa reduziu de 18 %, e uma queda maior do que 50 % em pH 3,5, em relação ao pH de maior atividade. Em pH 5,0 a atividade relativa reduziu em 31 %, mantendo-se estável até o pH 5,5. Já em pH 6,0 a atividade relativa da xilanase foi inferior a 30 %, e a partir do pH 6,5 a atividade relativa atingiu valores inferiores à 25 % da atividade máxima. Atividade relativa inferior à 1 % foi observado em valores de pH acima de 7,0.

De acordo com Palmer e Bonner (2007), como as características das cadeias laterais ionizáveis de aminoácidos dependem do pH, a atividade enzimática varia de acordo com as mudanças de pH. Em casos de pH extremos, a estrutura terciária da proteína pode ser interrompida e a proteína é desnaturada. Mesmo em valores moderados de pH, onde a estrutura terciária não é interrompida, a atividade da enzima pode depender do grau de ionização de

certas cadeias laterais de aminoácidos. Como as enzimas possuem muitos grupos ionizáveis, a mudança do pH pode alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o centro ativo (WISEMAN, 1991 apud ANDRADE, 2014). No caso da xilanase produzida por *A. pullulans* CCT 1261, esta se mostrou mais ativa para valores de pH na faixa entre 4,0 e 5,5.

**Figura 2** – Efeito da temperatura (a) e do pH (b) na atividade da xilanase purificada por precipitação com sulfato de amônio



No estudo de Bankeeree et al. (2014), e Tanaka, Muguruma e Ohta (2006), as xilanases purificadas de *A. pullulans* CBS 135684 e CCT 20524 apresentaram, respectivamente, máxima atividade a 70 °C e pH 6,0. A xilanase purificada de *A. pullulans*

NRRL-Y2311-1 no estudo de Yegin (2017) apresentou temperatura e pH ótimos de 50°C e 4,0, respectivamente, estando mais próximos com o comportamento da xilanase apresentado neste trabalho.

A temperatura ótima de 50 °C também foi verificada para a xilanase purificada de *Aspergillus flavus* (GAUTAM; KUMAR; DUTT, 2017), *Myceliophthora thermophila* (BOONRUNG et al., 2016), *Geobacillus stearothermophilus* (BIBI et al., 2019), *Pichia stipitis* (DING; LI; HU, 2018) e *Cellulosemicrobium sp.* (KAMBLE; JADHAV, 2012). O intervalo de pH de 4,0 a 5,0 também favoreceu a atividade de xilanases de *Rhizopus oryzae* (BAKIR et al., 2001), *Aspergillus flavus* (BHUSHAN et al., 2015), *Trichoderma sp.* (FU et al., 2019), *Aspergillus niger* (PAL; KHANUM, 2011) e *Aspergillus tamaritii* (HEINEN et al., 2018).

#### 5.4.2 Parâmetros cinéticos ( $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ )

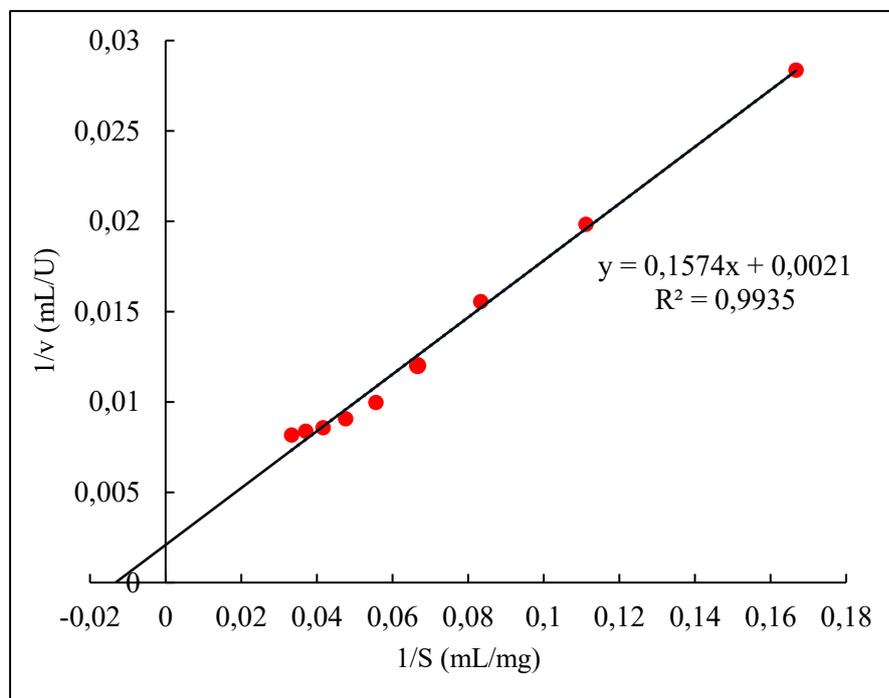
A fim de compreender a afinidade da xilanase purificada por precipitação fracionada com  $(NH_4)_2SO_4$  pela xilana de faia, os parâmetros  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram estimados 50 °C e pH 5,3. A xilanase purificada apresentou comportamento linear ( $R^2 = 0,99$ ) pelo gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (Figura 3).

Os parâmetros  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  calculados para a xilanase purificada foram 74,9 mg/mL e 476 U/mL, respectivamente. De acordo com Kante et al. (2019), o valor de  $K_m$  é definido como a concentração de substrato cuja velocidade para a reação enzimática é a metade da velocidade máxima. Já o  $V_{m\acute{a}x}$  expressa a velocidade limite da reação à medida que a concentração de substrato aumenta.

A purificação da xilanase reduziu em aproximadamente três vezes a afinidade da enzima pelo substrato, em comparação ao menor  $K_m$  (25 mg/mL) estimado para a xilanase bruta de *A. pullulans* CCT 1261 no estudo de Gautério et al. (2021), sob as mesmas condições reacionais. Kante et al. (2019) comentaram que a forma na qual a enzima é estudada (bruta, modificada ou purificada) pode ser um dos fatores que afetam os parâmetros cinéticos de enzimas. Adicionalmente, Andrade (2014) justifica que o aumento do  $K_m$  pode ocorrer devido à perda de algum cofator que estava presente na solução da enzima não purificada.

O  $K_m$  (74,9 mg/mL) para a xilanase purificada neste estudo é superior ao reportado por Bakir et al. (2001), Ninawe, Kapoor e Kuhad (2008) e Yegin (2017), com valores de 18,5 mg/mL, 11,1 mg/mL e 19,4 mg/mL, nesta ordem. No entanto, encontra-se mais próximo do valor de  $K_m$  (43 mg/mL) estabelecido no estudo de Luo et al. (2016).

