UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL PATRÍCIA OLIVEIRA DA SILVA

Purificação e Caracterização bioquímica da xilanase produzida por *Aspergillus japonicus* e Imobilização Enzimática em Alginato

Campo Grande, MS 2016

PATRÍCIA OLIVEIRA DA SILVA

# Purificação e Caracterização bioquímica da xilanase produzida por *Aspergillus japonicus* e imobilização enzimática em alginato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito final à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof<sup>a</sup> .Dr<sup>a</sup>. Giovana C. Giannesi

Campo Grande, MS 2016

Aos meus pais, que sempre foram meu suporte

E à minha irmã que é meu exemplo.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o pai cuidadoso e amável.

Aos meus pais, Antônio Luiz e Maria Zélia, que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditei, que me apoiaram quando decidi continuar estudando e que estiveram sempre ao meu lado.

À minha irmã, Mariana, por ser meu exemplo de foco, coragem e determinação.

Ao meu namorado, Maykon, por todo carinho e compreensão e pela ajuda nos diversos experimentos fora de hora.

Á minha orientadora, Giovana Giannesi, por toda atenção, compreensão e suporte nesses 5 anos de orientação. Por sempre me incentivar a seguir em frente, e por esperar sempre o melhor de mim.

Á todos os professores e técnicos do laboratório que sempre me ajudaram a solucionar minhas dúvidas, desde as mais triviais até as mais complexas.

Ao professor Dr. Newton Valério e a EMBRAPA Gado de Corte - MS pelo suporte com os experimentos de espectrometria de massas.

À Clarice, por toda atenção e ajuda no cultivo e identificação dos fungos, e pelo carinho com que nos tratava, adoçando sempre as nossas vidas.

Aos colegas do laboratório, por "quebrar um galho" sempre que preciso, pelas inúmeras trocas de água da diálise, pelos "por favor, você pode fazer isso por mim?" sempre atendidos, pelos momentos de descontração, pelas conversas sem fim, sem propósito e sem cabimento. Pelos risos, pelas piadas, pela diversão, que fizeram as horas de experimento passar bem mais rápido.

A fonte financiadora nesses dois anos, CAPES.

Enfim, a todos que tornaram possível esse feito, muito obrigada!

"Um homem pode ser tão grande quanto ele queira ser. Se você acredita em si mesmo e tem coragem, determinação, dedicação e se você está disposto a sacrificar as pequenas coisas da vida e pagar o preço pelas coisas que valem a pena, isso pode ser feito." (Vince Lombardi)

#### RESUMO

Xilanases (EC 3.2.1.8) são glicosidases que catalisam a hidrólise da xilana, um dos polissacarídeos estruturais das células vegetais e o segundo principais polissacarídeo mais abundante na natureza. Fungos filamentosos, principalmente do gênero Aspergillus, são eficientes produtores de enzimas xilanolíticas. Xilanases têm sido extensivamente estudadas devido às suas potenciais aplicações, tais como, nas indústrias de alimentos, rações e papel. Apesar das diversas aplicações industriais, o alto custo, a instabilidade e a difícil separação do meio reacional, faz com que o uso comercial das enzimas permaneça limitado. A imobilização das enzimas em alginato de cálcio, um suporte barato, acessível e de fácil manipulação é uma opção na superação desses obstáculos. O objetivo desse trabalho foi purificar e caracterizar uma endo-xilanase produzida por Aspergillus japonicus e a imobilização da enzima em alginato. Entre os 5 fungos testados, A. japonicus mostrou alta produção de xilanase (105,3 U/ml) em meio líquido e purificação de 38,9 vezes com 83,3% de rendimento. A enzima com peso de 32 kDa (SDS-PAGE), confirmada por MALDI-TOF, apresentou identidade significante com duas endo-xilanases de Aspergillus aculeatus. O pH e a temperatura ótima para atividade da enzima antes e após a purificação foi 5,0 e 55 °C, respectivamente. Quanto a estabilidade ao pH, a enzima bruta foi estável no intervalo de 4-8, enquanto a purificada no intervalo de pH 5-8. A termoestabilidade se deu de 40-50 °C para enzima bruta e 40 e 45 °C para purificada, apresentando meia vida de 120 minutos a 50 °C. O íon Mn<sup>2+</sup> ativou a enzima purificada em concentração de 1 mM (35 %) e 5 mM (20 %) e o íon Cu<sup>2+</sup> inibiu a atividade xilanolítica (57 %). A enzima foi classificada como endo-xilanase por cromatografia em camada delgada de sílica, e mostrou potencial na produção de xilo-oligossacarídeos. A imobilização da xilanase em alginato de cálcio apresentou atividade máxima da enzima com 2 % de alginato de sódio e 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. A xilanase imobilizada mostrou cerca de 50 % de atividade residual no segundo ciclo de reação, mantendo mais de 23 % da atividade residual depois de cinco ciclos. O uso de endo-xilanases imobilizadas pode ser uma alternativa na aplicação dessas enzimas no ramo industrial.

Palavras-chave: Aspergillus. Encapsulamento. Complexo xilanolítico.

## ABSTRACT

Xylanase (EC 3.2.1.8) are glycosidases which catalyze the hydrolysis of xylan, a major structural polysaccharides of plant cells, and the second most abundant polysaccharide in nature. Filamentous fungi, especially Aspergillus, are efficient producers of xylan-degrading enzymes. Xylanases have been extensively studied due to their potential applications, such as in the food, feed and paper industry. Despite the many industrial applications, the high cost, instability and difficult separation from the reaction medium, make the commercial use of enzymes to remain limited. The immobilization of enzymes in calcium alginate, a cheap, accessible and easy to handle support is an option in overcoming these obstacles. The aim of this study was to purify and characterize an endo-xylanase produced by Aspergillus japonicus and the enzyme immobilization in alginate. Among the 5 tested fungi, A. japonicus showed high xylanase production (105.3 U/ml) in liquid medium and showed a purification of 38.9 fold with 83.3% yield. The enzyme with weight 32 kDa (SDS-PAGE), confirmed by MALDI-TOF, showed significant identity with two endo-xylanases of Aspergillus aculeatus. The pH and optimum temperature for enzyme activity before and after purification was 5.0 and at 55 ° C respectively. Regarding the pH stability, the crude enzyme was stable in the range of 4-8, while purified in pH 5-8 range. The thermostability was found at 40-50 ° C with crude enzyme and at 40 and 45 ° C for purified, with a half life of 120 minutes at 50 ° C. The Mn<sup>2+</sup> ion activated the purified enzyme at concentration of 1 mM (35 %) and 5 mM (20 %) and the  $Cu^{2+}$  inhibited the xylanolytic activity (57 %). The enzyme was classified as endo-xylanase by thin layer chromatography on silica and showed potential for the production of xylooligosaccharides. The xylanase entrapment in calcium alginate showed maximum enzyme activity with 2 % sodium alginate and 0.1 M CaCl<sub>2</sub>. Immobilized xylanase showed about 50 % residual activity in the second reaction cycle, maintaining more than 23 % residual activity after five cycles. The use of endo-xylanases immobilized can be an alternative in the application of these enzymes in the industrial market.

Keywords: Aspergillus. Entrapment. Xylanolytic complex.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sítios de hidrólise das enzimas do complexo xilanolítico 2	
Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da xilanase purificada de <i>A. japonicus</i>	5
Figura 3 - Espectrometria de massas MALDI-TOF da fração cromatográfica após troca iônica em CM-celulose 26	5
Figura 4 - Espectro de massas dos peptídeos trípticos da xilanase de <i>A. japonicus</i>	7
Figura 5 - Alinhamento das sequências de duas xilanases da família GH10 de A. aculeatus e a sequência da xilanase de A. japonicus	3
Figura 6 - Espectrometria de massas MALDI-TOF com ISD para análise de fragmentos da xilanase de <i>A. japonicus</i>	9
Figura 7 - Influência do pH na atividade xilanolítica 3'	1
Figura 8 - Influência da temperatura na atividade xilanolítica	2
Figura 9 - Efeito da variação de pH na estabilidade da xilanase de A. japonicus 34	4
Figura 10 - Efeito da temperatura na estabilidade da xilanase 38	5
Figura 11 - Análise por CCD dos produtos de hidrólise da xilanase produzida por A japonicus	۱ <i>.</i> 3
Figura 12 - Efeito da concentração de alginato na atividade da xilanase imobilizada	я Э
Figura 13 - Efeito de diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> na imobilização enzimátic 40	a )
Figura 14 - Reuso da xilanase de A. japonicus imobilizada em alginato 42	1

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção xilanolítica em condição submersa	23
Tabela 2 - Purificação da xilanase extracelular de <i>A. japonicus</i>	24
Tabela 3 - Efeito de íons na atividade da xilanase de <i>A. japonicus</i>	37

# Lista de Abreviaturas e Siglas

AS	Ácido sinapínico
ATF	Ácido trifluoroacético
a.u.	Unidade arbitrária
BDA	Ágar Dextrose Batata
CREA	Enzima repressora do catabolismo A
CM-celulose	Carboximetil-celulose
Da	Daltons
DEAE	Dietilaminoetil
DAN	1,5-diaminonaftaleno
DNS	Ácido-3,5-dinitrosalicílico
DTT	Ditiotreitol
kDa	Quilodaltons
kV	Quilovolts
ISD	Ionização na fonte
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pl	Ponto isoelétrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
superDHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzóico + Ácido 2 hidróxi-5- metoxibenzóico
ATF	Ácido trifluoroacético

CCD	Cromatografia em camada delgada
U	Unidade de enzima
XOS	Xilo-oligossacarídeos

# **SUMÁRIO**

1	IN	TRO	DUÇÃO	
	1.1	Xila	ana	1
	1.2	Co	mplexo Xilanolítico	2
	1.2	2.1	Xilanase	3
	1.	.2.1.	1 Sistema de Classificação	. 3
	1.	2.1.2	2 Regulação da Síntese de Xilanase	4
	1.3	Or	ganismos Produtores de Xilanase	5
	1.3	3.1	Fungos Filamentosos	5
	1.	.3.1.	1 Aspergillus (Aspergill)	6
	1.4	Ар	licação das Xilanases	7
	1.4	l.1	Fabricação de Alimentos e Bebidas	7
	1.4	<b>.</b> 2	Aplicações Química e Farmacêutica	8
	1.4	1.3	Polpa e Papel	9
	1.4	I.4	Ração Animal	.10
	1.5	Dif	iculdades no uso de Enzimas	.10
	1.6	Ime	obilização Enzimática	.11
	1.6	5.1	Imobilização por Aprisionamento	.11
	1.6	<b>5.2</b>	Suportes	.12

# 2 OBJETIVO GERAL 2.1 Objetivos Específicos:......14

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1	Manutenção dos Microrganismos1	5
3.2	Fermentação Submersa1	5

3.3	Ens	saio Enzimático e Proteico1	5
3.4	Pur	rificação da Xilanase de <i>A. japonicus</i> 1	6
3.5	Ele	troforese em Gel de Poliacrilamida em Condição Desnaturant	te
(SDS	- PA	GE) e Não Desnaturante (PAGE 4.3)1	6
3.6	Esp	pectrometria de Massas MALDI-TOF1	7
3.6	.1	Ionização da Fração Cromatográfica1	7
3.6	.2	Excisão da Banda e Digestão com Tripsina1	8
3.6	.3	Ionização dos Peptídeos Obtidos Após Digestão com Tripsina1	9
3.7	Efe	ito do pH e da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Enzima2	20
3.8	Efe	ito de Íons na Atividade Enzimática2	20
3.9	Cro	omatografia em Camada Delgada (CCD)2	20
3.10	Imc	obilização Enzimática2	21
3.1	0.1	Otimização das Concentrações de Alginato de Sódio e Cloreto d	le
Cá	lcio	para a Imobilização da Xilanase2	21
3.1	0.2	Imobilização da Xilanase de A. japonicus2	21
3.1	0.3	Reuso da Xilanase Imobilizada2	21

## 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1	Produção de Xilanase em Meio Líquido23
4.2	Purificação da Xilanase Extracelular Produzida por A. japonicus23
4.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida24
4.4	Espectrometria de Massas25
4.5	Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Xilanase
4.6	Estabilidade ao pH e à Temperatura da Xilanase Purificada33
4.7	Efeito de Íons Metálicos na Atividade da Xilanase Purificada
4.8	CCDErro! Indicador não definido.
4.9	Imobilização da Enzima em Alginato de Cálcio

4.9.1	Otimização	de	Alginato	de	Sódio	е	Cloreto	de	Cálcio	para	а
Imobili	zação da Enz	ima									39
4.9.2	Reuso da xi	lana	ise imobili	zada	a						10

# 5 CONCLUSÃO

ANEXO		53
-------	--	----

#### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Xilana

A xilana é um dos principais polissacarídeos estruturais das células vegetais e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. É constituinte principal da hemicelulose, que corresponde de 20-30 % da biomassa vegetal (Subramaniyan e Prema, 2002).

Possui ampla distribuição em tecidos e células, está presente em algas marinhas e em várias espécies de plantas, sendo encontrada em angiospermas, gimnospermas e plantas anuais (Collins *et al.*, 2005).

É tipicamente localizada na parede celular secundária, onde interage via ligações covalentes e não-covalentes com a lignina e a celulose. Na interface entre esses dois polissacarídeos, a xilana é responsável por manter a coesão das fibras e a integridade da parede celular vegetal (Motta *et al.*, 2013). Quando componente da parede primária, é encontrada em células em crescimento, sementes e bulbos, onde exerce função de reserva (Bajpai, 2014).