**Figura 3** – Gráfico de Lineweaver-Burk para a xilanase purificada com sulfato de amônio.



#### 5.4.3 Influência de íons metálicos na atividade de xilanasas utilizando o extrato purificado

Íons metálicos são moléculas regulatórias comuns que estão presentes no ambiente de uma enzima e podem aumentar ou diminuir sua atividade. Neste sentido, a influência de diferentes concentrações de KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub> foi avaliada na atividade da xilanase purificada e comparados ao controle (sem adição dos sais). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

De acordo com a Tabela 8 a atividade da xilanase teve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na presença de CaCl<sub>2</sub> (1 – 15 mmol/L), ZnCl<sub>2</sub> (5 – 15 mmol/L), CuCl<sub>2</sub> (1 mmol/L) e FeCl<sub>3</sub> (1 – 15 mmol/L) e teve sua atividade inibida por KCl (1 – 15 mmol/L), NaCl (1 – 15 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> (1 – 15 mmol/L) e CuCl<sub>2</sub> (5 – 15 mmol/L).

É possível verificar que a xilanase sofreu uma redução mais acentuada na sua atividade em presença de Mg<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> (acima de 10 mmol/L), visto que a enzima apresentou uma redução superior a 50% em relação ao ensaio controle nestas concentrações. Um efeito inibitório na atividade de xilanasas de *Aspergillus orizae* por Mg<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> também foi observado no estudo de Bhardwaj et al. (2019).

**Tabela 8** – Influência de diferentes íons metálicos na atividade de xilanase purificada com sulfato de amônio de *A. pullulans* CCT 1261.

Íon	Atividade relativa (%)			
	1 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L	15 mmol/L
Controle*	100	100	100	100
K <sup>+</sup>	94 <sup>aC</sup> ± 1,4	95 <sup>aC</sup> ± 3,5	93 <sup>aC</sup> ± 1,9	91 <sup>aC</sup> ± 3,2
Na <sup>+</sup>	87 <sup>cD</sup> ± 2,4	91 <sup>bcC</sup> ± 1,6	93 <sup>abC</sup> ± 1,6	96 <sup>aC</sup> ± 0,8
Ca <sup>2+</sup>	108 <sup>cA</sup> ± 2,2	123 <sup>bA</sup> ± 2,0	144 <sup>aA</sup> ± 3,1	139 <sup>aA</sup> ± 0,4
Zn <sup>2+</sup>	100 <sup>cBC</sup> ± 2,3	118 <sup>bA</sup> ± 3,7	127 <sup>abB</sup> ± 2,8	124 <sup>aB</sup> ± 1,6
Mg <sup>2+</sup>	72 <sup>aE</sup> ± 4,1	51 <sup>bE</sup> ± 4,7	46 <sup>bD</sup> ± 4,1	47 <sup>bD</sup> ± 0,8
Cu <sup>2+</sup>	105 <sup>aAB</sup> ± 1,9	76 <sup>bD</sup> ± 2,2	18 <sup>cE</sup> ± 0,4	0 <sup>dE</sup> ± 0
Fe <sup>3+</sup>	103 <sup>cAB</sup> ± 1,1	106 <sup>cB</sup> ± 1,6	126 <sup>bB</sup> ± 2,1	135 <sup>aA</sup> ± 2,4

Média ± desvio padrão (n=3) \*Sem adição de sais. Letras minúsculas diferentes na mesma linha ou maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo Teste Tukey (p<0,05)

O efeito inibitório de íons Cu<sup>2+</sup> sobre a atividade de xilanases microbianas é amplamente mencionado na literatura. Com relação a xilanases de *A. pullulans* o efeito inibitório do íon Cu<sup>2+</sup> (10 mmol/L) foi verificado por Bankeeree et al. (2014) e Vadi, Strohfus e West (1996), com inibição de sua atividade para 30 % e 92 %, respectivamente. A caracterização das xilanases de *Aspergillus flavus* (CHEN et al., 2019; GAUTAM; KUMAR; DUTT, 2017), *Aspergillus oryzae* (BHARDWAJ et al., 2019), *Penicillium sclerotiorum* (KNOB; CARMONA, 2010), *Bacillus licheniformis* (RAJ et al., 2018) e *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 (ZHANG et al., 2012) também mostrou o efeito inibitório do íon Cu<sup>2+</sup> na atividade da enzima. De acordo com Mizrahi e Achituv (1989), o íon Cu<sup>2+</sup> se liga aos grupos sulfidríla (-SH) de proteínas, o que leva a desestabilização da estrutura proteica e reduz a atividade enzimática.

Com relação ao aumento da atividade enzimática, observa-se que o íon Ca<sup>2+</sup> na concentração de 10 mmol/L aumentou em 44 % a atividade da xilanase. Este aumento foi estatisticamente superior ao observado pelos íons Zn<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> na mesma concentração. Observa-se que os íons Ca<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> causaram um aumento crescente na atividade da xilanase até a concentração de 10 mmol/L. Acima desta concentração, a xilanase não apresentou incremento significativo em sua atividade. O aumento da atividade da xilanase na presença de Ca<sup>2+</sup> foi relatado para outras xilanases microbianas (BANKEEREE et al., 2014; GAUTAM; KUMAR; DUTT, 2017; KNOB; CARMONA, 2010; LIU et al., 2018; LUO et al., 2016). De

acordo com Gautam, Kumar e Dutt (2017) o efeito estimulante do  $\text{Ca}^{2+}$  na atividade da xilanase indica seu possível papel como cofator de íon-metálico na reação enzima-substrato. Lemes et al. (2019) comentam que alguns íons também são capazes estabilizar a conformação ativa de enzimas e protegê-las contra a desnaturação térmica.

O efeito positivo do  $\text{Fe}^{3+}$  na atividade da xilanase também é relatado por Chen et al. (2019). Porém, os autores comentam que a maioria das xilanases de *Aspergillus sp.* tiveram sua atividade inibida na presença deste íon, possivelmente devido a sua capacidade de interagir com os aminoácidos no sítio catalítico da xilanase. Com base no exposto, é possível concluir que a sensibilidade da xilanase a cátions é variável. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mmol/L) se destacou em relação aos demais, conduzindo ao maior incremento da atividade de xilanase.

Tendo em vista que o efeito positivo do  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mmol/L) foi avaliado apenas na condição padrão do método de atividade da xilanase (50 °C e pH 5,3), um novo estudo foi realizado a fim de verificar seu efeito na atividade da xilanase na faixa de pH de 3,5 – 8,0 (fixando a temperatura em 50 °C) e no intervalo de temperatura entre 35 a 70 °C (mantendo o pH fixo em 5,3). As Figuras 4a e 4b mostram o comportamento da atividade da xilanase em diferentes valores de pH e temperatura, respectivamente, na presença e ausência do íon  $\text{Ca}^{2+}$ .