A cadeia principal da xilana de plantas é principalmente constituída por resíduos de D-xilanopiranose unidos por ligações  $\beta(1\rightarrow 4)$ , podendo apresentar variável grau de polimerização da cadeia e de ramificações dependendo da espécie vegetal e do tipo celular (Beliën *et al.*, 2006).

Baseado nos substituintes da cadeia, as xilanas podem ser categorizadas como homoxilanas lineares (resíduos xilanosil), arabinoxilanas ( $\alpha$ -L-arabinofuranosil), glicuronoxilanas (ácido  $\alpha$ -D-glicurônico) e glicuronoarabinoxilanas (ácido  $\alpha$ -D-glicurônico) e  $\alpha$ -L-arabinose). O tipo da cadeia determinará a solubilidade, conformação física e a reatividade da molécula de xilana com os outros componentes da hemicelulose (Motta *et al.*, 2013).

As fontes potenciais de xilana incluem os resíduos produzidos por culturas agrícolas como sorgo, cana-de-açúcar e milho, bem como produtos florestais e resíduos de plantas folhosas e resinosas (Bajpai, 2014). Grande quantidade desses resíduos é produzida em todo o globo, desse modo, para evitar seu acúmulo no ambiente e consequente poluição ambiental, a conversão dessa matéria-prima em produtos de alto valor agregado como biocombustíveis, reagentes químicos, ração

animal ou mesmo na produção de enzimas, se torna algo extremamente necessário (Polizeli e Rai, 2013).

A hidrólise enzimática é o método mais viável, conveniente e benéfico ao meio ambiente para a degradação da biomassa, resultando em alto rendimento de açúcar (Chandel *et al.*, 2012). Levando em conta a heterogeneidade e natureza química complexa da xilana, a clivagem completa requer a ação de um complexo enzimático com diversas especificidades e modos de ação (Beg *et al.*, 2001).

#### 1.2 Complexo Xilanolítico

O complexo xilanolítico, responsável pela hidrólise da xilana, é composto por diversas enzimas que trabalham de forma sinérgica, entre elas  $\alpha$ -D-glicuronidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, acetil-xilana esterases, ácido ferúlico esterases e ácido p-cumárico esterases que são responsáveis pela liberação de grupos laterais específicos da cadeia, e as  $\beta$ -1,4-xilanases e  $\beta$ -xilosidases que são enzimas chave na hidrólise da xilana, promovendo a degradação da cadeia polissacarídica principal (Figura 1) (Subramaniyan e Prema, 2002; Aragon, 2013).



**Figura 1**: Sítios de hidrólise das enzimas do complexo xilanolítico (modificada de Collins *et al.*, 2005).

#### 1.2.1 Xilanase

As xilanases foram relatadas pela primeira vez em 1955, originalmente denominadas pentosanases, e em 1961 foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (Collins et al., 2005). Classificadas pelo código EC 3.2.1.8 e pelo nome endo-1,4-β-xilanase, são reconhecidas também por: endo- $(1 \rightarrow 4)$ - $\beta$ -xilana-4-xilanohidrolase; endo-1.4xilanase; xilanase;  $\beta$ -1,4-xilanase; endo- $\beta$ -1,4-xilanase; endo-1,4- $\beta$ -D-xilanase; 1,4- $\beta$ -xilana xilanohidrolase;  $\beta$ -xilanase;  $\beta$ -1,4-xilana xilanohidrolase e  $\beta$ -D-xilanase (http://www.enzyme-database.org/query.php?name=xylanase). São responsáveis pela hidrólise das ligações  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 internas da cadeia de xilana, formando xilooligossacarídeos (XOS) como produto final. Juntamente com as β-xilosidases estão envolvidas na produção de xilose, que é fonte primária de carbono para o metabolismo celular de diversos organismos (Aragon, 2013). Os pontos de hidrólise escolhidos pelas xilanases não são aleatórios, vão depender da natureza da molécula do substrato, como o comprimento da cadeia, o grau de ramificação, e a presença de substituintes (Beg et al., 2001; Bajpai, 2014).

#### 1.2.1.1 Sistema de Classificação

A classificação proposta por Wong *et al.* (1988) baseada nas propriedades físico-químicas da enzima, dividem as xilanases em dois grupos: as enzimas básicas, com massa molar < 30 kDa e pl básico e as enzimas ácidas, com massa molar > 30 kDa e pl ácido. Porém, descobertas de novas xilanases mostraram que cerca de 30 % dessas enzimas não podem ser classificadas dessa forma (Collins *et al.*, 2005).

Uma nova classificação, mais atualizada das enzimas, está disponível no servidor CAZy (http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html). Nessa classificação as endo-1,4-xilanases pertencem à classe de enzimas glicosil hidrolases (GH), enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas entre dois ou mais hidratos de carbono. Nesse arranjo, as enzimas são agrupadas em famílias de acordo com a sequência de aminoácidos de sua estrutura primária, o que reflete a similaridade dos dobramentos proteicos e mecanismos de ação. Atualmente existem 135 famílias no

banco de dados, sendo as endo-xilanases pertencentes, principalmente, às famílias 10 e 11 (Beliën *et al.*, 2006; Pollet *et al.*, 2010; Kocabaş *et al.*, 2015).

As endo-xilanases da Família 10 são enzimas de alto peso molecular que possuem um domínio catalítico que pode ser acompanhado por um domínio de ligação a carboidratos, comumente específico para a celulose. Duas porções de glutamato agem como resíduos catalíticos da reação enzimática, que procede através de um mecanismo de duplo deslocamento (Beliën *et al.*, 2006). As enzimas dessa família são capazes de atacar as ligações glicosídicas próximas a pontos de ramificação em direção a extremidade não redutora e requerem 2 resíduos xilanopiranose não substituídos entre as ramificações para promover a hidrólise da ligação glicosídica (Bajpai, 2014).

A Família 11 das endo-xilanases contêm enzimas de baixo peso molecular que podem ainda, ser divididas em dois sub-grupos com base em seus pontos isoelétricos: as com pl alcalino e as com pl ácido. Considera-se que, devido às suas dimensões relativamente pequenas, essas endo-xilanases possam passar através dos poros da rede de hemicelulose tornando a hidrólise da xilana mais eficiente (Juturu e Wu, 2012). Em consonância com endo-xilanases da Família 10 das Glicosil Hidrolases (GH10), dois glutamatos estão implicados na hidrólise enzimática com retenção da configuração anomérica através de um mecanismo de duplo deslocamento. No entanto, necessitam de 3 resíduos xilanopiranosil consecutivos entre as ramificações para que a hidrólise aconteça (Bajpai, 2014). Essas enzimas são então, geralmente mais seletivas e liberam oligossacarídeos maiores, uma vez que os substituintes representam maior obstáculo à sua atividade (Beliën *et al.*, 2006).

#### 1.2.1.2 Regulação da Síntese de Xilanase

Em geral, a indução da xilanase é um fenômeno complexo e o nível da resposta varia de organismo para organismo, bem como os agentes indutores ou repressores, que podem muitas vezes funcionar como indutor para alguns organismos enquanto para outros, atuar como repressor (Kulkarni *et al.*, 1999).

Mas, acredita-se, que as xilanases sejam, em menor quantidade, produzidas constitutivamente pelas células e liberadas para o meio extracelular. Os produtos da

hidrólise da xilana, como xilose, xilobiose, xilotreose, quando dentro das células funcionam como fonte de energia e carbono, sustentando o crescimento celular. As xiloses têm o papel de indução direta da síntese de xilanases, uma vez que passam facilmente pela membrana celular e então induzem a síntese de xilanase. Os xilooligômeros de maior peso molecular podem estar envolvidos de duas formas com a indução: passando diretamente pela membrana celular, e subsequentemente, degradados por  $\beta$ -xilosidases internas em xilose, ou sendo degradados a xilose por transportadores de membrana com papel exo- $\beta$ -1,4 semelhantes a  $\beta$ -xilosidases (Subramaniyan e Prema, 2002; Collins *et al.*, 2005). Além dos XOS, estudos ainda isolaram ativadores transcricionais XInR e Aox-InR que estariam envolvidos na síntese das xilanases (Beliën *et al.*, 2006).

A inibição da síntese de xilanase é feita pelos produtos da quebra da xilana (quando em grande quantidade), pela proteína CREA (enzima repressora do catabolismo A), que tem um papel importante na repressão do catabolismo, através da ligação á sequências específicas do promotor dos genes alvo, inibindo sua transcrição e/ou modulando a expressão dos indutores, e por glicose, que age aumentando a afinidade de proteínas repressoras pelo DNA (Rizzatti *et al.*, 2008).

#### 1.3 Organismos Produtores de Xilanase

As xilanases podem ser produzidas por diversos organismos, como bactérias, leveduras, insetos, fungos filamentosos, algas marinhas, protozoários, crustáceos, caracóis e plantas terrestres (Polizeli *et al.*, 2005). No entanto, xilanases fúngicas possuem propriedades especiais como ampla adaptabilidade ao pH, boa estabilidade térmica, resistência a proteólise e alta atividade específica (Qiu *et al.*, 2016), que somadas ao alto nível de expressão enzimática e a fácil obtenção da enzima livre no meio de cultura, transformam os fungos em fontes principais de xilanase comercial (Silva *et al.*, 2015).

#### 1.3.1 Fungos Filamentosos

Os fungos são os principais decompositores da biosfera. A decomposição quebra a matéria orgânica incorporada nos organismos, libera dióxido de carbono na

atmosfera e retorna ao solo os compostos nitrogenados e outras substâncias, para serem reutilizadas por plantas e animais. Como excelentes decompositores, os fungos produzem grande quantidade de enzimas para a quebra das moléculas orgânicas, o que os torna agentes importantes nas áreas médica e industrial (Raven *et al.*, 2007). Além disso, são fontes importantes de vários compostos economicamente significantes, incluindo peptídeos, vitaminas, ácidos orgânicos, antibióticos, e outras substâncias de relevância para a indústria farmacêutica, alimentícia, química e biotecnológica (Chambergo e Valencia, 2016).

Entre os fungos filamentosos os principais produtores de xilanase são do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* (Pal e Khanum, 2011; Kumar *et al.*, 2016; Shankar *et al.*, 2016).

#### 1.3.1.1 Aspergillus (Aspergilli)

O gênero *Aspergillus* representa anamorfos pertencentes à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomicetidae, classe Eurotiomicetes e ao filo Ascomicota. Possuem conidióforo simples, que é usualmente asseptado terminando em uma vesícula com fiálides inserida e conídios em cadeia. Algumas espécies de *Aspergillus* possuem reprodução sexuada apresentando telemorfos A fase sexuada é caracterizada pela produção de cleistotécios (minúsculos corpos de frutificação) fechados de forma arredondada. (Klich, 2002; Chalfoun e Batista, 2003).

Este grupo taxonômico engloba organismos cujas características são de alta importância patológica, agrícola, industrial, farmacêutica, científica, e cultural. Podem ser encontrados em diversas partes do planeta, degradando substratos naturais e produzidos pelo homem. A primeira exploração humana conhecida de *Aspergillus* para fins oficialmente benéficos foi na transformação do arroz, soja e outros alimentos vegetais. Provavelmente a "domesticação" de *Aspergillus* para a produção de alimentos originou-se na China cerca de 2000 anos atrás (Goldman e Osmani, 2007).

Em função da alta produção enzimática, capacidade de degradar uma ampla gama de polissacarídeos, ter boa capacidade de fermentação e níveis elevados de secreção de proteínas, têm sido aplicados em indústrias, como a de alimentação humana e animal, papel e celulose, biocombustíveis, plásticos biodegradáveis, e as indústrias têxteis, e como hospedeiros para a expressão de proteínas heterólogas (Culleton *et al.*, 2013).

Por seu grande potencial na degradação da biomassa vegetal e das diversas aplicações industriais, tem se tornado o grupo mais amplamente estudado. Com potencial na produção de enzimas, especificamente xilanases, são relatados *Aspergillus niveus* (Damásio *et al.*, 2011), *Aspergillus niger* (Khonzue *et al.*, 2011; Pal e Khanum, 2011), *Aspergillus flavus* (De Alencar Guimaraes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015), *Aspergillus terreus* (Sorgatto *et al.*, 2012; De Souza Moreira *et al.*, 2013), *Aspergillus caespitosus* (Sandrim *et al.*, 2005), *Aspergillus ochraceus* (Michelin *et al.*, 2010; Michelin *et al.*, 2014), *Aspergillus terricola* (Michelin *et al.*, 2010) *e Aspergillus japonicus* (Wakiyama *et al.*, 2010; Facchini *et al.*, 2011).

#### 1.4 Aplicação das Xilanases

A Xilanase começou a ser utilizada na década de 1980, inicialmente na preparação de alimentos para animais e mais tarde para as indústrias alimentícias, têxteis e de papel (Harris e Ramalingam, 2010). O desenvolvimento da biotecnologia abriu caminho para o uso de xilanases em aplicações de amplo espectro. Movimenta aproximadamente 200 milhões de dólares no mercado mundial (Driss *et al.*, 2014) e são aplicadas nas indústrias de alimentos e bebidas, de polpa e celulose, na sacarificação da xilana a xilose, na produção de compostos químicos, no tratamento enzimático de ração para animais, como aditivos alimentares e no tratamento de tecidos (Juturu e Wu, 2012). O uso de xilanases nesses processos, ainda permite que sejam usados menos produtos químicos, em condições menos severas e com reações colaterais menos perturbadoras, tornando a utilização de xilanases benéfica para a sociedade e para o meio ambiente (Sá-Pereira *et al.*, 2003).

#### 1.4.1 Fabricação de Alimentos e Bebidas

Na fabricação de pães as xilanases quebram a hemicelulose da farinha de trigo, ajudando na redistribuição de água, deixando a massa mais macia e mais fácil para amassar. Durante o processo de panificação, elas atrasam a formação do

miolo, permitindo maior crescimento da massa. Melhoram a viscosidade da massa promovendo a separação do glúten da farinha de trigo, através da hidrólise da arabinoxilana. E ainda desempenham papel importante na manutenção da vida útil do pão (Bajpai, 2014; Chandrasekaran, 2015). A adição da xilanase de *Chaetomium* sp. na massa do pão aumentou cerca de 25 % o volume do pão cozido no vapor e diminuiu em torno de 8,9-24,2 % a firmeza da massa (Jiang *et al.*, 2010). As enzimas xilanolíticas de *Thermoascus aurantiacus* promoveram aumento de 22 % no volume e redução de 25 % na firmeza da massa (Oliveira *et al.*, 2014).

Na indústria de sucos e vinhos as xilanases compõem uma boa parte do mercado de enzimas (Polizeli *et al.*, 2005). Em conjunto com celulases, pectinases e amilases, melhoram o rendimento do suco por meio da liquefação das frutas e vegetais; estabilização da polpa do fruto; aumento da recuperação dos aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, corantes alimentares e pigmentos, redução da viscosidade e hidrólise de substâncias que impedem a limpeza física ou química do sumo, ou que podem causar turvação no concentrado (Harris e Ramalingam, 2010; Pal e Khanum, 2011).

Durante a fabricação da cerveja, a parede celular da cevada é hidrolisada liberando longas cadeias de arabinoxilanas, que aumentam a viscosidade da cerveja tornando-a "lamacenta" (Bajpai, 2014). A adição de xilanase na fermentação da cerveja promoveu aumento na taxa de filtração (37,2 %) e redução na viscosidade (14,5 %) da mistura (Wang *et al.*, 2016). Esse efeito é alcançado pela hidrólise das arabinoxilanas em oligossacarídeos menores que melhoram o aspecto da cerveja (Østergaard e Olsen, 2011). Para uso nas indústrias alimentares as xilanases precisam ter alta estabilidade e atividade ótima em pH ácido (Polizeli *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Aplicações Química e Farmacêutica

As xilanases são por vezes adicionadas em combinação com um complexo de enzimas (hemicelulases, proteases, entre outras) como um suplemento dietético para tratar má digestão, mas ainda poucos medicamentos podem ser encontrados com esta formulação. Produtos hidrolíticos da xilana, como resíduos D-xilopiranosil, podem ser convertidos em combustíveis líquidos (etanol), solventes e adoçantes artificiais de baixas calorias (Polizeli *et al.*, 2005).

As xilanases catalisam a hidrólise de substratos que liberam XOS com efeito pré-biótico quando consumido como parte da dieta. Os XOS são hidrolisados, mas não absorvidos pelo trato gastrointestinal, atuando ali como estimulantes seletivos do crescimento de bactérias benéficas ao hospedeiro, promovendo ainda redução no colesterol do sangue (Driss *et al.*, 2014), prevenção contra a proliferação de bactérias patogênicas e melhorando a absorção de minerais (Damásio *et al.*, 2011). Adicionalmente, XOS são valiosos adoçantes alimentares com atividade pré-biótica, não carcinogênica e anticoagulante (Rashad *et al.*, 2016). Embora a principal fonte de XOS ainda seja a hidrólise ácida, diversas pesquisas têm sido feitas com a intenção de encontrar xilanases com esse potencial (Yan *et al.*, 2009; Teng *et al.*, 2010; Damásio *et al.*, 2011; Qing e Wyman, 2011; Aragon *et al.*, 2013; Bian *et al.*, 2013; Driss *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014; Rashad *et al.*, 2016).

#### 1.4.3 Polpa e Papel

Na indústria de papel a principal aplicação das xilanases é no branqueamento da polpa de celulose. Apesar de muitos países ainda usarem o processamento químico em vez da hidrólise enzimática na manufatura do papel, esse processo possui desvantagens como: elevado custo inicial, emissão de gases com cheiro forte, baixo rendimento (40-50 %), custo elevado e a grande quantidade de reagentes poluentes usados (Polizeli *et al.*, 2005).

As xilanases são utilizadas na remoção da camada de xilana complexada com a lignina dentro das fibras da polpa, facilitando a liberação da lignina e melhorando o efeito do branqueamento químico, e consequentemente, diminuindo significativamente a quantidade de cloro usado de 10 a 50 % (Kumar *et al.*, 2016). A adição de xilanases no pré-tratamento da polpa de celulose aumentou (11 %) a remoção do ácido hexenurônico por lacases durante o cozimento alcalino. A remoção desse composto, que torna a polpa amarela, levou ao aumento de 6 % no brilho em comparação com o tratamento sem xilanase (Valls *et al.*, 2010).

As xilanases empregadas na indústria de papel não necessitam ser purificadas, mas precisam ser ativas em altas temperaturas e pH alcalino, e devem ser livres de celulases, a fim de preservar as fibras de celulose (Yeasmin *et al.*, 2011). Muitos estudos reportam a eficiência das xilanases na deslignificação da polpa de celulose, aumento do brilho e na manutenção da viscosidade da polpa quando usadas no pré-tratamento e biobranqueamento (Sandrim *et al.*, 2005; Betini *et al.*, 2009; De Alencar Guimaraes *et al.*, 2013; Guimarães *et al.*, 2013; Fortkamp e Knob, 2014; Silva *et al.*, 2015).

#### 1.4.4 Ração Animal

As xilanases usadas como aditivos na ração animal, juntamente com diversas enzimas, promovem a quebra de arabinoxilanas dos ingredientes da ração, reduzindo a viscosidade da matéria-prima. As arabinoxilanas presentes nas paredes celulares de grãos, na forma solúvel, podem elevar a viscosidade da alimentação ingerida, o que interfere com a mobilidade e a absorção de outros componentes (Polizeli *et al.*, 2005). Agindo na redução da viscosidade e na permeabilidade da parede celular intestinal, a adição de xilanases na dieta de frangos de corte à base de trigo, juntamente com fitases, melhorou a digestibilidade íleal de aminoácidos, a utilização dos nutrientes e a eficiência alimentar (5,2 %) (Selle *et al.*, 2009). O uso na dieta de aves domésticas melhorou o ganho de peso e a digestibilidade do centeio (Motta *et al.*, 2013) e a suplementação em dietas a base de trigo e milho melhorou a digestibilidade e a taxa de crescimento em porcos (Ndou *et al.*, 2015).

Em suínos e aves jovens, que produzem enzimas endógenas em quantidades menores do que quando adultos, a suplementação alimentar com enzimas exógenas melhora o desempenho alimentar e promove redução na produção de alguns resíduos indesejáveis (fósforo, azoto, cobre e zinco) nos excrementos, reduzindo a contaminação do meio ambiente (Polizeli *et al.*, 2005).

#### 1.5 Dificuldades no uso de Enzimas

Apesar dos diversos benefícios e de suas inúmeras aplicações industriais, o uso de enzimas com aplicação comercial permanece limitado por diversos fatores, tais como o alto custo das enzimas, sua instabilidade e pouca quantidade disponível. O fato de serem solúveis no meio aquoso também é um agravante, já que torna difícil e cara a sua recuperação no final do processo catalítico (Sarrouh *et al.*, 2012). A fim de aumentar a utilização das enzimas como biocatalisadores industriais é obrigatório obter enzimas com estabilidades operacionais melhoradas (Asgher *et al.*, 2014). A capacidade de reutilização também torna a aplicação dessas enzimas economicamente mais vantajosa (Datta *et al.*, 2013).

#### 1.6 Imobilização Enzimática

O termo "enzimas imobilizadas" refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região definida do espaço, com retenção da sua atividade catalítica, e que pode ser repetida e continuamente utilizada (Aragon, 2013). A técnica foi apresentada em 1916 por Nelson e Griffin, que imobilizaram uma invertase em carvão ativado, mas o reconhecimento desse método como potencial para a imobilização de biocatalisadores úteis e reutilizáveis só foi reconhecido 40 anos depois (Cao, 2005).

As principais vantagens da imobilização são: a possibilidade de reutilizar a enzima, a capacidade de parar a reação rapidamente pela remoção da enzima do meio reacional, a estabilização da enzima por meio do confinamento, e a ausência de contaminação do produto pela enzima (Bajpai, 2014). Contudo, durante o processo de imobilização, deve-se atentar para questões como: mudanças conformacionais que possam inativar a enzima; perda da atividade catalítica e perdas maciças de enzima por meio da lixiviação; efeitos difusionais, em decorrência de limitações do acesso do substrato à enzima; e o custo da imobilização, que deve ser compensado pela vida útil do biocatalisador (Alcântara, 2013). Dessa forma, o sucesso da imobilização vai depender principalmente do método de imobilização e do suporte escolhido.

#### 1.6.1 Imobilização por Aprisionamento

Entre as diversas técnicas de imobilização enzimáticas, o aprisionamento é uma técnica bastante utilizada por ser de fácil preparação e baixo custo, e por formar derivados estáveis (Sarrouh *et al.*, 2012). Essa técnica consiste no encarceramento de enzimas em um suporte ou no interior de fibras, que permite que o substrato e os produtos passem através da matriz, mas que a enzima seja retida. Tipicamente, o encapsulamento pode melhorar a estabilidade mecânica e minimizar

a lixiviação da enzima sem promover a interação da enzima com o suporte (Cantone et al., 2013).

A geleificação de polímeros polianiônicos e policatiônicos por adição de íons multivalentes é um método simples e comum utilizado no aprisionamento. Entre as desvantagens estão: a possibilidade de fuga da enzima através dos poros da matriz, a baixa capacidade de carregamento e o desgaste do suporte durante o uso. Além disso, a relação de tamanho da partícula imobilizada para o tamanho do poro do suporte é um fator importante a ser considerado (Mohamad *et al.*, 2015).

#### 1.6.2 Suportes

Além de ser acessível, uma matriz ideal deve abranger características como inércia, força física, estabilidade, regenerabilidade, capacidade de aumentar a especificidade/atividade enzimática e reduzir a inibição pelo produto, a adsorção não específica e a contaminação microbiana (Datta *et al.*, 2013). Nesse sentido, várias matrizes são testadas no aprisionamento de enzimas como: alginato, colágeno, poliacrilamida, gelatina, borracha de silicone e poliuretano. Alginatos, no entanto, são os polímeros mais frequentemente usados, pois promovem branda geleificação e não são tóxicos (Mohamad *et al.*, 2015). Além disso, promovem um ambiente aquoso relativamente inerte dentro da matriz, permitem um processo de encapsulamento em temperatura ambiente e livre de solventes orgânicos, e por ser um gel poroso, promove grande difusão de macromoléculas (Gombotz e Wee, 2012).

O alginato de sódio é um biopolímero, extraído de algas marrons, composto por resíduos de ácido β-D-manurônico e α-L-gulurônico ligados por ligações 1,4, que em presença de íons bivalentes produz uma estrutura insolúvel gelatinosa, capaz de tolerar altas temperaturas e ser biocompatível com a maioria das enzimas (Bibi *et al.*, 2015). As "pérolas" de alginato podem ser formadas pelo gotejamento de uma solução de alginato contendo a enzima em uma solução de íon bivalente como Ca<sup>2+,</sup> Sr<sup>2+</sup>, ou Ba<sup>2+</sup>. A geleificação e o entrecruzamento dos polímeros são principalmente alcançados pela troca do íon sódio do ácido gulurônico com o cátion bivalente (Gombotz e Wee, 2012).

Testes de imobilização de uma lacase em alginato usando diferentes íons bivalentes ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) mostrou que entre os íons testados o cobre conferiu melhor estabilidade a enzima em relação ao pH. Enquanto a temperatura ótima (55 °C) foi conseguida com o cálcio e o aumento da termoestabilidade foi promovido por zinco e cobre. A enzima imobilizada em cobre foi utilizada na remoção de corantes sintéticos durante 2 ciclos de reação (Phetsom *et al.*, 2009). Alginato de cálcio foi usado como matriz para a imobilização de celulase (Viet *et al.*, 2013), lipase (Kumar *et al.*, 2014), protease (Raghu e Rajeshwara, 2015), L-aminoácido oxidase (Singh *et al.*, 2012) e endo-xilanase (Bibi *et al.*, 2015) com alta eficiência catalítica (37-83 %) e capacidade de reuso em torno de 3-8 ciclos.

O alginato também tem sido usado com sucesso na imobilização como pérolas de xantana-alginato e gel de poliacrilamida-alginato (Datta *et al.*, 2013). A imobilização de uma solução multienzimática (alfa-amilase, glucoamilase e celulase) em pérolas de alginato de cálcio-argila apresentou alta eficiência (97 %) e rendimento de imobilização (52,14 %) e possibilitou o uso da enzima por 7 ciclos, mantendo 51,77 % da atividade no último uso (Rahim *et al.*, 2013).

#### 2 OBJETIVO GERAL

Purificar e Caracterizar uma endo-xilanase produzida por *Aspergillus japonicus* e imobilização da enzima em alginato.