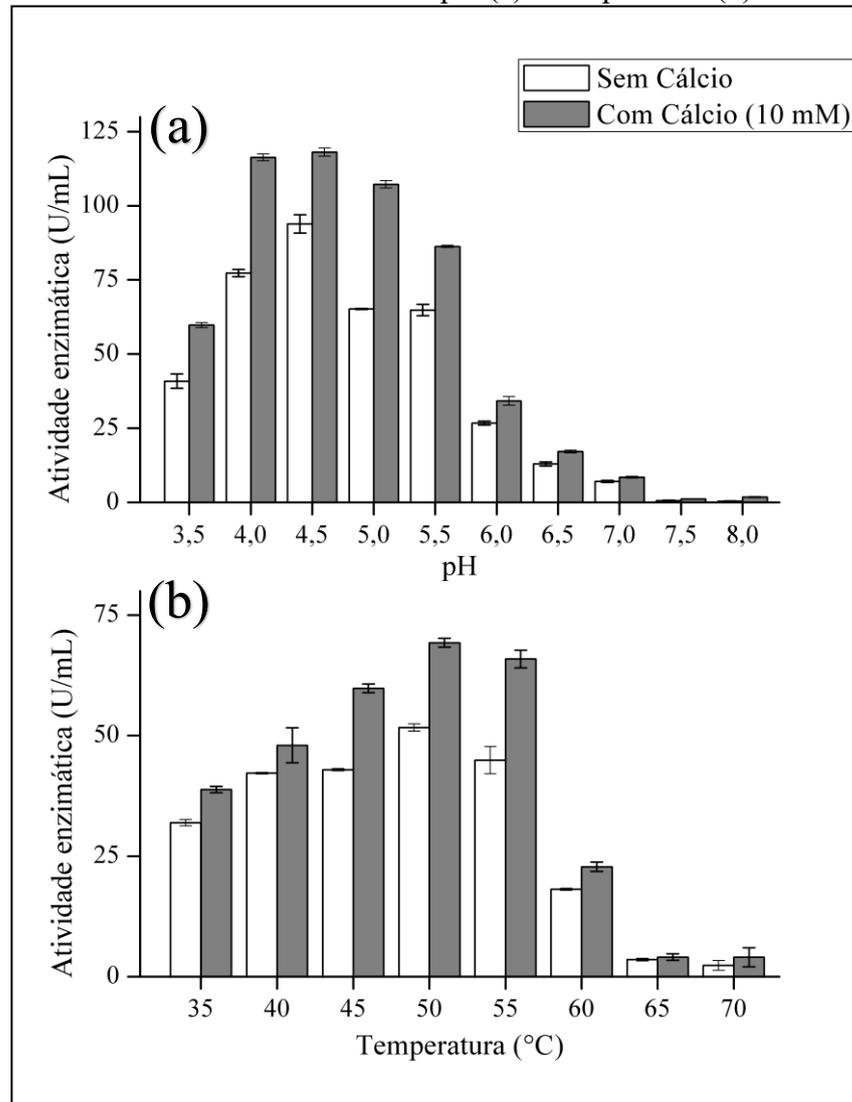
Analisando a Figura 4a é possível verificar um efeito positivo do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na atividade enzimática para todos os valores de pH estudados. No entanto, o aumento da atividade da xilanase em presença de  $\text{Ca}^{2+}$  foi mais expressivo em pH 4,0, 5,0 e 5,5, respectivamente. No pH 4,5 o efeito do íon  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a atividade enzimática foi mais brando (25 %), provavelmente pelo fato deste ter sido o pH de máxima atividade para a enzima.

Em pH 5,0 e 5,5 em presença do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , a atividade da xilanase aumentou de 65,0 U/mL para 107 U/mL (64%) e de 64,8 U/mL para 86,3 U/mL (33 %), respectivamente. O aumento de 64 % na atividade da xilanase em pH 5,0 é maior do que o observado no ensaio realizado em pH 5,3 (aumento de 44 %). Embora o aumento da atividade da xilanase tenha sido de 25% em pH 4,5, neste ponto a atividade da xilanase alcançou 118 U/mL, sendo considerado o maior valor de atividade registrado em presença do íon  $\text{Ca}^{2+}$ .

Com relação ao efeito da temperatura (Figura 4b) nota-se um aumento da atividade da xilanase em todas as temperaturas avaliadas em presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . É possível verificar que a 45 e 55 °C a atividade da xilanase aumentou de modo mais expressivo do que na temperatura ótima (50 °C), semelhante ao constatado na Figura 4a. Porém, percebe-se que a atividade da xilanase teve aumento com maior intensidade na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  em função de mudanças de pH do que pela variação da temperatura. Por exemplo, a Figura 4a mostra que na faixa de pH de 4,0 a 5,5 a atividade da xilanase foi consideravelmente maior do que a obtida na faixa de

temperatura de 40 a 55 °C. Comparativamente, na temperatura de 50 °C em pH 5,3 a atividade da xilanase foi 69,3 U/mL, ao passo que nesta mesma temperatura, mas em pH 4,5, a atividade enzimática registrada foi 118 U/mL.

**Figura 4** – Efeito do íon cálcio na atividade de xilanase purificada com sulfato de amônio em diferentes valores de pH (a) e temperatura (b).



#### 5.4.4 Determinação da estabilidade térmica e em relação ao pH de xilanases

A estabilização de enzimas, especialmente durante os processos térmicos, é uma preocupação importante na biotecnologia. A estabilidade térmica da xilanase purificada foi estudada através da determinação da meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima. Para isso, a enzima foi incubada

em tampão citrato de sódio 50 mmol/L em diferentes valores de pH (4,5, 5,0 e 5,5) e temperatura (45, 50 e 55 °C). A escolha da faixa de temperatura e pH foi feita com base nos resultados de caracterização da enzima descritos no item 5.4.1.

O procedimento foi realizado igualmente para todas as temperaturas e valores de pH avaliados, permitindo a determinação dos valores de  $K_d$  e  $t_{1/2}$ . As curvas de  $-\ln(A/A_0)$  versus tempo de incubação foram lineares na faixa de temperatura estudada ( $R^2 \geq 0,98$ ), indicando que nesta faixa de temperatura a inativação térmica pode ser expressa como cinética de primeira ordem. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados para o  $K_d$ ,  $t_{1/2}$  e  $R^2$  obtidos em cada ensaio.

Em todas as condições de temperatura e pH avaliados, os valores de  $K_d$  foram inversamente proporcionais a  $t_{1/2}$ , indicando que a enzima é sensível ao aumento da temperatura, conforme resultados apresentados na Tabela 9. Além disso, é possível verificar que o valor de pH contribui significativamente para a estabilidade térmica da enzima. Em todas as temperaturas estudadas foi observado que em pH 4,5 a xilanase foi mais estável. A xilanase purificada apresentou maior estabilidade térmica a 45 °C e pH 4,5, com  $t_{1/2}$  de 169 h (7 dias).

A partir da elevada estabilidade térmica da xilanase à 45 °C em pH 4,5, esta condição foi selecionada para verificar se a inclusão de íons  $Ca^{2+}$  (10 mmol/L) no extrato enzimático influenciaria a termo estabilidade da enzima. Na Tabela 9 é possível observar que o íon  $Ca^{2+}$  influenciou positivamente a estabilidade da enzima, pois a enzima apresentou  $t_{1/2}$  de 231 h (aproximadamente 9,6 dias). A presença de  $Ca^{2+}$  promoveu o aumento de 62 h na  $t_{1/2}$  da xilanase, em comparação ao ensaio sem o íon, indicando que o  $Ca^{2+}$  é capaz de proteger a enzima dos efeitos da desnaturação térmica. O estudo de Spurway et al. (1997) mostrou que o  $Ca^{2+}$  é capaz de estabilizar a xilanase contra a desnaturação térmica e protege-la da ação de proteases.

A xilanase purificada de *A. pullulans* CCT 1261 se mostrou menos estável a 50 e 55 °C do que a xilanase bruta de *Paenebacillus barengolzi* (LIU et al., 2018), que apresentou nestas temperaturas  $t_{1/2}$  de 8,4 h e 5,1 h, respectivamente. A xilanase purificada de *A. pullulans* CBS 135684 (BANKEEREE et al., 2014) apresentou maior estabilidade térmica a 50 °C ( $t_{1/2} = 231$  min) e 55 °C ( $t_{1/2} = 173$  min) em comparação ao obtido neste estudo. Em contrapartida, a meia vida da xilanase a 50 °C (independente do pH) foi maior do que a encontrada para a xilanase purificada de *Trichoderma inhamatum* ( $t_{1/2} = 4$  min) (SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015). A 45 °C, a meia vida mais baixa para a xilanase foi estimada em pH 5,5 ( $t_{1/2} = 59,2$  h), a qual é maior do que a meia vida determinada para a xilanase purificada de *Aspergillus niger* ( $t_{1/2} = 7,7$  h) nesta temperatura (PAL; KHANUM, 2011).

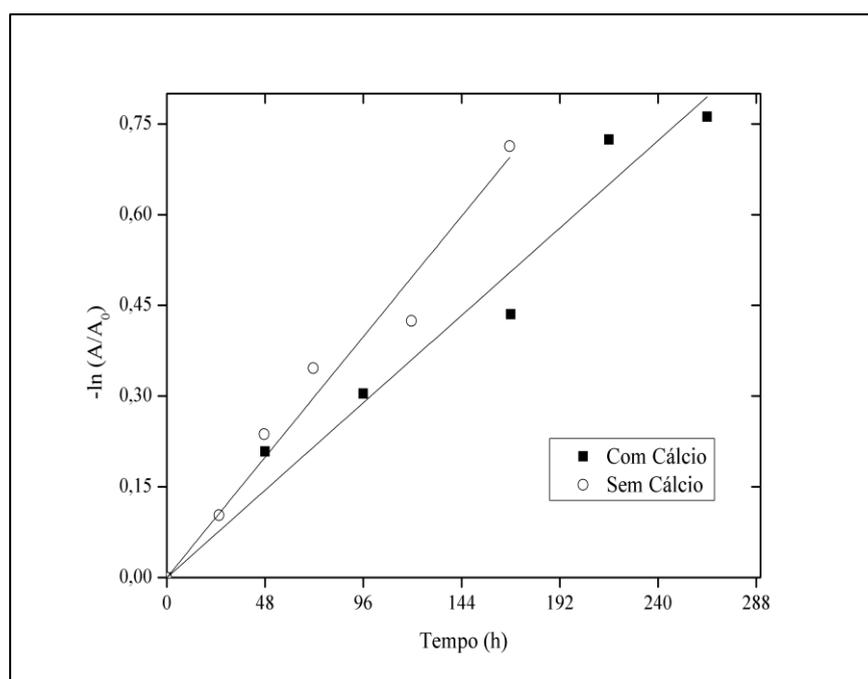
**Tabela 9** – Valores de  $K_d$  e meia vida ( $t_{1/2}$ ) da desnaturação térmica da xilanase purificada com sulfato de amônio.

Temperatura (°C)	pH	$K_d$	$t_{1/2}$	$R^2$
45	4,5	0,0041 h <sup>-1</sup>	169,0 h	0,9891
	5,0	0,0052 h <sup>-1</sup>	133,3 h	0,9852
	5,5	0,0117 h <sup>-1</sup>	59,2 h	0,9927
	4,5*	0,003 h <sup>-1</sup>	231,0 h	0,9889
50	4,5	0,0063 min <sup>-1</sup>	110 min	0,9927
	5,0	0,007 min <sup>-1</sup>	99,0 min	0,9855
	5,5	0,0172 min <sup>-1</sup>	40,3 min	0,9979
55	4,5	0,0951 min <sup>-1</sup>	7,30 min	0,9933
	5,0	0,1278 min <sup>-1</sup>	5,42 min	0,9837
	5,5	0,1766 min <sup>-1</sup>	3,92 min	0,9901

\*Ensaio realizado com adição de 10 mmol/L de Ca<sup>2+</sup> ao extrato enzimático

A Figura 5 apresenta a curva linearizada da cinética de desnaturação térmica da xilanase purificada a 45 °C em pH 4,5.

**Figura 5** – Linearização da cinética de desnaturação térmica da xilanase purificada com sulfato de amônio à 45 °C e pH 4,5.  $A_0$  é a atividade enzimática antes da incubação ( $t = 0$ ) e  $A$  é a atividade enzimática após a incubação.



Devido a uma maior estabilidade da xilanase em pH 4,5 e temperatura de 45 °C, esta pode ser uma característica positiva quanto à sua aplicabilidade em processos industriais como na clarificação de sucos (KALLEL et al., 2016) e na indústria de ração animal (pois a enzima deve ser altamente ativa em temperaturas na faixa de 40 °C e ao pH de 4,8 do trato digestivo (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). A elevada estabilidade térmica da xilanase a 45 °C em pH 4,5 pode ser uma característica promissora na produção enzimática de XOs, visto que esse processo é geralmente realizado em temperatura na faixa de 40 a 50 °C por elevado tempo (AKPINAR et al., 2010; LIU et al., 2018).

## 5.5 PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

As Tabelas 10 e 11 apresentam a produção de xilose e XOs e o percentual de conversão de xilana em XOs obtidos nas reações de hidrólise realizados no meio reacional a 45 °C e pH 4,5, sem e com  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mmol/L). A produção de XOs foi realizada utilizando o extrato de xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 purificado com sulfato de amônio.

Analisando as Tabelas 10 e 11 é possível perceber que em ambos os ensaios a xilanase foi capaz de hidrolisar a xilana de faia e produzir XOs com GP entre 2 e 4. A produção de  $X_4$  foi observada em até 2 h de processo. Após esse tempo, os principais produtos da reação foram xilobiose ( $X_2$ ), xilotriose ( $X_3$ ) e xilose ( $X_1$ ).

Na Tabela 10 é possível verificar que o maior teor de XOs (6,7 mg/mL) e maior conversão de xilana em substrato (22,3 %) foram observados em 2 h de reação, os quais não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) dos resultados obtidos em 24 h. Embora a concentração de XOs totais (mg/mL) entre 2 e 24 h não tenha apresentado diferença significativa, nota-se a diminuição do percentual de XOs no hidrolisado de 84,5 % (2 h) para 64,2 % (24 h), resultado da produção de  $X_1$ .

Com base nestes resultados, é possível concluir que ao utilizar as condições de maior estabilidade da xilanase (45 °C, pH 4,5), o tempo de hidrólise não deve ser superior a 2 h, visto que em 6 h de reação a atividade da xilanase sobre a xilana pode estar reduzida e/ou os XOs estarem sendo hidrolisados. Como consequência, a concentração de XOs totais no meio reacional diminui e ocorre o aumento da concentração de xilose.