#### 2.1 Objetivos Específicos:

Testar a produção e purificação da xilanase utilizando 5 linhagens de fungos filamentosos (Aspergillus japonicus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus terreus<sub>43</sub> e Aspergillus terreus<sub>31</sub>);

Selecionar o melhor fungo filamentoso para a caracterização bioquímica (pH e temperatura ótima, estabilidade à temperatura e pH, efeito de íons, etc.);

Caracterização molecular da xilanase purificada (Espectrometria de massas MALDI-TOF);

 Testar as melhores concentrações de Alginato de Sódio e Cloreto de Cálcio para a imobilização enzimática;

Capacidade de reuso da enzima imobilizada.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Manutenção dos Microrganismos

Os fungos filamentosos, *A. flavus*, *A. niger*, *A. japonicus*, *A. terreus*<sub>31</sub> e *A. terreus*<sub>43</sub>, isolados na região de Mato Grosso do Sul foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio ágar dextrose batata (BDA) inclinado. Estes microrganismos foram identificados pela MSc Clarice Rossatto Marchetti (responsável pela Micoteca de Campo Grande/MS) de acordo com as características morfológicas em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco, especialmente da Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza Motta, responsável pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. Para a manutenção das cepas foram feitos repiques em meio BDA inclinado, mantidos em estufa a 30 °C por um período de 5-7 dias e, posteriormente, armazenados até o momento de uso.

#### 3.2 Fermentação Submersa

Para crescimento e indução da produção da enzima extracelular foi feita a suspensão dos esporos em água destilada e o inóculo em meio líquido modificado segundo Rizzatti *et al.* (2001):  $NH_4H_2PO_4$  (1 %);  $KH_2PO_4$  (0,3 %);  $MgSO_4.7H_2O$  (0,24 %); Extrato de levedura (0,45 %); Peptona (0,02 %);  $H_2O$  q.s.p.100 mL, e farelo de trigo (1 %) como fonte de carbono. Após o crescimento, a 30 °C, sob agitação (110 rpm) durante 120 h, o meio de cultura foi filtrado a vácuo usando papel filtro (Whatman n° 1), e o filtrado foi usado como fonte da enzima extracelular.

#### 3.3 Ensaio Enzimático e Proteico

A atividade xilanolítica foi determinada pela incubação da enzima com 1 % (p/v) de xilana de birchwood (Sigma-Aldrich, USA) em tampão citrato-fosfato (McIlvaine, 1921). A intervalos regulares a reação foi interrompida com ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) e o açúcar redutor liberado foi quantificado (Miller, 1959),

usando xilose como açúcar padrão. A unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de xilose por minuto (µmoles/min), nas condições de ensaio.

Para a determinação da atividade da enzima imobilizada, as pérolas contendo a enzima imobilizada foram misturadas com tampão citrato-fosfato (2,5 mL) contendo 1 % (p/v) de xilana de birchwood sendo incubadas por 1 h a 55 °C. Nos tempos de 30 e 60 min, alíquotas de 1 mL do meio de reação foram retiradas e adicionadas a uma solução de DNS (1:1), os passos seguintes foram seguidos conforme o protocolo mencionado para a enzima livre.

A dosagem de proteína total foi feita a partir do método de Lowry (1951), usando soroalbumina bovina como padrão.

A Atividade específica foi definida em Unidades por miligrama de proteína (U/mg).

#### 3.4 Purificação da Xilanase de A. japonicus

O filtrado da cultura (300 mL) contendo a enzima extracelular de *A. japonicus* foi dialisado contra água, "*overnight*" em geladeira, e então purificado por cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna CM-celulose (Carboximetil-celulose) (Sigma) de 2,0 x 6,0 cm. A amostra foi pré-equilibrada em tampão acetato de sódio 500 mM pH 4,5 e a coluna em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5. Para eluir as proteínas adsorvidas na resina foram aplicados 300 mL de gradiente de NaCI (0-1 M). As amostras foram coletadas, dialisadas contra água e dosadas a atividade enzimática e proteica.

## 3.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condição Desnaturante (SDS-PAGE) e Não Desnaturante (PAGE 4.3)

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) foi feita segundo a metodologia de Laemmli (1970), em concentração de 12 %. A amostra concentrada por evaporação á vácuo (Eppendorf<sup>™</sup> Vacufuge<sup>™</sup> Concentrator), contendo 17 µg de proteína, foi ressuspendida diretamente em 30 µL de tampão de amostra. Após a corrida o gel foi retirado da placa e a revelação das proteínas foi feita com Kit corante de prata (Sigma-Aldrich PROTSIL1-1KT). Os marcadores moleculares utilizados foram: Miosina (220 kDa), β-Galactosidase (110 kDa), Fosforilase B (60 kDa), Albumina serum bovina (45 kDa) e Anidrase Carbônica (30kDa) (Sigma-Aldrich C4861).

Em condição não desnaturante, a eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita em concentração de 6 %. A amostra concentrada (como descrito acima), contendo 30 µg foi ressuspendida no mesmo tampão de corrida com pH 4,5. A corrida foi realizada com inversão da polaridade da fonte e a revelação foi feita com Azul de Coomassie Brilhante R 250.

#### 3.6 Espectrometria de Massas MALDI-TOF

Os experimentos de espectrometria de massas MALDI-TOF foram realizados com o equipamento: Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics) do Laboratório de Proteômica e Espectrometria de Massas em Saúde Animal da Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande/MS, sob coordenação do Dr. Newton Valério Verbisck.

O processamento dos espectros, com suavização, subtração da linha de base e geração das listas de massas, foi feito no programa FlexAnalysis v.3.3 (Bruker Daltonics).

A análise das massas dos peptídeos trípticos foi submetida ao software MASCOT, com auxílio do programa computacional Biotools v.3.1 (Bruker Daltonics), as massas adquiridas com a ionização na fonte (ISD) foram analisadas por BLASTP (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) е as sequências de aminoácidos foram comparadas pelo programa Clustel Omega (http://www.uniprot.org/align).

#### 3.6.1 Ionização da Fração Cromatográfica

A fração cromatográfica foi concentrada com acetona 1:1 e ponteiras Zip-Tip C18 (Millipore) contendo 0,6 µL de resina. Para a concentração utilizando Zip-Tip C18, as amostras liofilizadas foram resuspensas em água Milli-Q contendo ácido trifluoracético (ATF) 0,1 % (v/v), tendo sido acrescentado isotiocianato de guanidina (1 M de concentração final). A microcoluna foi ativada com 10 µL de acetonitrila 100

% e equilibrada após duas passagens com 10  $\mu$ L de ATF 0,1 %. A adsorção da amostra foi feita por aspiração (dez vezes) em volume máximo, com posterior lavagem da resina (três vezes) com 10  $\mu$ L de ATF 0,1 %. Para a eluição das proteínas foram utilizados 5  $\mu$ L de uma solução de acetonitrila 50 % em água Milli-Q contendo ATF 0,1 % (v/v), aspirando e dispensado o mesmo volume diversas vezes. A amostra contendo as proteínas foi então submetida a análise por espectrometria de massas MALDI-TOF.

As matrizes para MALDI utilizadas foram a superDHB, mistura de ácido 2,5dihidróxibenzóico e ácido 2-hidróxi-5-metóxibenzóico (9:1) (50 mg/mL), o ácido sinapínico (SA) (10 mg/mL) e o composto 1,5-diaminonaftaleno (DAN) (20 mg/mL), todas provenientes da Sigma-Aldrich. Para uso, as matrizes foram dissolvidas no solvente acetonitrila 50 % em água Milli-Q contendo ATF 0,1 % (v/v). Após misturar com a matriz na proporção 1:1 (v/v) ou 2:1 (v/v) no caso de DAN, foram aplicados 2 µL por poço da placa, com secagem ao ar e subsequente ionização e análise por MALDI-TOF. Os espectros de massas foram adquiridos com feixe pulsado de laser, após 1000 a 2000 disparos. Para a aquisição em modo linear empregaram-se as voltagens primária da fonte de 20 kV, secundária da fonte de 18,4 kV e lentes de 8,7 kV. Os calibrantes utilizados foram do conjunto MSCAL1 (Sigma-Aldrich), que contém padrões de massa desde 757,3 até 66.430 Da.

#### 3.6.2 Excisão da Banda e Digestão com Tripsina

Após separação eletroforética em gel de acrilamida (SDS-PAGE) a porção do gel contendo a banda de interesse foi recortada e picada em pedaços de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> com lâmina estéril. Os pedaços de gel foram completamente descorados com solução de acetonitrila 50 % em bicarbonato de amônio 50 mM (v/v), com incubação a temperatura ambiente durante 15 min, agitação em vórtex a cada 5 min e troca da solução descorante ao final. As lavagens para retirada do corante foram repetidas até completa descoloração dos pedaços de gel. Após descarte da solução descorante, os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila 100 %, com agitação vertical durante 5 min e secos ao ar. Esse processo foi repetido após a redução das pontes dissulfeto dos resíduos cisteína das proteínas. Para essa etapa foram adicionados 30 µL de solução de ditiotreitol (DTT)

10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, com incubação durante 30 min, sob agitação a temperatura ambiente. A solução foi removida e adicionaram-se 30 µL de iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, com incubação no escuro durante 30 min sob agitação a temperatura ambiente, para alquilação dos resíduos de cisteína reduzidos na etapa anterior. Após lavagem com bicarbonato de amônio 100 mM, os pedaços de gel foram novamente desidratados com acetonitrila 100 %, conforme descrito acima. Os pedaços de gel foram reidratados, em presença da enzima tripsina, durante 1 hora em banho de gelo (~ 4 °C). Após absorção da enzima pelos pedaços de gel, a solução remanescente foi retirada e substituída por 30 µL de bicarbonato de amônio 50 mM, com incubação a 37 °C durante 16 h. Após centrifugação breve a 12000 g durante 30 segundos, os peptídos foram extraídos do gel remanescente com 50 µL de solução contendo acetonitrila 60 % e ATF 1 % em água Milli-Q (v/v), com agitação breve em vórtex e incubação a temperatura ambiente durante 10 min em agitação vertical. Os peptídeos trípticos foram extraídos novamente dos pedaços de gel, com repetição do processo. Todo o volume contendo os peptídeos digeridos por tripsina foi congelado a -70 °C e concentrado por liofilização em concentrador a vácuo Centrivap (Labconco). Os peptídeos liofilizados foram resuspendidos em 50 µL de água Milli-Q, congelados e liofilizados novamente antes da análise por MALDI-TOF.

#### 3.6.3 Ionização dos Peptídeos Obtidos Após Digestão com Tripsina

Os peptídeos trípticos liofilizados, provenientes da digestão com tripsina, foram resuspendidos com 5 µL de solução de acetonitrila 50 % e ATF 0,1 % em água Milli-Q (v/v). A matriz para ionização utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidróxicinâmico (10 mg/mL) (Sigma) em solvente acetonitrila 70 % e ATF 0,1 % em água MilliQ (v/v). Após misturar com a matriz na proporção 1:1 (v/v), foram aplicados 2 µL por poço da placa, com secagem ao ar e subsequente ionização e análise por MALDI-TOF. Os espectros de massas foram adquiridos com feixe pulsado de laser, após 2000 disparos. Para a ionização em modo refletor empregaram-se as voltagens primária da fonte de 25 kV, secundária da fonte de 22,4 kV, lentes de 8,5 kV, primária do refletor de 26,5 kV e secundária do refletor de 13,46 kV. O calibrante utilizado foi o conjunto de peptídeos de soroalbumina bovina após digestão com

tripsina (Bruker Daltonics), que contém padrões de massa desde 927,493 a 2045,028 Da.

#### 3.7 Efeito do pH e da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Enzima

O pH ótimo foi determinado incubando a enzima (bruta e purificada) a 55 °C usando tampão citrato-fosfato, com variação de pH de 3,0 a 8,0. A temperatura ótima foi avaliada incubando a mistura de reação em diferentes temperaturas, de 40 a 80 °C, em tampão de pH 5,0.

A estabilidade térmica foi determinada incubando a enzima nas temperaturas 40, 45, 50 e 55 °C, com tampão citrato-fosfato pH 5,0 por diferentes intervalos de tempo (0 a 4 horas); a atividade residual foi mensurada como descrito no item 3.3. A estabilidade ao pH, foi avaliada pela atividade residual depois de incubar a enzima em tampão citrato-fosfato com pH no intervalo de 3,0 a 8,0, com 0,5 unidades de intervalo de 4 a 24 h.

#### 3.8 Efeito de Íons na Atividade Enzimática

A atividade residual da xilanase purificada foi avaliada na presença dos íons Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, K<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, NH<sup>4+</sup> e Zn<sup>2+</sup> nas concentrações de 1 e 5 mM, nas condições estabelecidas no item 3.3.

#### 3.9 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os produtos da hidrólise da xilana de birchwood (Sigma) foram analisados por CCD em sílica. A xilanase purificada foi adicionada a uma solução de 1 % de xilana em tampão citrato-fosfato (pH 5,0) incubado a 55 °C, os produtos de hidrólise foram analisados em 30 e 60 min de reação. O sistema de solvente foi constituído de acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (9:3:1:4) por volume. A cromatografia foi revelada com orcinol 0,2 % em ácido sulfúrico/metanol (1:9), seguido de incubação em estufa a 110 °C até o aparecimento das bandas. Como padrão foi usado xilose (5 mg/ml).

#### 3.10 Imobilização Enzimática

# 3.10.1 Otimização das Concentrações de Alginato de Sódio e Cloreto de Cálcio para a Imobilização da Xilanase

Diferentes concentrações de alginato de sódio 0,5 - 4,0 % (p/v), variação de 0,5] foram testadas para a formação de pérolas com maior retenção da atividade enzimática. A formação das pérolas foi induzida por 0,1 M de uma solução aquosa de CaCl<sub>2</sub>.

O efeito da concentração de  $CaCl_2$  foi testado em presença de 2 % de alginato de sódio e com concentrações de  $CaCl_2$  variando de 0,1 - 3,0 M (p/v).

#### 3.10.2 Imobilização da Xilanase de A. japonicus

A enzima purificada (10,47 U/mL) foi imobilizada utilizando uma solução de 2 % de alginato de sódio na proporção de (1:1). A mistura foi gotejada, com o auxílio de uma seringa, em uma solução de 0,1 M de cloreto de cálcio sob agitação promovida por agitador magnético. Em seguida, as pérolas formadas foram mantidas por 2 h sob agitação constante. Após esse período as pérolas foram filtradas a vácuo em papel filtro, lavadas com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) para a remoção do remanescente de enzima não imobilizado e deixadas em temperatura ambiente por 15 min. As pérolas foram então estocadas em geladeira até o momento de uso.

#### 3.10.3 Reuso da Xilanase Imobilizada

Para o teste de capacidade de reutilização da enzima imobilizada em Caalginato, as pérolas foram usadas diversas vezes na reação de hidrólise da xilana. Cada reação teve duração de 30 min a 55 °C. Ao fim de cada ciclo as pérolas foram filtradas e o filtrado foi utilizado para determinação do açúcar redutor. As pérolas recuperadas foram lavadas com água destilada e estocadas em geladeira até o próximo uso. Para o ciclo seguinte a atividade enzimática foi medida através de um novo meio reacional, conforme item 3.3. A atividade das pérolas no primeiro ciclo foi definida como 100 %.

#### 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

#### 4.1 Produção de Xilanase em Meio Líquido

Após o crescimento dos fungos e quantificação da produção enzimática em meio líquido, a maior produção xilanolítica foi observada em *A. flavus* e *A. japonicus* (tabela 1).

FUNGO	U/ml
A. flavus	106,4
A. japonicus	105,3
A. niger	78,9
A. terreus <sub>31</sub>	75,1
A. terreus <sub>43</sub>	39,6

#### Tabela 1: Produção xilanolítica em condição submersa.

Fungos crescidos em meio líquido, durante 120 h, sob agitação a 30 °C, usando farelo de trigo como fonte de carbono. A atividade enzimática foi feita de acordo com item 3.3.

#### 4.2 Purificação da Xilanase Extracelular Produzida por *A. japonicus*

A purificação de xilanases é necessária para estudos bioquímicos e moleculares detalhados e para a determinação da sequência primária e estruturas tridimensionais das proteínas. Muitas aplicações industriais também exigem um alto nível de pureza. Uma purificação bem sucedida proporciona alto rendimento da enzima desejada com máxima atividade catalítica e alto índice de pureza usando o menor número de passos de purificação. Xilanases microbianas são purificadas, principalmente, por métodos de cromatografia, com 2 ou 5 passos e com rendimentos de 0,2 a 78 % (Subramaniyan e Prema, 2002; Sá-Pereira *et al.*, 2003; Said e Pietro, 2004; Bajpai, 2014).

Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório demonstraram que *A. japonicus* teve melhor purificação e rendimento quando comparado com os outros

fungos filamentosos. A xilanase de *A. japonicus* apresentou rendimento de 83,3 e purificação de 38,9 vezes após coluna de troca iônica (CM-celulose) (tabela 2).

		Unidade	Proteína			
Purificação	V (mL)	total	(mg)	AE	%	Ρ
Controle	300	2700,0	234,0	11,5	100	1
CM-Celulose	300	2250,0	5,0	448,8	83,3	38,9

Tabela 2: Purificação da xilanase extracelular de A. japonicus.

AE: atividade específica (U/mg); % : rendimento; P: índice de purificação.

Diversas xilanases produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* foram purificadas: xilanase de *Aspergillus fumigatus* MA28 usando sulfato de amônio e CM-celulose, com rendimento de 8,8 % e purificação de 38,5 vezes (Bajaj e Abbass, 2011); de *A. niger* DFR-5 usando Sephadex G-100 e DEAE-Celulose, com rendimento de 38,9 % e de purificação de 36,97 vezes (Pal e Khanum, 2011), de *A. terreus* usando ultrafiltração (sistema Amicon), Sephadex G-50 e DEAE-Sephacel, com 74,7 % de rendimento e 6,2 de purificação (De Souza Moreira *et al.*, 2013) e uma xilanase de *A. terreus* usando apenas um passo de CM-celulose, como o encontrado nesse trabalho, com 45 vezes de purificação e 67 % de rendimento (Sorgatto *et al*, 2012)

Tendo como base os resultados da purificação, os experimentos seguintes foram conduzidos utilizando a enzima produzida pelo fungo *A. japonicus.* 

#### 4.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A enzima purificada apareceu com uma única banda em SDS-PAGE corada com prata (Kit Sigma) e, em PAGE corada com Azul de Comassie (Figura 2), evidenciando o grau de purificação da amostra testada. A banda encontrada foi referente a uma proteína de aproximadamente 32 kDa.



**Figura 2**: Eletroforese em gel de poliacrilamida da xilanase purificada de *A. japonicus*. **(A)**; PAGE 4.3 (6 %) com 30 µg da proteína **(B)** SDS-PAGE (12 %) com 17 µg da proteína

Xilanases produzidas por microrganismos aparecem na literatura tendo uma massa molecular dentro de um faixa de 11 a 85 kDa (Mander *et al.*, 2014).

Massas semelhantes foram encontradas para a xilanase de *Aspergillus usamii* (32,7 kDa) (Wang *et al.*, 2011), *Aspergillus ochraceus* (32 kDa) (Michelin *et al.*, 2014), *Aspergillus niger* DFR-5 (32 kDa) (Pal e Khanum, 2011), *Aspergillus awamori* (32,87 kDa) (Teixeira *et al.*, 2010), *Aspergillus versicolor* (32 kDa) (Carmona *et al.*, 2005) e *Aspergillus niveus* (31 kDa) (Damásio *et al.*, 2011).

#### 4.4 Espectrometria de Massas

Das técnicas analíticas existentes a espectrometria de massas é uma das mais precisas (Cunha *et al.*, 2006). A análise do espectro de massas MALDI-TOF, corrobora o encontrado no gel de poliacrilamida, revelando uma massa de 32,6 kDa (Figura 3).



**Figura 3**: Espectrometria de massas MALDI-TOF da fração cromatográfica após troca iônica em CM-celulose. A ionização foi feita com a matriz superDHB e intensidade de laser entre 50 e 55 %. Os espectros foram adquiridos na faixa de massas entre 830 e 50000 Da, com o modo linear positivo e calibração externa. O gráfico expressa as razões de massa/carga (m/z) e as intensidades (a.u. - unidade arbitrária) dos íons, tendo sido detectado um íon de m/z=32639,6, na forma monocarregada (M+H)<sup>+</sup> e com dupla carga positiva (M+2H)<sup>+2</sup>.

A análise do espectro de massas dos peptídeos trípticos foi realizada para confirmar a identificação proteica da enzima purificada. A banda única encontrada no gel SDS-PAGE foi excisada manualmente, descorada e tratada a partir do protocolo de digestão tríptica em gel. O espectro de massas dos peptídeos trípticos foram então visualizado e analisado com MASCOT em banco de dados de proteínas (Matrix Science). A análise do espectro de massas da digestão com tripsina da banda encontrada em SDS-PAGE (Figura 4) frente ao banco de dados, revelou identidade significante com apenas duas sequências, sendo estas duas xilanases de *Aspergillus aculeatus*.

As duas sequências identificadas na análise de mapas trípticos pertenciam à família GH10, sendo ambas endo-xilanases. A sequência depositada no banco

UniProtKB/Swiss-Prot, com o acesso O59859.1, teve cobertura de 71 %, enquanto que para a do banco GenBank, com o acesso ALI87002.1, a cobertura foi de 60 %, indicando altos níveis de similaridade com as sequências obtidas a partir da xilanase purificada de *A. japonicus*, sugerindo que esta enzima seja classificada como GH10.



**Figura 4:** Espectro de massas dos peptídeos trípticos da xilanase de *A. japonicus*. A banda foi excisada do gel, digerida com tripsina de pâncreas de porco e os peptídeos analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF. A lista de massas e intensidades dos íons desse espectro foi submetida ao banco de dados MASCOT, com auxílio do programa computacional Biotools v.3.1 (Bruker Daltonics).

Ao alinharmos a sequência de aminoácidos da proteína de *A. japonicus*, encontrada nesse estudo, e as duas sequências relatadas acima (acesso O59859.1 e ALI87002.1) (figura 5), observamos grande similaridade dessas enzimas na sequência de aminoácidos da cadeia da proteína e na sequência do domínio catalítico, que é indicado como pertencente a enzimas da família GH10, o que reforça a hipótese de que a enzima de *A. japonicus* pertença a essa família.

Xyn AJ	KYLGTIGDQYTLNKNAKTPA	20
059859	mvqikaaalavlfasnvlanPIEPRQASVSIDAKFKAHGKKYLGTIGDQYTLNKNAKTPA	60
A0A0P0C6S3	mvqikaaalavlfasnvlsn <u>PIEPRQ</u> ASVSIDAKFKAHGKKYLGTIGDQYTLNKNAKTPA	60
	***********	
Xyn AJ	IIKADFGQLTPENSMKWDATEPNRGQFSFSGSDYLVNFAQSNGKXXXGHTLVWHSQLPSW	80
059859	<b>IIKADFGQLTPENSMKWDATEPNRGQFSFSGSDYLVNFAQSNGKLIRGHTLVWHSQLPSW</b>	120
A0A0P0C6S3	IIKADFGQLTPENSMKWDATEPNRGQFSFSGSDYLVNFAQSNGKLIRGHTLVWHSQLPSW	120
	***************************************	
Xyn AJ	VQSIYDKGTLIQVMQNHIATVMQRXXXXVYAWDVVNEIFNEDGSLRQSHFYNVIGEDYVR	140
059859	VQSIYDKGTLIQVMQNHIATVMQRYKGKVYAWDVVNEIFNEDGSLRQSHFYNVIGEDYVR	180
A0A0P0C653	VQSISDKNTLIQVMQNHITTVMQRYKGKVYAWDVVNEIFNEDGSLRQSHFYNVIGEDYVR	180
	**** ** *******************************	
Xyn AJ	IAFETARXXXXXXLYINDYNLDSASYPKLTGLVNHVKKWVAAGVPIDGIGSQTHLSAGA	200
059859	IAFETARAVDPNAKLYINDYNLDSASYPKLTGLVNHVKKWVAAGVPIDGIGSQTHLSAGA	240
A0A0P0C6S3	IAFETARAVDPNAKLYINDYNLDSASYPKLTGLVNHVKKWVAAGVPIDGIGSQTHLSAGA	240
	******	
Xyn AJ	GAAVSGALNALAGAGTKEVAITELDIAGASSTDYVNVVKXXXXXXCVGITVWGVADPDS	260
059859	GAAVSGALNALAGAGTKEVAITELDIAGASSTDYVNVVKACLNQPKCVGITVWGVADPDS	300
A0A0P0C653	GAAVSGALNALAGAGTKEVAITELDIAGASSTDYVNVVKACLNOPKCVGITVWGVADPDS	300
	*******	
Xyn AJ	WRSSSSPLLFDSNYNPK 277	
059859	WRSSSSPLLFDSNYNPKAAYTAIANAL 327	
A0A0P0C653	WRSSSSPLLFDSNYNPKAAYTAIANAL 327	
	******	

**Figura 5:** Alinhamento das sequências de duas xilanases da família GH10 de *A. aculeatus* e a sequência da xilanase de *A. japonicus.* Sequências analisadas pelo programa Clustel Omega. Letras minúsculas: peptídeo sinal; Letras maiúsculas sublinhadas: protopeptídeo; Área sombreada: domínio da família GH10; Retângulos ligados: ponte dissulfeto; Os asteriscos mostram os aminoácidos similares entre as três sequências.

Vale ressaltar ainda, que a sequência de aminoácidos referente a regiões de peptídeo sinal, protopeptídeo e região entre pontes dissulfeto das duas sequências do banco de dados não encontraram similaridade com sequências da xilanase desse trabalho. No entanto, sabe-se que os fungos filamentosos podem produzir uma multiplicidade de xilanases (Rizzatti *et al.*, 2004) que podem diferir por modificações pós-traducionais como clivagem proteolítica e glicosilação, pela presença de peptidio sinal ou mesmo proteólise parcial. Sendo essa multiplicidade, provavelmente uma resposta adaptativa dos microrganismos para otimizar os processos de biodegradação do material lignocelulósico (Paës *et al.*, 2012).

O sequenciamento parcial da região amino-terminal da xilanase purificada rendeu uma sequência, FHDKYTJNKNAKXXAXXQADF, de 21 aminoácidos, com erro de 0,5 Da (Figura 6).



**Figura 6:** Espectrometria de massas MALDI-TOF com ISD para análise de fragmentos da xilanase de *A. japonicus*. A ionização foi feita com a matriz superDHB e laser de intensidade entre 80 e 95 %, com aquisição de 3000 espectros na faixa de massas entre 1400 e 4800 Da.