**Tabela 10** – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir da xilana de faia utilizando xilanase purificada.

Tempo (h)	Perfil de carboidratos (%)					XOs totais (mg/mL)	Conversão de xilana em XOs (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	XOs totais		
2	15,5	43,4	29,3	11,7	84,5	6,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	22,3 ± 0,67 <sup>a</sup>
6	22,5	57,1	20,4	-	77,5	4,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	16,3 ± 0,80 <sup>b</sup>
8	23,4	56,8	19,8	-	76,6	5,4 ± 0,37 <sup>b</sup>	17,8 ± 1,24 <sup>b</sup>
24	35,8	47,2	16,9	-	64,2	6,6 ± 0,05 <sup>a</sup>	22,0 ± 0,15 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p>0,05). Legenda: X<sub>1</sub> – xilose; X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose; X<sub>4</sub> – xilotetraose

**Tabela 11** – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir da xilana de faia utilizando xilanase purificada em presença de íons Ca<sup>2+</sup>.

Tempo (h)	Perfil de carboidratos (%)					XOs totais (mg/mL)	Conversão de xilana em XOs (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	XOs totais		
2	14,0	52,4	28,8	4,8	86,0	4,4 ± 0,21 <sup>d</sup>	14,7 ± 0,68 <sup>d</sup>
6	22,5	57,1	20,4	-	77,5	5,0 ± 0,05 <sup>c</sup>	16,6 ± 0,15 <sup>c</sup>
8	24,1	56,8	19,1	-	75,9	5,3 ± 0,05 <sup>b</sup>	17,7 ± 0,15 <sup>b</sup>
24	28,2	56,6	15,2	-	71,8	6,6 ± 0,09 <sup>a</sup>	21,9 ± 0,32 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p>0,05). Legenda: X<sub>1</sub> – xilose; X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose; X<sub>4</sub> – xilotetraose

No decorrer da ação enzimática sobre a xilana, nem todas as ligações entre unidades de xilose estão acessíveis para uma única enzima. Esta acessibilidade é alterada no decorrer da reação e a presença de outras enzimas (cada uma com uma função específica) torna a hidrólise mais eficiente (JUTURU; WU, 2012). No estudo de Yan et al. (2008) foi observado que a adição de β-xilosidase purificada ao meio reacional contendo apenas xilanase promoveu o aumento da hidrólise da xilana de faia e do conteúdo de xilose liberada. Em contrapartida, foi verificado que na ausência de β-xilosidase ocorre o acúmulo dos XOs produzidos, indicando que a degradação da xilana em xilose ocorre devido à ação sinérgica dessas enzimas. Embora a produção de XOs tenha sido realizada mediante uso da xilanase purificada, a atividade remanescente de β-xilosidase no extrato purificado deve ser considerada (Tabela 7), tendo em vista o conteúdo relevante de xilose no hidrolisado em 24 h (35,8 %).

Analisando a Tabela 11 é possível verificar que o conteúdo de XOs totais (mg/mL) e o percentual de conversão de xilana em XOs aumentam ao longo do tempo de reação, alcançando valor máximo em 24 h de reação. Ambos os parâmetros são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos valores obtidos nos demais tempos de hidrólise.

A Tabela 11 também mostra que a presença de 10 mmol/L de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio reacional (24 h) não contribuiu para o aumento do teor de XOs totais (mg/mL) e do percentual de conversão de xilana em XOs (%), em comparação ao ensaio sem a adição do íon  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabela 10), confirmado pelo teste t. No entanto, em presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , o perfil de carboidratos do hidrolisado obtido em 24 h apresentou maior concentração de  $X_2$  (5,18 mg/mL) e menor concentração de  $X_1$  (2,59 mg/mL) e  $X_3$  (1,39 mg/mL), quando comparados aos teores de  $X_2$  (4,86 mg/mL),  $X_1$  (3,69 mg/mL) e  $X_3$  (1,74 mg/mL) obtidos no ensaio controle (sem o íon  $\text{Ca}^{2+}$ ). Uma maior concentração de  $X_2$  é desejável para hidrolisados potencialmente prebióticos. (AMORIM et al., 2019). Devido à maior concentração de  $X_2$  e menor de  $X_1$ , é possível que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  tenham dificultado a ação da  $\beta$ -xilosidase sobre  $X_2$ , o que contribuiu para a obtenção de um hidrolisado com menos xilose.

O percentual de conversão de xilana de faia em XOs (22,3 %) obtido em 2 h de hidrólise, foi próximo ao rendimento alcançado em alguns trabalhos nos quais o tempo de reação é superior. Por exemplo, no estudo de Patipong et al. (2019), a xilanase bruta de *Aureobasidium melanogenum* alcançou máxima conversão de xilana em XOs (29,5 %) em 96 h de reação. No estudo de Guido (2016) a utilização de um preparado comercial de enzimas xilanolíticas para a produção de XOs a partir da xilana de faia resultou em rendimento de 27 % e concentração de XOs totais de 8,34 mg/mL em 12 h de reação enzimática. O baixo valor de  $K_m$  (15 mg/mL) do extrato comercial pode ter favorecido a hidrólise da xilana, visto a maior concentração de XOs no hidrolisado, em comparação a este trabalho. No estudo de Gautério (2020) a xilanase bruta de *A. pullulans* CCT 1261 foi capaz de converter a xilana de faia em XOs em 25,7 % produzindo 7,7 mg/mL de XOs totais e 13,9 % de xilose em 24 h de reação enzimática. Neste mesmo estudo foi verificado que o pH, concentração de substrato e carga enzimática são os principais parâmetros que afetam a produção de XOs. Dessa forma, a concentração de xilana e a carga enzimática poderiam ser avaliadas no intuito de reduzir o conteúdo de xilose e aumentar a concentração de XOs do hidrolisado em 2 h de reação enzimática, visto que na condição maximizada no estudo de Gautério (2020) a conversão de xilana em XOs foi de 17,8 % em 24 h de reação.

Com base nos resultados obtidos neste estudo é possível verificar que a produção de XOs utilizando a xilanase purificada de *A. pullulans* se mostrou promissora. Nas condições

estudadas, um menor tempo de reação (2 h) mostrou ser mais adequado para a produção de XOs, visto que não houve aumento da concentração de XOs nem do rendimento do processo, com o passar do tempo. Adicionalmente, foi verificado que a presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no meio reacional não afetou a conversão de xilana em XOs nem a concentração de XOs em 24 h, no entanto o percentual de xilose no hidrolisado foi atenuado na presença deste íon, gerando um hidrolisado com potencial prebiótico, devido ao maior conteúdo de xilobiose.

## 6 CONCLUSÃO

A xilanase produzida pela levedura *A. pullulans* CCT 1261 foi purificada, caracterizada e utilizada na hidrólise enzimática da xilana de faia para a produção de XOs. A precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-20 /20-60 %) foi mais eficiente que a purificação por precipitação direta com o sal e que a precipitação com etanol em três cortes (40-60-80 %). A precipitação salina permitiu purificar a xilanase com fator de purificação de 10,27 vezes e recuperação da atividade enzimática de 48,6 %. A precipitação fracionada com etanol em três cortes (40-60-80 %) resultou na obtenção da enzima com fator de purificação de 5,54 vezes e recuperação da atividade enzimática de 43 %. A adição de etanol ao extrato enzimático resultou na precipitação simultânea da xilanase e de outros contaminantes, possivelmente o polissacarídeo pululana, o que provavelmente dificultou a obtenção da xilanase com maior pureza.