A análise por BLASTP frente aos bancos de dados disponíveis revelou 63 % de identidade com a sequência DQYTINKNAKTPAIIQADF das mesmas xilanases de *A. aculeatus* (acessos O59859.1 e ALI87002.1) identificadas na análise de peptídeos trípticos. As 18 sequências de maior similaridade encontradas são de xilanases de diferentes fungos, principalmente do gênero *Aspergillus*, e seu alinhamento com a sequência da xilanase de *A. japonicus* (em estudo) indica que o trecho DQYTINKNAKTPAIIQADF é conservado. Devido à resolução do espectro obtido (Figura 6) ser menor do que a necessária para distinguir os resíduos glutamina (Q) ou lisina (K), não é possível afirmar que o 4º resíduo da sequência da xilanase de *A. japonicus* identificado como K seja de fato uma substituição do resíduo Q, que é observada nessa posição em todas as sequências de xilanases aqui analisadas. Já os resíduos de isoleucina (I) e leucina (L) não podem ser distinguidos pela fragmentação obtida no experimento realizado, assim o 7º resíduo está indicado pela letra J. Por sua vez, as massas de 198,42 e 225,94, correspondem a dipeptídeos

grafados com X por não terem sido identificados. No entanto, o valor de massa 198,42 é bastante próximo ao do dipeptídeo treonina (T) com prolina (P) (massa 198,22), enquanto que a massa 225,94 poderia corresponder ao dipeptídeo I com I (massa 226,32), o que, sendo verdadeiro, aumentaria a similaridade da sequência DKYTJNKNAKXXAXXQADF da proteína de *A. japonicus* com o mesmo trecho das xilanases para 89 % (17 em 19 resíduos).

Na literatura encontramos que o fungo *A. aculeatus* é um parente próximo do *A. japonicus*, sendo, muitas vezes, considerado uma variedade de *A. japonicus* (Hamari *et al.*, 1997). A distinção entre as espécies é dificultada por possuírem similaridades morfológicas, incluindo a coloração (preto), e por apresentarem elevado grau de polimorfismo do DNA mitocondrial (Pařenicová *et al.*, 2001). A partir da premissa que genes envolvidos na produção de xilanases podem refletir relações filogenéticas de táxons intimamente relacionados (Degefu, 2004), talvez seja esse, mais um motivo pelo qual a xilanase de *A. japonicus* tenha sido tão similar ás duas xilanases de *A. aculeatus*.

#### 4.5 Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Xilanase

O pH ótimo para a hidrólise da xilana é de, aproximadamente, 5,0 para a maioria das xilanases fúngicas, apesar de serem geralmente estáveis a um pH de 3,0 a 8,0 (Subramaniyan e Prema, 2002). No teste de influência ao pH na atividade xilanolítica da enzima de *A. japonicus,* encontramos que o pH ótimo de atividade obtido antes e após a purificação foi 5,0 (Figura 7).



**Figura 7:** Influência do pH na atividade xilanolítica. Atividade enzimática avaliada em intervalos de pH variando de 3,0 a 8,0, conforme item 3.3. **[A]** Enzima bruta, **[B]** purificada.

A enzima bruta apresentou pequena queda de atividade conforme o aumento gradual do pH após a atividade máxima, sendo mais elevada em pH 8,0 (68 %). Já a xilanase purificada, apresentou atividade nos pHs superiores a 4,0 e inferiores a 7,5. Várias xilanases também são encontradas na literatura apresentando pH ótimo entre 4,5 e 6,5 (Da Costa *et al.*, 2016; Damásio *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2016; Kocabaş *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015; Wakiyama *et al.*, 2010).

Em relação à temperatura, a enzima purificada apresentou um platô de atividade ótima a 50-60 °C, com queda brusca a 65 °C (22 %) (Figura 8B). De forma

semelhante, a enzima bruta apresentou pico de atividade em 55 °C, com variação na atividade de aproximadamente 5 % em 60 °C e 15 % a 50 °C em relação à temperatura ótima. A 65 °C apresentou 61 % de atividade (Figura 8A).



Figura 8: Influência da temperatura na atividade xilanolítica. A dosagem enzimática foi realizada com variação de 40 a 80 °C, conforme item 3.3. [A] Enzima bruta; [B] Enzima purificada.

Grande parte das xilanases fúngicas apresenta temperatura ótima a 50 °C (Subramaniyan e Prema, 2002; Nagar *et al.*, 2011; Nawel *et al.*, 2011; De Souza Moreira *et al.*, 2013; Comlekcioglu *et al.*, 2014; Fortkamp e Knob, 2014; Silva *et al.*, 2015). No entanto, platôs de temperatura ótima 50-55 °C também foram encontradas para duas xilanases de *Aspergillus caespitosus* purificadas por Sandrim *et al.* (2005).

#### 4.6 Estabilidade ao pH e à Temperatura da Xilanase Purificada

A estabilidade ao pH foi avaliada durante um período de até 24 h, em pHs de 3,0 a 8,0. O extrato bruto se mostrou estável em todos os pHs testados, exceto em pH 3,0 (Figura 9A). Em pH 3,0 a enzima perdeu 20 % da atividade na primeira hora de ensaio chegando a uma queda de 60 % em aproximadamente 4 h.

A enzima purificada também apresentou grande estabilidade a variação de pHs, mantendo 70-80 % da atividade inicial em uma 1 h de experimento, no intervalo de pH de 5,0-8,0, e manteve a atividade enzimática praticamente inalterada até as 24 h de ensaio. Em pH 3,0 e 4,0, a enzima apresentou uma queda de 75 e 60 % da atividade após 4h de incubação, respectivamente (Figura 9B).

Estudos mostram que a maioria dos extratos brutos de xilanases fúngicas são estáveis em um amplo intervalo de pHs. Fang *et al.* (2007) sugere que essa estabilidade seria promovida por outra proteína extracelular, que associada à xilanase funcionaria como protetora contra a desnaturação pelo efeito do pH. No entanto, é possível observar que existe grande semelhança na estabilidade ao pH da enzima purificada e da enzima bruta neste trabalho.

Na literatura observa-se que as xilanases são bastante resistentes à variação do pH. A Xilanase de *A. flavus* não apresentou alteração na atividade no intervalo de pH 3,0-8,0 durante 1h de ensaio (Silva *et al.*, 2015), *Caldicellulosiruptor bescii* foi estável no intervalo de pH 4,0-12,0 (An *et al.*, 2015). Já a enzima de *Streptomyces* sp. CS624 manteve mais de 70 % da atividade com variação no pH de 5,0-10,0 (Mander *et al.*, 2014) enquanto a de *A. japonicus* reteve 80 % da atividade na faixa de pH 2,0-9,0 durante 3 h de incubação (Wakiyama *et al.*, 2010).



**Figura 9:** Efeito da variação de pH na estabilidade da xilanase de *A. japonicus* O teste de estabilidade foi conduzido durante um período de até 24 h. Atividade enzimática avaliada conforme item 3.3. **[A]** Enzima bruta; **[B]** Enzima purificada. (■) pH 3,0; (●) pH 4,0; (▲) pH 5,0; (▼) pH 6,0; (●) pH 7,0; (◀) pH 8,0.

Nos testes de termoestabilidade, a enzima bruta se mostrou estável nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C, em todo o período de incubação. A 55 °C, a enzima apresentou meia vida de aproximadamente 20 min (Figura 10A). Já a xilanase purificada, em 40 e 45 °C foi estável durante 240 min (4 h) do teste, apresentando meia-vida a 50 e 55 °C de 120 (2 h) e 60 min (1 h), respectivamente (Figura 10B).



**Figura 10:** Efeito da temperatura na estabilidade da xilanase. A enzima foi incubada nas temperaturas de 40 a 55 °C e alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática conforme o item 3.3. [**A**] Enzima Bruta e [**B**] Purificada; (**■**) 40 °C; (**●**) 45 °C; (**▲**) 50 °C; (**▼**) 55 °C.

Os resultados relatados para xilanase (xyl 1) purificada de *A. ochraceus* foram semelhantes ao que encontramos para enzima bruta nesse trabalho, estável a 55 °C por 20 min (Michelin *et al.*, 2014) Resultados inferiores ao da enzima bruta foram encontrados para a xilanase bruta de *A. flavus*, apresentando meia vida de 50 min a 50 °C e de aproximadamente 15 min a 55 °C (Silva *et al.*, 2015). Inferior ao encontrado para a xilanase purificada deste trabalho, Facchini *et al.* (2011) relata

uma xilanase purificada de *A. japonicus* termotolerante apenas nas temperaturas de 30-40 °C com retenção de 99 % da atividade por 2 h.

#### 4.7 Efeito de Íons Metálicos na Atividade da Xilanase Purificada

De acordo com Guengerich (2016), cerca de 40 % das enzimas cristalografadas possuem metais como parte da sua estrutura. A interação desses metais com resíduos de aminoácidos presente no seu sítio ativo das enzimas podem aumentar ou diminuir a atividade catalítica.

A maioria dos íons metálicos, em concentração de 1 mM, apresentou pequena influência na atividade da enzima. No entanto, o íon Mn<sup>2+</sup> mostrou, aproximadamente 35 % e 23 % de ativação enzimática nas concentrações 1 e 5 mM, respectivamente (Tabela 3). Já o íon Cu<sup>2+</sup> inibiu fortemente a atividade enzimática na concentração de 5 mM (57 %).

Em estudos com *Penicillium sclerotium* (Knob e Carmona, 2010), *Aspergillus versicolor* (Carmona *et al.*, 2005), *Aspergillus giganteus* (Fialho e Carmona, 2004) e *A. terreus* (Sorgatto *et al.*, 2012), o íon  $Cu^{2+}$  também inibiu a atividade da enzima. Esse íon tem conhecido efeito na auto-oxidação de cisteínas, o que leva à formação de pontes de dissulfeto intramoleculares e intermoleculares. O efeito inibitório do  $Cu^{2+}$  pode ser explicado pela presença de um grupo sulfidril no centro catalítico das enzimas (Fortkamp e Knob, 2014).

Semelhante ao encontrado nesse trabalho, a xilanase produzida por *Jonesia denitrificans* não sofreu grande influência pelos íons testados, sendo apenas fracamente ativada (10 %) pelo íon Mn<sup>2+</sup> (Nawel *et al.*, 2011). Este mesmo autor supõe que esse íon interaja com resíduos de aminoácido do sítio ativo, promovendo uma alteração na conformação que resulta em uma maior atividade enzimática. Ativação por Mn<sup>2+</sup> também foi reportado para a xilanase de *Humicola isolens* expressa em *Pichia pastoris* (30 %) (Du *et al.*, 2013) e para três xilanases purificadas de *A. ochraceus*, xyl 1 e xyl 2, em concentração de 5 mM de Mn<sup>2+</sup> apresentaram aumento de 61 e 78 % na atividade, respectivamente, e xyl 3, com 1 mM apresentou 56 % de ativação (Michelin *et al.*, 2014).

	Atividade Relativa (%)		
	1 mM	5 mM	
Controle	100,0 ± 0,012	100,0 ± 0,060	
NH₄CI	106,0 ± 4,921	90,8 ± 1,152	
CuSO <sub>4</sub>	92,3 ± 2,093	43,1 ± 4.230	
MgSO <sub>4</sub>	104,2 ± 0,106	77,3 ± 7,191	
FeSO <sub>4</sub>	99,6 ± 3,450	81,8 ± 7,035	
KCI	99,8 ± 5,126	83,0 ± 1,937	
$CaCl_2$	103,0 ± 3,867	83,3 ± 1,730	
CoCl <sub>2</sub>	105,6 ± 0,523	70,0 ± 7,785	
ZnCl <sub>2</sub>	116,3 ± 1,361	86,8 ± 1,084	
MnCl <sub>2</sub>	134,5 ± 0,417	122,7 ± 3,288	
BaCl <sub>2</sub>	109,0 ± 1,463	90,2 ± 2,701	

Tabela 3: Efeito de íons na atividade da xilanase de *A. japonicus*.

Controle: sem adição de íons.

#### 4.8 CCD

Os produtos resultantes da quebra da xilana de birchwood pela xilanase purificada foram analisados por CCD (Figura 11). Os produtos obtidos a partir da hidrólise da xilanase foram XOS de vários comprimentos. Dessa forma, a enzima exibiu atividade de  $\beta$ -1,4-endo-xilanase e sugere bom potencial na produção de XOS. Uma xilanase de *A. japonicus* relatada por Wakiyama *et al.* (2010) apresentou o mesmo padrão de hidrólise encontrado para a xilanase dessa pesquisa, liberou XOS de vários comprimentos, principalmente, xilobiose e xilotriose e em menor quantidade xilose, sendo esta última, provavelmente, produto da clivagem da xilotriose, que libera xilobiose e xilose.



**Figura 11:** Análise por CCD dos produtos de hidrólise da xilanase produzida por *A. japonicus*. Padrão: xilose 5 mg/mL; A enzima foi incubada com 1 % de xilana e nos tempos 0' (zero), 30' e 60' (min), alíquotas foram retiradas e os produtos foram analisados em CCD.

XOS, especialmente xilobiose, estimulam o crescimento de bifidobactérias intestinais (Du *et al.*, 2013) que são associadas a diversos benefícios à saúde como, redução do colesterol no sangue, redução de riscos de câncer no cólon e aumento na absorção de minerais. A produção enzimática de XOS é uma estratégia alternativa promissora comparada com o uso de processos químicos, devido à fácil produção desses compostos, de forma altamente pura e com o mínimo de produtos indesejáveis (Rashad *et al.*, 2016).

#### 4.9 Imobilização da Enzima em Alginato de Cálcio

Com a finalidade de melhorar as características catalíticas e possibilitar o reuso, a enzima foi imobilizada utilizando alginato.

## 4.9.1 Otimização de Alginato de Sódio e Cloreto de Cálcio para a Imobilização da Enzima

Diferentes concentrações de alginato foram testadas, sendo a concentração de 2,0 % a que promoveu maior atividade (Figura 12).

Diferentes trabalhos relatam que a faixa de concentração de alginato de sódio entre 2,0 e 3,0 % foi adequado para a imobilização de enzimas como, xilanases (Pal *et al.*, 2006; Khandeparker e Numan, 2008), lacase (Phetson *et al.*, 2009) e celulases (Viet *et al.*, 2013; Andriani *et al.*, 2012).

Bibi *et al.* (2015) propõem que baixas concentrações de alginato de sódio produzam pérolas frágeis com poros grandes, e isso pode provocar o extravasamento da enzima para o meio externo às pérolas, enquanto altas concentrações podem levar a baixa penetração de grandes moléculas de substrato no interior das pérolas, impedindo a formação do produto.



**Figura 12:** Efeito da concentração de alginato na atividade da xilanase imobilizada. A concentração de alginato variou de 0,5-4,0 % (p/v) em 0,1 M de CaCl<sub>2</sub>. Os testes foram realizados em triplicata com média e desvio padrão.

Diferentes concentrações de cloreto de cálcio também foram testadas a fim de conseguir pérolas mais estáveis e capazes de reter alta atividade enzimática. Na figura 13 é possível observar que a maior atividade foi alcançada com 0,1 M de cloreto de cálcio e concentrações superiores promoveram a diminuição na atividade

enzimática. Para a imobilização da xilanase de *Geobacillus stearothermophilus* a concentração ótima para a imobilização foi 0,4 M de CaCl<sub>2</sub> (Bibi *et al.*, 2015). Para a lacase de *Lentinus polychrous* Lev. a concentração de 0,05 M foi a que promoveu melhor porcentagem de imobilização e atividade enzimática (Phetsom *et al.*, 2009) e para a protease de *Myceliophthora* sp. foi 0,08 M (Zanphorlin *et al.*, 2010).



**Figura 13:** Efeito de diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> na imobilização enzimática. Foram usadas concentrações variando de 0,1-3,0 % (p/v) de cloreto de cálcio para a formação das pérolas, usando 2 % de alginato de sódio contendo a xilanase purificada. As dosagens foram feitas segundo item 3.3.

#### 4.9.2 Reuso da xilanase imobilizada

A capacidade de reuso da enzima imobilizada é um critério muito importante para testar a sua aplicabilidade na indústria e uma excelente vantagem do processo de imobilização. A xilanase imobilizada em alginato de cálcio foi reutilizada por 5 ciclos. A enzima manteve mais de 50 % da atividade enzimática nos dois primeiros ciclos e aproximadamente 23 % de atividade residual nos ciclos posteriores (Figura 14).

Na literatura encontramos diversas enzimas imobilizadas em alginato de cálcio com diferentes capacidades de reuso: 7 ciclos foram possíveis para protease de *Myceliophthora* sp, mantendo mais de 50 % da sua atividade (Zanphorlin *et al.*, 2010), e para a amilase de *Bacillus circulans* GRS 313, com retenção de 85 % da atividade no último ciclo (Dey *et al.*, 2003); a reutilização por 3 vezes foi promovida

pela imobilização de uma protease (35 %) isolada de *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS (Anwar *et al.*, 2009) e uma lipase (56 %) de *Penicillium chrysogenum* SNP5 (Kumar *et al.*, 2014).



**Figura 14:** Reuso da xilanase de *A. japonicus* imobilizada em alginato. Condições de imobilização: 0,1 M CaCl<sub>2</sub> e 2 % de alginato. A dosagem da atividade enzimática foi realizada segundo item 3.3.

Neste estudo, a redução da atividade enzimática a cada ciclo de reação pode ter sido influenciada pelos passos de lavagem entre os sucessivos ciclos de reação, que podem ter permitido a lixiviação da enzima do interior das pérolas, resultando na diminuição da atividade (Bibi *et al.*, 2015). Outro fator que pode ter influenciado foi o uso do tampão citrato-fosfato na reação de hidrólise, já que segundo Gombotz e Wee (2012), a utilização de um quelante, como por exemplo, o citrato e o fosfato, promoveria a remoção dos íons cálcio levando a degradação do gel de alginato, uma vez que a ligação cruzada no gel diminui. Isso promoveria o vazamento da enzima retida e a solubilização de polímeros do alginato de elevado peso molecular.

#### 5 CONCLUSÃO

Dos 5 fungos testados, a enzima produzida por A. japonicus se destacou, pois além de alto rendimento, também alcançou uma eficiente purificação. O processo de purificação foi obtido através de um único passo de cromatografia, reduzindo assim o custo e o tempo para obtenção da enzima pura. A análise dos peptídeos trípticos e da sequência amino-terminal sugerem fortemente que a xilanase de A. japonicus é um novo membro da família 10 das glicosil hidrolases. E juntamente com os resultados de hidrólise, vimos que a xilanase de A. japonicus é uma endo-xilanase. A partir da caracterização bioquímica da enzima, observamos que a enzima bruta e a purificada se comportam de maneira distinta, apresentado, porém, valores semelhantes de pH e temperatura ótima e estabilidade em pH básico e temperatura de 40 °C e 45 °C. Além disso, a imobilização da xilanase purificada em alginato de cálcio, que é reconhecido como um método rápido, não tóxico, barato e versátil para a imobilização de enzimas, permitiu a recuperação e a reutilização da enzima, mostrando que essa é uma alternativa para a utilização de endo-xilanases na indústria de biotecnologia. Testes futuros utilizando outro tampão na reação ou mesmo experimentos com outros íons podem vir a melhorar as características da imobilização da xilanase de A. japonicus em alginato.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALCÂNTARA, L. A. P. Imobilização de lipase em criogel supermacroporoso para a síntese de lipídios estruturados. 2013. 92 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2013.

ANDRIANI, D.; SUNWOO, C.; RYU, H.-W.; PRASETYA, B.; PARK, D.-H. Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2012. ISSN 1615-7605.

AN, J.; XIE, Y.; ZHANG, Y.; TIAN, D.; WANG, S.; YANG, G.; FENG, Y. Characterization of a thermostable, specific GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii* with high catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 117, p. 13-20, 2015. ISSN 1381-1177.

ANWAR, A.; QADER, S. A. U.; RAIZ, A.; IQBAL, S.; AZHAR, A. Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 10, p. 1281-1286, 2009. ISSN 1818-4952.

ARAGON, C. C. **Imobilização multipontual covalente de xilanases: seleção de derivados ativos e estabilizados**. 2013. 116 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

ARAGON, C. C.; MATEO, C.; RUIZ-MATUTE, A. I.; CORZO, N.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; SEVILLANO, L.; DÍAZ, M.; MONTI, R.; SANTAMARÍA, R. I.; GUISAN, J. M. Production of xylo-oligosaccharides by immobilized-stabilized derivatives of endo-xylanase from *Streptomyces halstedii*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 478-483, 2013. ISSN 1359-5113.

ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 101, p. 56-66, 2014. ISSN 1381-1177.

BAJAJ, B. K.; ABBASS, M. Studies on an alkali-thermostable xylanase from *Aspergillus fumigatus* MA28. **3 Biotech,** v. 1, n. 3, p. 161-71, 2011.

BAJPAI, P. Xylanolytic Enzymes. Elsevier Science, 2014. ISBN 9780128010662.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 326-338, 2001. ISSN 1432-0614.

BELIËN, T.; VAN CAMPENHOUT, S.; ROBBEN, J.; VOLCKAERT, G. Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? **Molecular Plant-Microbe Interactions,** v. 19, n. 10, p. 1072-1081, 2006. ISSN 0894-0282.

BETINI, J.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.; JORGE, J.; TERENZI, H.; POLIZELI, M. Xylanases from *Aspergillus niger, Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and biosystems engineering,** v. 32, n. 6, p. 819-824, 2009. ISSN 1615-7591.

BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X.-P.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R.-C. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 127, p. 236-241, 2013. ISSN 0960-8524.

BIBI, Z.; QADER, S. A. U.; AMAN, A. Calcium alginate matrix increases the stability and recycling capability of immobilized endo-β-1, 4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 819-827, 2015. ISSN 1431-0651.

CANTONE, S.; FERRARIO, V.; CORICI, L.; EBERT, C.; FATTOR, D.; SPIZZO, P.; GARDOSSI, L. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262-6276, 2013. ISSN 0306-0012.

CAO, L. Introduction: Immobilized enzymes: Past, present and prospects. **Carrier-bound immobilized enzymes: Principles, application and design**, p. 1-52, 2005. ISSN 3527607668.

CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, É. B.; COELHO, G. D.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. L. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 359-364, 2005. ISSN 1359-5113.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus e Penicillium*. Embrapa Informação Técnológica, 2003. ISBN 8573832207.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology,** v. 100, n. 6, p. 2567-2577, 2016. ISSN 0175-7598.

CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of chemical technology and biotechnology,** v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012. ISSN 1097-4660.

CHANDRASEKARAN, M. Enzymes in Food and Beverage Processing. CRC Press, 2015. ISBN 1482221306.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005. ISSN 1574-6976.

COMLEKCIOGLU, U.; TUTUS, A.; CICEKLER, M.; GUNES, M.; AYGAN, A. Application of recombinant xylanase from *Orpinomyces* sp. in elemental chlorinefree bleaching of kraft pulps. **Romanian Biotechnological Letters,** v. 19, n. 1, p. 8941-8950, 2014.

CULLETON, H.; MCKIE, V.; DE VRIES, R. P. Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from *Aspergillus*? **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 8, p. 884-894, 2013. ISSN 1860-7314.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. D. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento,** v. 36, p. 40-46, 2006.

DA COSTA, A. C.; SCALABRINI, R. P.; SILVESTRE, M. A.; RODRIGUES, A.; DA PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of xylanase by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: obtainment of enzymatic extract with reduced cellulolytic activity for application in pulp and paper industries= Produção de xilanase por nova linhagem de *Thermoascus aurantiacus*: obtenção de extrato enzimático com reduzida atividade celulolítica para aplicação em indústria de papel e celulose. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 4, 2016. ISSN 1981-3163.

DAMÁSIO, A. R. D. L.; SILVA, T. M.; ALMEIDA, F. B. D. R.; SQUINA, F. M.; RIBEIRO, D. A.; LEME, A. F. P.; SEGATO, F.; PRADE, R. A.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. D. L. T. M. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1236-1242, 2011. ISSN 1359-5113.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013. ISSN 2190-572X.

DE ALENCAR GUIMARAES, N. C.; SORGATTO, M.; DE CARVALHO PEIXOTO-NOGUEIRA, S.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; DE MORAES, M. D. L. T.; GIANNESI, G. C. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013. ISSN 2193-1801.

DEGEFU, Y.; LOHTANDER, K.; PAULIN, L. Expression patterns and phylogenetic analysis of two xylanase genes (htxyl1 and htxyl2) from *Helminthosporium turcicum*, the cause of northern leaf blight of maize. **Biochimie**, v. 86, n. 2, p. 83-90, 2004. ISSN 0300-9084.

DE SOUZA MOREIRA, L. R.; DE CARVALHO CAMPOS, M.; DE SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FERREIRA FILHO, E. X. Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: characterization

and influence of phenolic compounds on xylanase activity. Fungal Genetics and Biology, v. 60, p. 46-52, 2013. ISSN 1087-1845.

DEY, G.; BHUPINDER, S.; BANERJEE, R. Immobilization of alpha-amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** v. 46, n. 2, p. 167-176, 2003. ISSN 1516-8913.

DRISS, D.; ZOUARI-ELLOUZI, S.; CHAARI, F.; KALLEL, F.; GHAZALA, I.; BOUAZIZ, F.; CHAABOUNI, S. E. Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corncobs using immobilized *Penicillium occitanis* xylanase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 102, p. 146-153, 2014. ISSN 1381-1177.

DU, Y.; SHI, P.; HUANG, H.; ZHANG, X.; LUO, H.; WANG, Y.; YAO, B. Characterization of three novel thermophilic xylanases from Humicola insolens Y1 with application potentials in the brewing industry. **Bioresource technology**, v. 130, p. 161-167, 2013. ISSN 0960-8524.

**ExplorEnz – The enzyme database.** Disponível em: <a href="http://www.enzyme-database.org/query.php?name=xylanase">http://www.enzyme-database.org/query.php?name=xylanase</a>>. Acesso em: 08/06/2016.

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; REIS, R. A.; DE MORAES, M. D. L. T. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. **Bioprocess and biosystems engineering,** v. 34, n. 3, p. 347-355, 2011. ISSN 1615-7591.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; HSIEH, M. C.; FANG, T. J. Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 49, n. 1, p. 36-42, 2007. ISSN 1381-1177.

FIALHO, M. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*. **Folia Microbiologica**, v. 49, n. 1, p. 13-18, 2004. ISSN 1874-9356.