A xilanase purificada por precipitação com sulfato de amônio apresentou temperatura e pH ótimos de 50 °C e 4,5, respectivamente. A presença de sais como CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub> incrementaram a atividade da xilanase. O íon Ca<sup>2+</sup> (10 mmol/L) destacou-se em relação aos demais, pois aumentou a atividade da enzima em 44 %. O K<sub>m</sub> da xilanase purificada para o substrato xilana de faia foi de 74,9 mg/mL.

A maior estabilidade da xilanase purificada com sulfato de amônio foi observada a 45 °C e pH 4,5, apresentando t<sub>1/2</sub> igual 169 h. Nestas condições, a adição de 10 mmol/L de Ca<sup>2+</sup> ao extrato enzimático resultou em maior estabilidade térmica, pois a enzima apresentou t<sub>1/2</sub> igual 231 h. Neste sentido verificou-se que o íon Ca<sup>2+</sup> contribuiu para o aumento da atividade e da estabilidade térmica da xilanase.

O conteúdo de XOs totais (6,7 mg/mL) e a conversão de xilana em XOs (22,3 %) não apresentaram diferença (p>0,05) entre 2 e 24 h de processo. A adição de 10 mmol/L de Ca<sup>2+</sup> não aumentou o conteúdo de XOs totais e nem a conversão de xilana em XOs, no entanto em presença do íon, o hidrolisado teve maior concentração de xilobiose. Os hidrolisados obtidos em 24 h de reação, com e sem o íon Ca<sup>2+</sup>, foram compostos por xilobiose (47,2 e 56,6 %), xilose (35,8 e 28,2 %) e xilotetraose (16,9 e 15,2 %), respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACHARY, A. A.; GOBINATH, D.; SRINIVASAN, K.; PRAPULLA, S. G. Protective effect of xylooligosaccharides from corncob on 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer in rats. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 2, p. 146–152, 2015.
- ABD EL ATY, A. A.; SALEH, S. A. A.; EID, B. M.; IBRAHIM, N. A.; MOSTAFA, F. A. Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 129–137, 2018.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A. Optimization of upstream and downstream process parameters for cellulase-poor-thermo-solvent-stable xylanase production and extraction by *Aspergillus tubingensis* FDHN1. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 3, 2015.
- ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6488–6495, 2009.
- AKPINAR, O.; AK, O.; KAVAS, A.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5544–5551, 2007.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 119–125, 2010.
- AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; CARDOSO, B. B.; ALVES, J. I.; PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, L. R. In vitro assessment of prebiotic properties of xylooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 115460, 2020.
- AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; GONÇALVES, R. F. S.; PINHEIRO, A. C.; SILVA, S.; COELHO, E.; COIMBRA, M. A.; PRATHER, K. L. J.; RODRIGUES, L. R. Downscale fermentation for xylooligosaccharides production by recombinant *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 176–183, 2019.
- AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; PRATHER, K. L. J.; RODRIGUES, L. R. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, 107397, 2019.
- AN, C.; MA, S.J.; CHANG, F.; XUE, W. JIAO. Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 180–185, 2017.
- ANAND, A.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Characteristics of thermostable endoxylanase and  $\beta$ -xylosidase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues. **Extremophiles**, v. 17, n. 3, p. 357–366, 2013.
- ANDRADE, C. C. P. **Produção, purificação e caracterização de xilanase termoestável**

produzida por *Cryptococcus flavescens* e expressão em *Pichia pastoris*. [s.l.] 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2014.

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

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

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

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

BAPTISTA, S. L.; CARVALHO, L. C.; ROMANÍ, A.; DOMINGUES, L. Development of a sustainable bioprocess based on green technologies for xylitol production from corn cob. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112–867, 2020.

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

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

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; AGARWAL, K.; CHATURVEDI, V.; VERMA, P. Purification and characterization of a thermo-acid/alkali stable xylanases from *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in Xylo-oligosaccharides production from lignocellulosic agricultural wastes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1191–1202, 2019.

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

BIBI, Z.; NAWAZ, M. A.; IRUM-US-SALAM; WAQAS, M.; AMAN, A.; QADER, S. A. U. Significance of metal ions, solvents and surfactants to improve the xylan degrading behavior of  $\beta$ -1,4-D-xylanohydrolase from *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 242–246, 2019.

BIBI, Z.; UL QADER, S. A.; AMAN, A.; UR REHMAN, H.; NAWAZ, M. A.; KARIM, A.; US SALAM, I.; WAQAS, M.; KAMRAN, A. Xylan deterioration approach: Purification and

catalytic behavior optimization of a novel  $\beta$ -1,4-D-xylanohydrolase from *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. **Biotechnology Reports**, v. 21, 2019.

BOONRUNG, S.; KATEKAEW, S.; MONGKOLTHANARUK, W.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of low molecular weight extreme alkaline xylanase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* BF1-7. **Mycoscience**, v. 57, n. 6, p. 408–416, 2016.

BORBA, T. D. M. **Estabilidade e aplicação de protease P45 na hidrólise proteica de plasma de sangue bovino**. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

BORUAH, P.; DOWARAH, P.; HAZARIKA, R.; YADAV, A.; BARKAKATI, P.; GOSWAMI, T. Xylanase from *Penicillium meleagrimum* var. viridiflavum - a potential source for bamboo pulp bleaching. **Journal of Cleaner Production**, v. 116, p. 259–267, 2015.

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

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

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2006.

CANNETIERI, E. V.; SILVA, J. B. D. A.; FELIPE, M. D. G. D. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 323–331, 2002.

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

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 199–207, 2015.

CEZAR, M.; RODRIGUES, M.; NERI-NUMA, I. A.; BUENO, J.; PAULINO, B. N.; PESSOA, M. G.; PASTORE, G. M. Oligosaccharide biotechnology: An approach of prebiotic revolution on the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 17–37, 2017.

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

p. 215–221, 2012.

CHEN, L. L.; ZHANG, M.; ZHANG, D. H.; CHEN, X. L.; SUN, C. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Purification and enzymatic characterization of two  $\beta$ -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5230–5236, 2009.

CHEN, X.; CAO, X.; SUN, S.; YUAN, T.; SHI, Q.; ZHENG, L.; SUN, R. Evaluating the production of monosaccharides and xylooligosaccharides from the pre-hydrolysis liquor of kraft pulping process by acid and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 906–911, 2018.

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

CHOUDHURY, A. R.; BHATTACHARYYA, M. S.; PRASAD, G. S. Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 232–237, 2012.

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

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

COPELAND, R. **Enzymes a practical introduction to structure, mechanism and data analysis**. New York: John Wiley & Sons, 2000

CORTEZ, E. V.; PESSOA, A. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3–4, p. 277–283, 1999.

CORTEZ, E. V.; PESSOA, A.; ASSIS, A. N. Xylanase recovery by ethanol and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  precipitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70–72, p. 661–666, 1998.

COSTA, M. A. L.; FARINAS, C. S.; MIRANDA, E. A. Ethanol precipitation as a downstream processing step for concentration of xylanases produced by submerged and solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 477–488, 2018.