FORTKAMP, D.; KNOB, A. High xylanase production by *Trichoderma viride* using pineapple peel as substrate and its apllication in pulp biobleaching. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 22, 2014. ISSN 1684-5315.

**Glycoside Hydrolase family classification.** Disponível em: <a href="http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html">http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html</a>>. Acesso em: 01/06/2016.

GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods. CRC press, 2007. ISBN 142000851X.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced drug delivery reviews,** v. 64, p. 194-205, 2012. ISSN 0169-409X.

GOMES, A. F. S.; DOS SANTOS, B. S. L.; FRANCISCON, E. G.; BAFFI, M. A. Substract and temperature effect on xylanase production by *Aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes= Efeito da temperatura e do substrato na produção de xilanase por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 4, 2016. ISSN 1981-3163.

GUENGERICH, F. P. Metals in Biology 2016: Molecular Basis of Selection of Metals by Enzymes. **Journal of Biological Chemistry,** v. 291, n. 40, p. 20838-20839, 2016. ISSN 0021-9258.

GUIMARÃES, N.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.; BETINI, J.; ZANOELO, F.; MARQUES, M.; POLIZELI, M.; GIANNESI, G. Xylanase Production from *Aspergillus japonicus* var *aculeatus*: Production using Agroindustrial Residues and Biobleaching Effect on Pulp. Journal of Biocatalysis & Biotransformation, v. 2, 2013. ISSN 2324-9099.

HAMARI, Z.; KEVEI, F.; KOVÁCS, É.; VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J. H. Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 72, n. 4, p. 337-347, 1997. ISSN 0003-6072.

HARRIS, A. D.; RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, n. 7, 2010. ISSN 2218-1768.

JIANG, Z.; CONG, Q.; YAN, Q.; KUMAR, N.; DU, X. Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 457-462, 2010. ISSN 0308-8146.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1219-1227, 2012. ISSN 0734-9750.

KHANDEPARKER, R.; NUMAN, M. T. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of industrial microbiology & biotechnology,** v. 35, n. 7, p. 635-644, 2008. ISSN 1367-5435.

KHONZUE, P.; LAOTHANACHAREON, T.; RATTANAPHAN, N.; TINNASULANON, P.; APAWASIN, S.; PAEMANEE, A.; RUANGLEK, V.; TANAPONGPIPAT, S.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L. Optimization of xylanase production from *Aspergillus niger* for biobleaching of eucalyptus pulp. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry,** v. 75, n. 6, p. 1129-1134, 2011. ISSN 1347-6947.

KLICH, M. A. Indentification of common *Aspergillus* species. Amer Society for Microbiology, 116 p. 2002. ISBN 9070351463.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, n. 2, p. 429-43, Sep 2010. ISSN 0273-2289.

KOCABAŞ, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 115, p. 66-75, 2015. ISSN 1381-1177.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS microbiology reviews,** v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999. ISSN 1574-6976.

KUMAR, S.; YADAV, R. K.; NEGI, S. A comparative study of immobilized lipase produced from *Penicillium chrysogenum* SNP5 on two different anionic carriers for its pH and thermostability. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 301-305, 2014.

KUMAR, V.; MARÍN-NAVARRO, J.; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 32, n. 2, p. 1-10, 2016. ISSN 0959-3993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. ISSN 0028-0836.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. ISSN 0021-9258.

MANDER, P.; CHOI, Y. H.; PRADEEP, G.; CHOI, Y. S.; HONG, J. H.; CHO, S. S.; YOO, J. C. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 451-456, 2014. ISSN 1359-5113.

MCILVAINE, T. A buffer solution for colorimetric comparison. Journal of Biological Chemistry, v. 49, n. 1, p. 183-186, 1921. ISSN 0021-9258.

MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.; BETINI, J.; DA SILVA, T.; JORGE, J.; TERENZI, H.; POLIZELI, M. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 33, n. 7, p. 813-821, 2010. ISSN 1615-7591.

MICHELIN, M.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; MARIA DE LOURDES, T. Purification and biochemical properties of multiple xylanases from *Aspergillus ochraceus* tolerant to Hg<sup>2+</sup> ion and a wide range of pH. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 206-220, 2014. ISSN 0273-2289.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. ISSN 0003-2700.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis

techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment,** v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015. ISSN 1310-2818.

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. InTech, Rijeka, Croatia, 2013

NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; KUHAD, R. C.; GUPTA, V. K. Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. **New biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 581-587, 2011. ISSN 1871-6784.

NAWEL, B.; SAID, B.; ESTELLE, C.; HAKIM, H.; DUCHIRON, F. Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 519-525, 2011. ISSN 1359-5113.

NDOU, S. P.; KIARIE, E.; AGYEKUM, A. K.; HEO, J. M.; ROMERO, L. F.; ARENT, S.; LORENTSEN, R.; NYACHOTI, C. M. Comparative efficacy of xylanases on growth performance and digestibility in growing pigs fed wheat and wheat bran- or corn and corn DDGS-based diets supplemented with phytase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p. 230-239, 2015. ISSN 0377-8401.

OLIVEIRA, D.; TELIS-ROMERO, J.; DA-SILVA, R.; FRANCO, C. Effect of a *Thermoascus aurantiacus* thermostable enzyme cocktail on wheat bread qualitiy. **Food chemistry**, v. 143, p. 139-146, 2014. ISSN 0308-8146.

ØSTERGAARD, L. H.; OLSEN, H. S. Industrial applications of fungal enzymes. In: HOFRICHTER, M. (Ed.). **Industrial Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p.269-290. ISBN 3642114571.

PAËS, G.; BERRIN, J.-G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances,** v. 30, n. 3, p. 564-592, 2012. ISSN 0734-9750.

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. ISSN 1359-5113.

PAL, A.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Purification and immobilization of an *Aspergillus terreus* xylanase: Use of continuous fluidized bed column reactor. **Indian Journal of Biotechnology,** v. 5, n. 2, p. 163, 2006. ISSN 0972-5849.

PAŘENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; TEN HOOR-SUYKERBUYK, M.; VISSER, J. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 67, n. 2, p. 521-527, 2001. ISSN 0099-2240.

PHETSOM, J.; KHAMMUANG, S.; SUWANNAWONG, P.; SARNTHIMA, R. Copperalginate encapsulation of crude laccase from *Lentinus polychrous* Lev. and their effectiveness in synthetic dyes decolorizations. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 6, p. 573-583, 2009. ISSN 1727-3048.

POLIZELI, M.; RIZZATTI, A.; MONTI, R.; TERENZI, H.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology** and biotechnology, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005. ISSN 0175-7598.

POLIZELI, M. D. L. T. M.; RAI, M. Fungal Enzymes. CRC Press, 2013. ISBN 1466594543.

POLLET, A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. **Critical reviews in biotechnology,** v. 30, n. 3, p. 176-191, 2010. ISSN 0738-8551.

QING, Q.; WYMAN, C. E. Hydrolysis of different chain length xylooliogmers by cellulase and hemicellulase. **Bioresource Technology,** v. 102, n. 2, p. 1359-1366, 2011. ISSN 0960-8524.

QIU, J.; HAN, H.; SUN, B.; CHEN, L.; YU, C.; PENG, R.; YAO, Q. Residue mutations of xylanase in Aspergillus kawachii alter its optimum pH. **Microbiological research**, v. 182, p. 1-7, 2016. ISSN 0944-5013.

RAGHU, H.; RAJESHWARA, N. Immobilization of  $\alpha$ -Amylase (1, 4- $\alpha$ -D-Glucanglucanohydralase) by calcium alginate encapsulation. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 2, p. 869-871, 2015. ISSN 1985-4668.

RAHIM, S. N. A.; SULAIMAN, A.; HAMZAH, F.; HAMID, K. H. K.; RODHI, M. N. M.; MUSA, M.; EDAMA, N. A. Enzymes encapsulation within calcium alginate-clay beads: Characterization and application for cassava slurry saccharification. **Procedia Engineering**, v. 68, p. 411-417, 2013. ISSN 1877-7058.

RASHAD, M. M.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U.; MAHMOUD, H. A.; EL-TORKY, A. E.-D. M.; KESHTA, A. T. Production of antioxidant xylooligosaccharides from lignocellulosic materials using *Bacillus amyloliquifaciens* NRRL B-14393 xylanase. **Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol,** v. 6, n. 6, p. 30-36, 2016.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 7<sup>a</sup> ed., p. 277-312, 2007.

RIZZATTI, A.; JORGE, J.; TERENZI, H.; RECHIA, C.; POLIZELI, M. Purification and properties of a thermostable extracellular β-D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001. ISSN 1367-5435.

RIZZATTI, A. C.; SANDRIM, V. C.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; MARIA DE LOURDES, T. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes

of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 31, n. 2, p. 88-93, 2004. ISSN 1367-5435.

RIZZATTI, A. C. S.; FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A.; DE MORAES, M. D. L. T. Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. **Journal of industrial microbiology & biotechnology,** v. 35, n. 4, p. 237-244, 2008. ISSN 1367-5435.

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases. **Molecular Biotechnology,** v. 24, n. 3, p. 257-281, 2003. ISSN 1559-0305.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Legis Summa, 2004. ISBN 9788590437611. Disponível em: < https://books.google.com.br/books?id=WEaPAAAACAAJ >.

SANDRIM, V.; RIZZATTI, A.; TERENZI, H.; JORGE, J.; MILAGRES, A.; POLIZELI, M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry,** v. 40, n. 5, p. 1823-1828, 2005. ISSN 1359-5113.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 2012, 2012.

SELLE, P.; RAVINDRAN, V.; PARTRIDGE, G. Beneficial effects of xylanase and/or phytase inclusions on ileal amino acid digestibility, energy utilisation, mineral retention and growth performance in wheat-based broiler diets. **Animal feed science and technology,** v. 153, n. 3, p. 303-313, 2009. ISSN 0377-8401.

SHANKAR, S.; GUPTA, M.; GUPTA, V.; SHARMA, G.; TUOHY, M.; GAUR, R. Microbial xylanases: production, applications and challenges. **The handbook of microbial bioresources**, p. 313-330, 2016. ISSN 178064521X.

SILVA, L.; 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. ISSN 0717-3458.

SILVA, P. O.; GUIMARÃES, N. C. D. A.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. D. C.; BETINI, J. H.; MARCHETTI, C. R.; ZANOELO, F. F.; MORAES, M. D. L. T. D.; MARQUES, M. R.; GIANNESI, G. C. Production of cellulase-free xylanase by *Aspergillus flavus*: Effect of polyols on the thermostability and its application on cellulose pulp biobleaching. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 52, 2015. ISSN 1684-5315.

SINGH, S.; GOGOI, B. K.; BEZBARUAH, R. L. Calcium alginate as a support material for immobilization of L-amino acid oxidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. **IIOAB J**, v. 3, n. 5, p. 7-11, 2012.

SORGATTO, M.; GUIMARÃES, N.; ZANOELO, F.; MARQUES, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.; GIANNESI, G. Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 32, p. 8076-8084, 2012. ISSN 1684-5315.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002. ISSN 0738-8551.

TEIXEIRA, R. S. S.; SIQUEIRA, F. G.; DE SOUZA, M. V.; FERREIRA FILHO, E. X.; DA SILVA BON, E. P. Purification and characterization studies of a thermostable  $\beta$ -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1041-1051, 2010. ISSN 1367-5435.

TENG, C.; YAN, Q.; JIANG, Z.; FAN, G.; SHI, B. Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7679-7682, 2010. ISSN 0960-8524.

VALLS, C.; VIDAL, T.; RONCERO, M. B. The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. **Process biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 425-430, 2010. ISSN 1359-5113.

VIET, T. Q.; MINH, N. P.; DAO, D. T. A. Immobilization of cellulase enzyme in calcium alginate gel and its immobilizes stability. **American Journal of Research Communication**, v. 1, n. 12, p. 254-267, 2013.

WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. An extracellular endo-1, 4-β-xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 227-229, 2010. ISSN 1389-1723.

WANG, J.; ZHANG, H.; WU, M.; TANG, C. Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, Auxyn10A, from *Aspergillus usamii*. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 5, p. 1029-1038, 2011. ISSN 0141-5492.

WANG, X.; LUO, H.; YU, W.; MA, R.; YOU, S.; LIU, W.; HOU, L.; ZHENG, F.; XIE, X.; YAO, B. A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. **Food Chemistry**, v. 199, p. 516-523, 2016. ISSN 0308-8146.

WONG, K.; TAN, L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 3, p. 305, 1988.

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, p. 72-77, 2009. ISSN 1381-1177.

YEASMIN, S.; KIM, C. H.; PARK, H. J.; SHEIKH, M. I.; LEE, J. Y.; KIM, J. W.; BACK, K. K.; KIM, S. H. Cell Surface Display of Cellulase Activity–Free Xylanase Enzyme on *Saccharomyces Cerevisiae* EBY100. **Applied biochemistry and biotechnology,** v. 164, n. 3, p. 294-304, 2011. ISSN 0273-2289.

ZANPHORLIN, L. M.; FACCHINI, F. D. A.; VASCONCELOS, F.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 331-336, 2010. ISSN 1225-8873.

ZHENG, H.-C.; SUN, M.-Z.; MENG, L.-C.; PEI, H.-S.; ZHANG, X.-Q.; YAN, Z.; ZENG, W.-H.; ZHANG, J.-S.; HU, J.-R.; LU, F.-P. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. NF1 and its application in xylooligosaccharides production. **J. Microbiol. Biotechnol,** v. 24, n. 4, p. 489-496, 2014.