CUTLER, P. **Protein purification protocols**. Springer S ed. [s.l.] Humana Press, 2014 .

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

FADEL, M.; KEERA, A. A.; ABDEL-AZIZ, S. M.; KAHIL, T. Clean production of xylanase

from white corn flour by *Aspergillus fumigates* F-993 under solid state fermentation. **World Applied Sciences Journal**, v. 29, n. 3, p. 326–336, 2014.

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

FARINAS, C. S.; SCARPELINI, L. M.; MIRANDA, E. A.; BERTUCCI NETO, V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 17–26, 2011.

FINEGOLD, S. M.; LI, Z.; SUMMANEN, P. H.; DOWNES, J.; THAMES, G.; CORBETT, K.; DOWD, S.; KRAK, M.; HEBER, D. Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. **Food and Function**, v. 5, n. 3, p. 436–445, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em:  
<<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=458>>.  
Acesso em: 1 jun. 2020.

FU, L. H.; JIANG, N.; LI, C. X.; LUO, X. M.; ZHAO, S.; FENG, J. X. Purification and characterization of an endo-xylanase from *Trichoderma* sp., with xylobiose as the main product from xylan hydrolysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 11, 2019.

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

GAUTÉRIO, G. V. **Produção e caracterização de enzimas xilanolíticas e xilooligosacarídeos a partir de substratos agroindustriais**. 279 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2020.

GAUTÉRIO, G. V.; CARDOSO VIEIRA, M.; SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 335–345, 2018.

GAUTÉRIO, G. V.; SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; RIBEIRO, T. R.; KALIL, S. J. Xylooligosaccharides production by crude and partially purified xylanase from *Aureobasidium pullulans*: Biochemical and thermodynamic properties of the enzymes and their application in xylan hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 104, p. 161–170, 2021.

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

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n.

12, p. 1703–1720, 1987.

GOHEL, S. D.; SINGH, S. P. Thermodynamics of a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent, highly thermostable and detergent compatible purified alkaline serine protease from *Nocardiopsis xinjiangensis* strain OM-6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 565–574, 2018.

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

GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production and optimization of xylooligosaccharides from corn cob by *Bacillus aerophilus* KGJ2 xylanase and its antioxidant potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 595–600, 2015.

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

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

GULLÓN, P.; SALAZAR, N.; MUÑOZ, M. J. G.; GUEIMONDE, M.; RUAS-MADIEDO, P.; LOS REYES-GAVILÁN, C. G.; PARAJÓ, J. C. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks. **BioResources**, v. 6, n. 3, p. 3096–3114, 2011.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137–161, 1996.

HEINEN, P. R. BAURAMEISTER, A.; RIBEIRO, L. F.; MESSIAS, J. M.; ALMEIDA, P. Z.; MORAES, L. A. B.; VARGAS-RECHIA, C. G.; OLIVEIRA, A. H. C.; WARD, R. J.; FILHO, E. X. F.; KADOWAKI, M. K.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. GH11 xylanase from *Aspergillus tamaris* Kita: Purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 291–299, 2018.

IRFAN, M.; ASGHAR, U.; NADEEM, M.; NELOFER, R.; SYED, Q. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 139–147, 2016.

JIANG, L.; WU, S.; KIM, J. M. Effect of different nitrogen sources on activities of UDPG-pyrophosphorylase involved in pullulan synthesis and pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 1085–1088, 2011.

JOSHI, N.; SHARMA, M.; SINGH, S. P. Characterization of a novel xylanase from an extreme temperature hot spring metagenome for xylooligosaccharide production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 11, p. 4889–4901, 2020.

JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 479–492, 2013.

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

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; ZOUARI-ELLOUZI, S.; CHAABOUNI, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 1–10, 2016.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Production, purification and characterisation of alkali stable xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3 SUPPL., p. S1790–S1797, 2012.

KANTE, R. K.; SOMAVARAPU, S.; VEMULA, S.; KETHINENI, C.; MALLU, M. R.; RONDA, S. R. Production of recombinant human asparaginase from *Escherichia coli* under optimized fermentation conditions: Effect of physicochemical properties on enzyme activity. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 24, n. 5, p. 824–832, 2019.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Cell-associated acid  $\beta$ -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. **New Biotechnology**, v. 26, n. 1–2, p. 60–67, 2009.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: A novel acidophilic xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 429–443, 2010.

KUMAR, S.; HAQ, I.; PRAKASH, J.; SINGH, S. K.; MISHRA, S.; RAJ, A. Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, 2017.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Applicability of thermo-alkali-stable and cellulase-free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic *Bacillus halodurans* in producing xylooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 11, p. 2279–2285, 2011.

LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5–6, p. 468–473, 2003.

LEMES, A. C. **Obtenção e caracterização de queratinase de *Bacillus* sp. P45 a partir de coprodutos e aplicação na produção de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa**. 181f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

LEMES, A. C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, S.; RODRIGUES, L. R. Integrated strategy for purification of esterase from *Aureobasidium pullulans*. **Separation and Purification Technology**, v. 209, p. 409–418, 2019.

LIAB, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1–2, p. 89–94, 2000.

- LIU, X.; LIU, Y.; JIANG, Z.; LIU, H.; YANG, S.; YAN, Q. Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs. **Food Chemistry**, v. 264, p. 310–318, 2018.
- ŁOJEWSKA, E.; KOWALCZYK, T.; OLEJNICZAK, S.; SAKOWICZ, T. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 110–117, 2016.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- LUO, L.; CAI, J.; WANG, C.; LIN, J.; DU, X.; ZHOU, A.; XIANG, M. Purification and characterization of an alkaliphilic endo-xylanase from *Streptomyces althioticus* LMZM and utilization in the pulp paper industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1093–1098, 2016.
- MA, Z. C.; FU, W. J.; LIU, G. L.; WANG, Z. P.; CHI, Z. M. High-level pullulan production by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenium* P16 isolated from mangrove system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4865–4873, 2014.
- MARIÑO, M. A.; FREITAS, S.; MIRANDA, E. A. Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases produced by *Trichoderma harzianum* P49P11. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 325–333, 2015.
- MARZOCCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MIZRAHI, L.; ACHITUV, Y. Effect of heavy metals ions on enzyme activity in the mediterranean mussel, *Donax trunculus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 6, p. 854–859, 1989.
- MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1913–1923, 2006.
- NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. São Paulo: 2006
- NERI, D. F. D. M. **Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto different water insoluble matrices**. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Braga, 2008.
- NINAWA, S.; KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1252–1258, 2008.

NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. 4 - Protein extraction and precipitation. *In: CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. (Eds.). Proteomic profiling and analytical chemistry. 2 ed.* Boston: Elsevier. p. 51–62.

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

ÖZCAN, E.; SARGIN, S.; GÖKSUNGUR, Y. Comparison of pullulan production performances of air-lift and bubble column bioreactors and optimization of process parameters in air-lift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p. 9–15, 2014.

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

PALMER, T.; BONNER, P. **Enzymes: Biochemistry, biotechnology, clinical chemistry. 2. ed.** Cambridge, Reino Unido: Woodhead publishing, 2011.

PATIPONG, T.; LOTRAKUL, P.; PADUNGROS, P.; PUNNAPAYAK, H.; BANKEEREE, W.; PRASONGSUK, S. Enzymatic hydrolysis of tropical weed xylans using xylanase from *Aureobasidium melanogenum* PBUAP46 for xylooligosaccharide production. **3 Biotech**, v. 9, n. 2, p. 0, 2019.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos.** Barueri: Manole, 2005.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V **Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial.** São Paulo: Blucher, 2020.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes: Structure, function and applications,** 2007

PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; KHANDA, S. M. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 540–549, 2013.

PRAKASH, B.; VIDYASAGAR, M.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 3–4, p. 192–198, 2012.

QING, Q.; LI, H.; KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Xylooligosaccharides production, quantification, and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment. **Aqueous pretreatment of plant Biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals**, p. 391–415, 2013.

RAJ, A.; KUMAR, S.; SINGH, S. K.; PRAKASH, J. Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 199–209, 2018.

RAJAGOPALAN, G.; YEW, K. W.; HE, J.; YANG, K. L. Production, purification, and characterization of a xylooligosaccharides-forming xylanase from high-butanol-producing strain *Clostridium* sp. BOH3. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 448–457, 2013.

RATNADEWI, A. A. I.; AMALIYAH ZAIN, M. H.; NARA KUSUMA, A. A. N.; HANDAYANI, W.; NUGRAHA, A. S.; SISWOYO, T. A. *Lactobacillus casei* fermentation towards xylooligosaccharide (XOS) obtained from coffee peel enzymatic hydrolysate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, 101446, 2020.

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

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo, SP: Blucher, 2007.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015.

SCOPES, R. K. **Protein purification: Principles and practice**. [s.l.] Springer New York, 1994.

SEEMAKRAM, W.; BOONRUNG, S.; AIMI, T.; EKPRASERT, J.; LUMYONG, S.; BOONLUE, S. Purification, characterization and partial amino acid sequences of thermo-alkali-stable and mercury ion-tolerant xylanase from *Thermomyces dupontii* KKU-CLD-E2-3. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

SEEMAKRAM, W.; BOONRUNG, S.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of low molecular weight alkaline xylanase from *Neosartorya tatenoi* KKU-CLB-3-2-4-1. **Mycoscience**, v. 57, n. 5, p. 326–333, 2016.

SHAHRESTANI, H.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; TAVAKOLI, O. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 51–58, 2016.

SHENG, P.; XU, J.; SACCONI, G.; LI, K.; ZHANG, H. Discovery and characterization of endo-xylanase and  $\beta$ -xylosidase from a highly xylanolytic bacterium in the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 33–40, 2014.

SHIN, Y. C.; KIM, Y. H.; LEE, H. S.; CHO, S. J.; BYUN, S. M. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by a mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, n. 1, p. 129–133, 1989.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 307–313, 2015.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, n. 2, p. 25–33, 1998.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 19–30, 2015.

SPURWAY, T. D.; MORLAND, C.; COOPER, A.; SUMNER, I.; HAZLEWOOD, G. P.; O'DONNELL, A. G.; PICKERSGILL, R. W.; GILBERT, H. J. Calcium protects a mesophilic xylanase from proteinase inactivation and thermal unfolding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17523–17530, 1997.

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

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 689–692, 1987.

TANAKA, H.; MUGURUMA, M.; OHTA, K. Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 2, p. 202–211, 2006.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: A review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1327–1340, 2003.

THAKURIA, A. An in vitro study of the prebiotic properties of xylooligosaccharide (XOS) and organoleptic evaluation of XOS added prawn patia and black rice kheer. **Bioactive Compounds in Health and Disease**, v. 3, n. 1, p. 1, 2020.

VADI, R. M.; STROHFUS, B. R. H.; WEST, T. P. Characterization of a xylanase from *Aureobasidium pullulans*. **Microbios**, v. 85, n. 344, p. 179–187, 1996.

VALLS, C.; PASTOR, F. I. J.; VIDAL, T.; RONCERO, M. B.; DÍAZ, P.; MARTÍNEZ, J.; VALENZUELA, S. V. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, n. April, p. 43–50, 2018.

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

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Enzymatic processing of crude xylooligomer solutions obtained by autohydrolysis of Eucalyptus wood. **Food Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 91–105, 2002.

VÁZQUEZ, M. J.; GARROTE, G.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: Evaluation of operational strategies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 8, p. 889–896, 2005.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WALSH, G. **Proteins: Biochemistry and Biotechnology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2014.

WANG, D.; YU, X.; GONGYUAN, W. Pullulan production and physiological characteristics of *Aureobasidium pullulans* under acid stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 18, p. 8069–8077, 2013.

WANG, P.; GUO, X.; WU, C.; HUANG, Q.; XU, X.; ZHOU, G.; BAI, Y. Hydrophobic-assembled curcumin–porcine plasma protein complex affected by pH. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 3, p. 891–897, 2019.

WEI, P.; CHENG, C.; LIN, M.; ZHOU, Y.; YANG, S. T. Production of poly(malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: Kinetics and process economics. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 581–589, 2017.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnología de los enzimas**. Zaragoza: Acribia, 1991 .

WU, H.; CHENG, X.; ZHU, Y.; ZENG, W.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 1, p. 46–51, 2018.

XUE, J. L.; ZHAO, S.; LIANG, R. M.; YIN, X.; JIANG, S. X.; SU, L. H.; YANG, Q.; DUAN, C. J.; LIU, J. L.; FENG, J. X. A biotechnological process efficiently co-produces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 204, n. 2016, p. 130–138, 2016.

YADAV, K. L.; RAHI, D. K.; SONI, S. K. An indigenous hyperproductive species of *Aureobasidium pullulans* RYLF-10: Influence of fermentation conditions on exopolysaccharide (EPS) production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 1898–1908, 2014.

YAN, Q.; HAO, S.; JIANG, Z.; ZHAI, Q.; CHEN, W. Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1–4, p. 72–77, 2009.

YAN, Q. J.; WANG, L.; JIANG, Z. Q.; YANG, S. Q.; ZHU, H. F.; LI, L. T. A xylose-tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: Characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5402–5410, 2008.

YANG, J.; SUMMANEN, P. H.; HENNING, S. M.; HSU, M.; LAM, H.; HUANG, J.; TSENG, C. H.; DOWD, S. E.; FINEGOLD, S. M.; HEBER, D.; LI, Z. Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: A pilot study.

**Frontiers in Physiology**, v. 6, n. Aug, p. 1–11, 2015.

YANG, R.; XU, S.; WANG, Z.; YANG, W. Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 677–682, 2005.

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 67–75, 2017.

YEGIN, S.; BUYUKKILECI, A. O.; SARGIN, S.; GOKSUNGUR, Y. Exploitation of agricultural wastes and by-products for production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 xylanase: Screening, bioprocess optimization and scale up. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 999–1010, 2017.

ZHANG, F.; HU, S. N.; CHEN, J. J.; LIN, L. B.; WEI, Y. L.; TANG, S. K.; XU, L. H.; LI, W. J. Purification and partial characterisation of a thermostable xylanase from salt-tolerant *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 T. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 225–228, 2012.